HAL
open science

Réactions chimiques et mélanges locaux induits par ultrasons : vers une chimiothérapie ciblée

Marine Bezagu

To cite this version:

Marine Bezagu. Réactions chimiques et mélanges locaux induits par ultrasons : vers une chimiothérapie ciblée. Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066492 . tel-01299791

HAL Id: tel-01299791

https://theses.hal.science/tel-01299791v1

Submitted on 8 Apr 2016

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : ED406

Laboratoire de Chimie Organique (LCO) de l'ESPCI ParisTech

Laboratoire de Microfluidique, MEMs et Nanostructures (MMN) de l'ESPCI ParisTech

Réactions chimiques et mélanges locaux induits par ultrasons

Vers une chimiothérapie ciblée

Par Marine Bézagu

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Janine Cossy et Patrick Tabeling

Soutenue le 9 octobre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Janine Cossy	ESPCI ParisTech	Directeur de thèse
Pr. Patrick Tabeling	ESPCI ParisTech	Directeur de thèse
Dr. Charles Baroud	Ecole Polytechnique	Rapporteur
Pr. Nicolas Tsapis	Institut Galien Paris-Sud	Rapporteur
Pr. Louis Fensterbank	UPMC	Examinateur
Dr. Stellios Arseniyadis	ESPCI ParisTech	Examinateur
Dr. Olivier Couture	ESPCI ParisTech	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Professeur Janine Cossy et le Professeur Patrick Tabeling pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs et pour avoir accepté d'encadrer ces travaux pendant trois ans. Merci de m'avoir donné cette opportunité et de m'avoir fait confiance pour travailler sur ce sujet malgré le défi que cela représentait.

Un grand merci au Docteur Stellios Arseniyadis pour ces presque quatre dernières années passées à travailler ensemble, merci de m'avoir encadrée, motivée, et soutenue en toutes circonstances. Avoir un mentor tel que toi, avec ta bonne humeur et ta détermination sans failles, a été une vraie chance pour moi !

Je tiens également à remercier le Docteur Olivier Couture : merci pour ta disponibilité, ta ténacité à faire marcher les manips (et ton obstination à me faire utiliser Matlab…). Nos longues discussions passées à refaire le projet – et le monde – auront activement contribué à m'aider à rebondir face à tous les problèmes rencontrés.

Merci également au Dr. Fabrice Monti : merci pour ton aide, ta patience, et ton soutien dans les moments difficiles. De tes talents de bricoleur-caméra à ceux de chanteur-chamrousse, en passant par tous les clins d'œil quotidiens, cela a été un vrai grand plaisir de travailler avec toi !

Je souhaite également remercier le Pr. Nicolas Tsapis, le Dr. Charles Baroud, et le Pr. Louis Fensterbank pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail, ainsi que pour les discussions très intéressantes que nous avons pu avoir à ce sujet.

Je remercie également tous les permanents avec qui j'ai pu discuter : Véronique Bellosta, Christophe Meyer, Domingo Gomez-Pardo, Andrei Corbu, Amandine Guérinot et Sébastien Reymond au laboratoire de chimie organique, Marie-Caroline Jullien, Mathilde Reyssat et Charlotte Bourgeois au laboratoire de microfluidique. Merci également à Isabelle, et à Perrine, Stéphanie et Cécile pour votre aide précieuse et tous les moments joyeux passés hors du laboratoire ! Merci bien sûr à Thomas, chef-RMN de compèt', d'avoir toujours été disponible et pour tous les coups de main et conseils prodigués.

Je voudrais également remercier tous les étudiants que j'ai côtoyé au laboratoire: les anciens et actuels membres de la SA team : en particulier, merci à Jeremy pour m'avoir accueillie sous sa hotte, pour son humour acéré et nos bonnes rigolades, merci à Amandine pour sa bonne humeur, sa gentillesse, pour nos discussions et pour ses talents de cuisinière ! Et à Erica pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à Marllon, Morgan et Nico pour les bons moments partagés et bonne chance pour la suite ! Merci

à tous les étudiants du laboratoire de chimie, en particulier à ceux que j'ai plus particulièrement côtoyé : Jean-Philippe, Kevin, Gaël, Baptiste, Martin, et merci en particulier à Elodie pour toutes nos longues discussions. Merci également aux étudiants du MMN, pour les franches rigolades, la bonne ambiance et les bières partagées, en particulier à Loïc (pour ton aide précieuse pour les gouttes, et –surtout !- pour le Beg… Benza…Bezu… « Béluga »…), Marie (ma coloc aux talents de macaroniste hors norme !), Anne-Laure, Vincent, Axel, Laura (co-princesse l'Oréal de choix ! « Tchin-tchin ! »), Césaré, Fériel…. Merci à Jules, Mr. Microfactory, pour un voisinage de bureau fort plaisant (et fort calorique) ces dernières années !

Un grand merci à Claudia, pour tous les moments partagés sur ce projet, au laboratoire ou en conférence (jusqu'au P. Burns virus !). Au-delà du projet, nous avons partagé de vrais moments d'amitié et je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci également à tous les autres membres de l'équipe d'imagerie biomédicale de l'Institut Langevin, et en particulier au Dr. Mickaël Tanter, pour m'avoir accueillie dans la bonne humeur au laboratoire. Merci à Clément, Charlie, Yann, Céline, Thu-Mai, Miguel, Juliette… pour m'avoir fait partager des semaines de folie à l'IEEE et ailleurs.

Je me dois aussi de remercier chaleureusement le Pr. Sébastient Papot et le Dr. Jonathan Clarhaut pour ces derniers mois passés ensemble sur l'étude *in vitro*. Jonathan, merci infiniment de m'avoir accueillie, d'avoir eu la patience de m'apprendre la culture cellulaire en accéléré, et pour toutes nos discussions. Merci également à Elodie : pour ta bonne humeur, ton aide, tes schokobons et toutes les boîtes de cellules et les bouteilles de milieu de culture préparées…

Je tiens également à remercier mes amis : les compagnons de thèse : Michel, Pauline, Charlotte, Rémi et Nadège d'avoir été là au quotidien. Et tous les autres, Adrien, Chloé, Joffrey, Thibault, Trinôme, Doudou, Bruno, Bibi, Marie, Bea… Merci à Nikos pour sa philosophie, son soutien et sa présence tout au long de cette aventure. Merci également à mes amis du théâtre, et en particulier à Paul qui m'a offert tant d'occasion de jouer ces dernières années. Du dragon à Tchekhov en passant par les robots, ça a été autant de moments salvateurs hors de la thèse !

Merci enfin à Florian de croire autant en moi, pour les longs skypes aux heures les plus improbables, et de façon générale pour faire en sorte d'être là pour moi malgré la distance.

Bien sûr, je me dois également de remercier toute ma famille, et en particulier mes parents et ma sœur, pour leur soutien absolu tout au long de ma thèse. Merci enfin à mes grands-parents pour leur accueil poitevin quasi-hebdomadaire sur le projet *in vitro* !

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations 13

Introduction générale 15

Chapitre I Utilisation de doubles émulsions sensibles aux ultrasons pour la chimie *in situ* 17

I.1. Introduction 17

I.2. Délivrance d'anticancéreux par ultrasons 18

I.2.1 Généralités 18

I.2.2 Méthodes de délivrance thermique de principes actifs 19

I.2.3 Délivrance mécanique de principes actifs à l'aide de microbulles 21

I.2.4 Combinaison des effets thermique et mécanique des ultrasons 25

I.2.5 Méthodes de ciblage 28

I.2.6 Limites et perspectives 29

I.3. Contrôle spatio-temporel d'une réaction chimique 31

I.3.1 Généralités 31

I.3.2 Contrôle par photo-activation à distance de la réaction 31

I.3.2.1 Introduction 31

I.3.2.2 Photo-activation de réactions de cycloaddition non catalysées 32

I.3.2.3 Photo-activation de réactions « click » catalysées au cuivre 33

I.3.2.4 Utilisation de composés photo-labiles 34

I.3.3 Contrôle par encapsulation et largage des réactifs 36

I.3.3.1 Introduction 36

I.3.3.2 Utilisation de capsules métalliques combinées à des champs radio-fréquence 37

I.3.3.3 Cages d'or photo-sensibles 38

I.3.3.4 Microgouttes 39

I.3.3.5 Conclusion 40

I.3.4 Résultats et discussion 41

I.3.4.1 Introduction 41

I.3.4.2 Fabrication des microgouttes de perfluorocarbone 41

I.3.4.3 Choix d'une réaction modèle 46

I.3.4.4 Synthèse 49

I.3.4.4.(1) Synthèse de l'azidocoumarine, A 49

I.3.4.4.(2) Synthèse du cyclooctyne, B 49

I.3.4.4.(3) Réaction de click 1 et 2. 53

I.3.4.5 Analyse spectroscopique 54
I.3.4.6 Optimisation de l'encapsulation des composés A et B 55
I.3.4.7 Largage avec un transducteur monoélément en canal microfluidique 57
I.3.4.8 Largage avec un échographe clinique dans une plaque OptiCell 62
I.3.4.9 Conclusion 64
I.4. Etude *in vitro* de la fabrication *in situ* d'un anticancéreux 65
I.4.1 Introduction 65
I.4.2 Choix du système prodrogue/enzyme 66
I.4.3 Encapsulation des composés 70
I.4.3.1 Etude de l'encapsulation de composés dilués 70
I.4.3.2 Encapsulation des composés actifs 72
I.4.4 Conditions expérimentales 74
I.4.4.1 Montage expérimental 74
I.4.4.1 Protocoles de délivrance 75
I.4.4.2 Traitement des données expérimentales 77
I.4.5 Résultats et discussion 77
I.4.5.1 Contrôles 77
I.4.5.2 Délivrance de HMR1826/doxorubicine 79
I.4.5.3 Délivrance de MMAE-glu/MMAE 81
I.4.5.3.(1) Expériences en transfert 81
I.4.5.3.(2) Expériences avec contact de 72 h 85
I.4.6 Conclusion de l'étude *in vitro* 86
I.5. Conclusion 87
I.6. Perspectives 87
I.7. Partie expérimentale 90
I.7.1 Généralités 90
I.7.2 Synthèse des composés A et B 90
I.7.3 Fluorescence des composés A et B synthétisés 98
I.7.4 Système de production de gouttes 99
I.7.5 Largage ultrasonore en microfluidique 100
I.7.6 Protocole de culture cellulaire 101
Chapitre II Mélange dans des systèmes microfluidiques 103
II.1. Le mélange en microfluidique : un défi 103
II.1.1 Introduction 103
II.1.2 Forces en jeu 104
II.1.3 Mélangeurs passifs 105
II.1.4 Mélangeurs actifs 106

II.2. Principe du micromélange acoustique 108
II.2.1 Stratégie employée 108
II.2.2 Conception du système microfluidique et montage expérimental 109
II.2.3 Cas expérimentaux 110
II.3. Caractérisation du micromélangeur acoustique 111
II.3.1 Evaluation de la qualité du mélange 112
II.3.1.1 Principe de la mesure et application au cas hydrophobe 112
II.3.1.2 Cas hydrophile 115
II.3.2 Etude de la gamme de nombres de Reynolds atteignable 116
II.3.3 Capacité de mélange à la demande 119
II.3.4 Etude du mécanisme de mélange 120
II.3.5 Eléments de la cinétique de mélange 122
II.4. Conception d'un système intégrable 125
II.4.1 Etude de la cinétique de démixion du PFC 126
II.4.2 Mise au point d'un système d'extraction du PFC 130
II.5. Conclusion 131
II.6. Perspectives 131
II.7. Partie expérimentale 132
II.7.1 Généralités 132
II.7.2 Préparation des fluides étudiés 134
Annexe 1 : Fabrication des systèmes microfluidiques 137
A1.1. Fabrication du moule de silicone 137
A1.2. Fabrication des puces 138
Annexe 2 : Etalonnage du transducteur ultrasonore mono-élément et alignement avec le système optique 139
A2.1. Montage électronique et paramètres en jeu 139
A2.2. Etude de la pression acoustique autour du point focal 140
A2.3. Variations de la pression acoustique 141
A2.4. Alignement du transducteur avec l'axe optique d'un microscope 143
Annexe 3 : Publications 145
Conclusion générale 155
Références bibliographiques 159

Liste des abréviations

β-glu	β-glucuronidase
Ac	acétyle
Add.	addition
Bu	butyle
CCM	chromatographie sur couche mince
CMC	concentration micellaire critique
CuAAC	cycloaddition entre un alcyne et un azoture catalysée au cuivre
DAPI	4’,6-diamidino-2-phénylindole
DIPEA	*N*,*N*-diisopropylétylamine
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DMAP	*N*,*N*-diméthyl-4-aminopyridine
DMF	*N*,*N*-diméthylformamide
DMP	périodinane de Dess-Martin
DMSO	diméthylsulfoxide
DOX	doxorubicine
eb	ébullition
équiv.	équivalent
Et	éthyle
EtOH	éthanol
EWG	« electron withdrawing group », groupe électro-attracteur
FUS	ultrasons focalisés
GSH	glutathion réduit
HIFU	ultrasons focalisés de haute intensité
h	heure
Init.	initiateur
IR	infrarouge
IRM	imagerie par résonance magnétique
MB	microbulles
Me	méthyle
MI	indice de mélange
min	minute
MMAE	monométhylauristatine E
MMAE-glu	monométhylauristatine E glucuronylée
MOPS	acide 3-morpholinopropan-1-sulfonique

NABQI	*N*-acétylbenzoquinoneimine
PBS	tampon phosphate salin
PDMS	polydiméthylsiloxane
PEG	polyéthylène glycol
PFC	perfluorocarbone
PNP	pression acoustique négative
ppm	parties par million
Q	débit
quant.	quantitatif
Rdt	rendement
Re	nombre de Reynolds
RF	radiofréquence
RMN	résonance magnétique nucléaire
rt	room temperature
T°	température
t.a.	température ambiante
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBS	*tert*-butyldiméthylsilyle
t-Bu	*tert*-butyle
Tf	triflate
THF	tétrahydrofurane
TMDIBO	tétraméthoxydibenzocyclooctyne
TMS	triméthylsilyle
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthylpropan-1,3-diol
TSL	liposomes thermosensibles
US	ultrasons
UV	ultraviolet
v/v	rapport volume/volume
w/v	rapport poids/volume

Introduction générale

Le développement de méthodes de délivrance ciblées de médicaments est devenu un objectif primordial dans le cadre des thérapies anticancéreuses afin de limiter les effets secondaires, inhérents à la toxicité très élevée des chimiothérapies traditionnelles sur les tissus sains, mais également de manière à augmenter la concentration en médicament dans les zones ciblées (tumeurs) par rapport aux autres parties du corps. Pour partie, les systèmes de délivrance sont des systèmes passifs, où des transporteurs de molécules thérapeutiques sont soit « adressés » directement à la zone à traiter grâce à une fonctionnalisation de surface appropriée (présence d'anticorps par exemple), soit accumulés dans les tissus cancéreux du fait de leur perméabilité accrue et de l'effet de rétention existant dans ces zones. Cependant, il n'existe malheureusement que peu de marqueurs spécifiques des zones tumorales. Afin de s'affranchir de la fonctionnalisation de surface par des marqueurs tumoraux, il est possible de combiner l'utilisation de transporteurs biocompatibles avec un moyen de déclencher à distance, de manière non invasive, et de façon spatialement déterminée, l'ouverture de ces transporteurs et la libération de leur contenu. Dans ce cadre, les ultrasons apparaissent comme une méthode de déclenchement de choix du fait de leur capacité à se propager profondément dans les tissus humains, sans pour autant être invasifs ou destructifs. C'est dans ce contexte que s'inscrit la première partie de cette thèse. Nous y décrirons une nouvelle stratégie de délivrance appelée « chimie *in situ* », basée sur l'encapsulation de molécules dans des doubles émulsions dont la phase perfluorocarbonée centrale est vaporisable sous l'effet d'ultrasons cliniques. Cette stratégie permettrait d'isoler des partenaires réactionnels et ainsi générer *in situ* des réactions chimiques contrôlées, par libération ultrasonore des composés encapsulés.

Nous démontrerons tout d'abord la possibilité d'utiliser ces doubles émulsions afin de contrôler spatialement mais également temporellement une réaction chimique spontanée.
Nous verrons ensuite que cette stratégie de chimie *in situ* peut être appliquée avec succès à l'activation *in vitro* d'une pro-drogue de la doxorubicine et de la monométhylauristatine E, ouvrant ainsi la voie à la fabrication de médicaments directement dans les tumeurs.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous nous intéresserons au mélange dans les systèmes microfluidiques. Dans ces systèmes de quelques centaines de micromètres, les écoulements de fluides

sont laminaires et le mélange entre fluides est lent. En effet, il est basé sur les phénomènes de diffusions et, à ces échelles, les temps de diffusion pour des systèmes de quelques centipoises de viscosité sont de l'ordre de plusieurs minutes. Il est donc nécessaire de concevoir des méthodes de mélange efficaces dans l'optique de créer de véritables « laboratoires sur puce ». Nous nous attacherons à montrer qu'une généralisation du concept de vaporisation du perfluorocarbone par ultrasons permet d'accéder à une méthode de mélange microfluidique rapide et efficace.

Chapitre I

Utilisation de doubles émulsions sensibles aux ultrasons pour la chimie *in situ*

I.1. Introduction

Le développement de méthodes de délivrance de médicaments ciblées est devenu un objectif primordial dans le cadre des thérapies anticancéreuses. En particulier, de nombreuses méthodes de délivrance acoustique ont été proposées ces dernières années. Nous proposerons donc dans un premier temps une vue d'ensemble de ces méthodes. Dans un second temps, nous verrons qu'il est possible de combiner l'utilisation de microgouttes de perfluorocarbone (PFC) avec des ultrasons afin de déclencher à distance et de façon spatialement déterminée la vaporisation du PFC, et donc l'ouverture de ces microgouttes et la libération de leur contenu. Nous démontrerons tout d'abord la possibilité d'utiliser ces microgouttes de PFC afin de contrôler spatialement mais également temporellement une réaction chimique spontanée comme la cycloaddition non catalysée entre un azoture et un alcyne. Nous verrons ensuite que cette stratégie de chimie *in situ* peut être appliquée à l'activation locale *in vitro* de pro-drogues de la doxorubicine et de la monométhylauristatine E par la β-glucuronidase, ouvrant ainsi la voie à la fabrication de médicaments directement dans les tumeurs.

I.2. Délivrance d'anticancéreux par ultrasons

I.2.1 Généralités

Augmenter l'index thérapeutique (à savoir le rapport entre la dose toxique moyenne et la dose thérapeutique moyenne)[1] des composés anticancéreux représente l'un des défis majeurs de l'industrie pharmaceutique pour le développement de nouvelles drogues. Dans cette perspective, des systèmes de délivrance ciblée ont été développés afin d'améliorer les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques des drogues administrées.[2] En particulier, en oncologie, la délivrance ciblée d'anticancéreux est devenue l'un des moyens les plus explorés pour limiter les effets secondaires des chimiothérapies traditionnelles sur les tissus sains du patient. Elle consiste à combiner l'utilisation d'un transporteur biocompatible contenant le principe actif ou bien fixé sur celui-ci avec un moyen soit de cibler passivement les tissus visés (taille, fonctionnalisation de surface),[3] soit de déclencher à distance et de façon spatialement précise l'ouverture de ce transporteur afin d'administrer localement le produit encapsulé. Les ultrasons sont un moyen de choix pour agir à distance sur ces transporteurs. En effet, les ultrasons cliniques utilisent des ondes acoustiques qui ne sont ni invasives ni destructives pour les tissus traversés. Leur profondeur de pénétration dans les tissus permet virtuellement d'atteindre les mêmes zones du corps qu'en imagerie échographique. La précision spatiale de la délivrance est assurée par la focalisation des ondes dans la zone à traiter, selon des techniques déjà établies dans le cadre du diagnostic ou de la thérapie par ultrasons, à savoir qu'une pénétration centimétrique pour une résolution millimétrique est possible.[4]

Ayant identifié les ultrasons comme outil de « transmission » pour déclencher le largage, le défi qui s'imposait à nous était de concevoir des transporteurs sensibles au signal ultrasonore, mais qui soient également biocompatibles et stables en milieu biologique en l'absence de sollicitation acoustique.

L'émergence de méthodes de délivrance par ultrasons ayant été grandement favorisée par le développement et l'utilisation clinique de microbulles comme agents de contraste pour l'imagerie, l'utilisation des microbulles a naturellement été « élargie » au transport de molécules thérapeutiques. Cependant, nous allons voir que de nombreuses autres stratégies ont été explorées, utilisant toute une gamme de transporteurs. Le largage des produits transportés s'effectue de manière générale selon deux types de mécanismes : thermique ou mécanique. Parfois, certaines stratégies exploitent également une combinaison de ces deux mécanismes de manière synergique.[5,6]

---

[1] Muller, P. Y.; Milton, M. N. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11*, 751-761.

[2] Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818-1822.

[3] Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. *Trends in Pharm. Sciences* **2009**, *30*, 592-599.

[4] Mitragotri, S. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 255-260.

[5] Ferrara, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1097-1102.

[6] Couture, O.; Foley, J.; Kassell, N. F.; Larrat, B.; Aubry, J.-F. *Transl. Cancer Res.* **2014**, *3*, 494-511.

I.2.2 Méthodes de délivrance thermique de principes actifs

Dans les cas de délivrance de produits par voie thermique, il est nécessaire d'induire sous l'effet des ultrasons une augmentation locale de température dans la zone à traiter. Cela implique en général l'utilisation de transducteurs à ultrasons focalisés (FUS) pendant des temps de traitement relativement longs (de plusieurs secondes à plusieurs dizaines de minutes). Afin de limiter l'intensité acoustique requise pour le largage des composés encapsulés et ainsi circonscrire au maximum l'élévation de température aux tissus ciblés et d'éviter l'endommagement des tissus sains, les transporteurs sont majoritairement conçus pour être capable de délivrer leur contenu à des températures tout juste supérieures à la température physiologique (42-43 °C).[7] En effet, au delà de 43 °C, l'hyperthermie peut entraîner la mort des cellules exposées.

Les liposomes thermo-sensibles (« Thermo-Sensitive Liposomes » ou TSL) sont les transporteurs à délivrance thermique les plus décrits dans la littérature.[8] Ils sont composés d'une solution aqueuse encapsulée au sein d'une ou plusieurs bicouches lipidiques (Figure I.1).

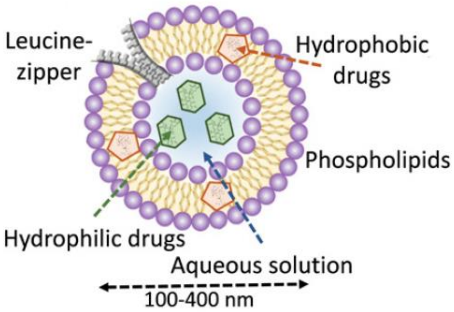


Figure I.1. Représentation schématique d'un liposome thermo-sensible (Figure extraite de la référence 5).

Des agents thérapeutiques peuvent être encapsulés dans les bicouches lipidiques (dans le cas d'agents à caractère lipophile) ou dans la solution aqueuse (dans le cas de drogues à caractère hydrophile). Dans ce dernier cas, un exemple connu est celui du « Doxil », un agent liposomal approuvé en 1995 par la FDA aux Etats-Unis, et transportant de la « doxorubicine », un composé anticancéreux.[9] Cet agent liposomal permet de diminuer significativement la toxicité de la doxorubicine tout en autorisant un

[7] Weinstein, J. N.; Magin, R. L.; Yatvin, M. B.; Zaharko, D. S.; *Science* **1979**, *204*, 188-191.

[8] Schroeder, A.; Kost, J.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *162*, 1-16.

[9] Barenholz, Y. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117-134

ciblage des zones tumorales pour la libération de l'agent anticancéreux. Un agent liposomal thermosensible contenant également de la doxorubicine, le « ThermoDox® », développé par l'entreprise Celsion, est actuellement en phase II pour le traitement du cancer du sein.[10]

Des structures dites de « glissières à leucine » peuvent également être intégrées à la membrane de ces liposomes, comme décrit dans les travaux de Al-Ahmady *et al.* (Figure I.2). Le fait d'insérer dans la structure des liposomes un peptide thermosensible tel qu'une « glissière à leucine »[11] permet de pouvoir rompre l'unité de la membrane liposomale sous l'effet d'une hyperthermie modérée. En effet, les glissières à leucine sont connues pour leur structure hélicoïdale. Sous l'effet du chauffage, les brins de cette hélice vont se dissocier et permettre ainsi l'ouverture du liposome et le largage de son contenu dans le milieu environnant.

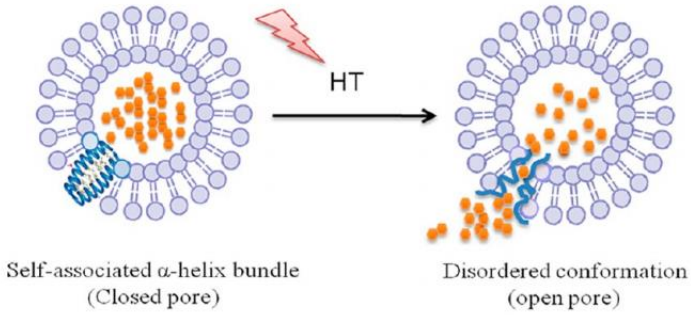


Figure I.2. Principe de l'ouverture des liposomes à « glissière à leucine » sous l'effet d'une hyperthermie locale (Figure extraite de la référence 12).

Ces vésicules hybrides permettent de combiner les avantages des liposomes thermo-sensibles aux propriétés de dépliement et de changement conformationnel de peptides thermo-sensibles afin de libérer un composé encapsulé sous l'effet d'une faible hyperthermie.[12] Des études *in vitro* ont notamment montré que ces transporteurs pouvaient libérer jusqu'à 80% du produit encapsulé après 15 minutes d'hyperthermie à 43 °C.[13]

Des techniques d'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) peuvent également être couplées aux Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU) afin d'apporter à la fois un meilleur contrôle spatial pour la délivrance mais également procurer un rétrocontrôle en température à la sonde du HIFU. Ainsi, la co-

[10] https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00826085

[11] Mackay, J. A.; Chilkoti, A. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 483-500.

[12] Al-Ahmady, Z. S.; Al-Jamal, W. T.; Bossche, J. V.; Bui, T. T.; Drake, A. F.; Mason, A. J.; Kostarelos, K. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9335-9346.

[13] Mannaris, C.; Efthymiou, E.; Meyre, M.-E.; Averkiou, M. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2013**, *39*, 2011-2020.

encaspulation d'un produit thérapeutique comme la doxorubicine et d'un agent de contraste d'IRM paramagnétique permet de guider la procédure de largage (Figure I.3).[14,15]

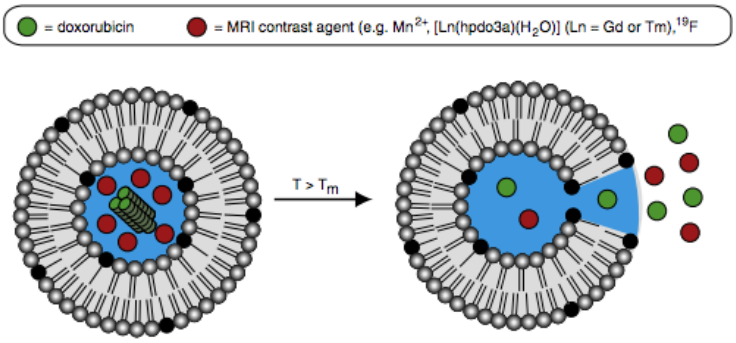


Figure I.3. Délivrance conjointe d'agents de contraste d'IRM (en rouge) et de drogue (en vert) sous l'effet d'une élévation de température locale (Figure extraite de la référence 15).

Ces méthodes de délivrance sont parmi les plus connues et les plus avancées,[16] et elles ont déjà permis de pousser des candidats en phase clinique. En particulier, une étude en Phase I a été récemment lancée à l'université d'Oxford pour évaluer la délivrance ciblée de doxorubicine hors de liposomes à l'aide d'Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU) pour le traitement de cancers métastasés du foie.[17] Cependant, un inconvénient majeur réside encore dans la nécessité d'appliquer de longs temps de traitement pour obtenir une augmentation de température locale suffisante et donc une délivrance efficace.

I.2.3 Délivrance mécanique de principes actifs à l'aide de microbulles

La délivrance de produits thérapeutiques peut également être réalisée en imposant un stress mécanique important sur les transporteurs de ces produits à l'aide d'ultrasons. C'est notamment le cas lors de l'utilisation de microbulles comme transporteurs.

---

[14] Lorenzato, C.; Cernicanu, A.; Meyre, M.-E.; Germain, M.; Pottier, A.; Levy, L.; Denis de Senneville, B.; Bos, C.; Moonen, C.; Smirnov, P. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 185-192.

[15] Grüll, H.; Langereis, S. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 317-327.

[16] Pour des exemples d'études *in vivo*, voir : (a) Ranjan, A.; Jacobs, G. C.; Woods, D. L.; Negussie, A. H.; Partanen, A.; Yarmolenko, P. S.; Gacchina, C. E.; Sharma, K. V.; Frenkel, V.; Wood, B. J.; Dreher, M. R. *J. Control. Release* **2012**, *158*, 487-494. ; (b) Kheirolomoom, A.; Lai, C.-Y.; Tam, S. M.; Mahakian, L. M.; Ingham, E. S.; Watson, K. D.; Ferrara, K. W. *J. Control. Release* **2013**, *172*, 266-273. ; (c) de Smet, M.; Heijman, E.; Langereis, S.; Hijnen, N. M.; Grüll, H. *J. Control. Release* **2011**, *150*, 102-110.

[17] https://clinicaltrials.gov/show/NCT02181075

Nous avons vu précédemment que les chercheurs impliqués dans la délivrance de médicaments s'étaient naturellement tournés vers l'utilisation de MicroBulles (MB), en raison de l'utilisation déjà répandue de ces dernières en clinique en tant qu'agents de contraste. En effet, ces entités composées d'un cœur gazeux sont particulièrement échogènes, et leur signal est facile à isoler en exploitant leur comportement non-linéaire, qui se traduit par des réponses acoustiques qui varient non linéairement avec l'amplitude de l'onde incidente. Grâce à leurs propriétés de compressibilité, leur rayon peut varier rapidement (jusqu'à un facteur deux) une fois placées dans un champ acoustique, entraînant des effets mécaniques notables sur le milieu environnant. Des pressions acoustiques suffisamment élevées vont mener jusqu'à la rupture de la coque lipidique des MB.

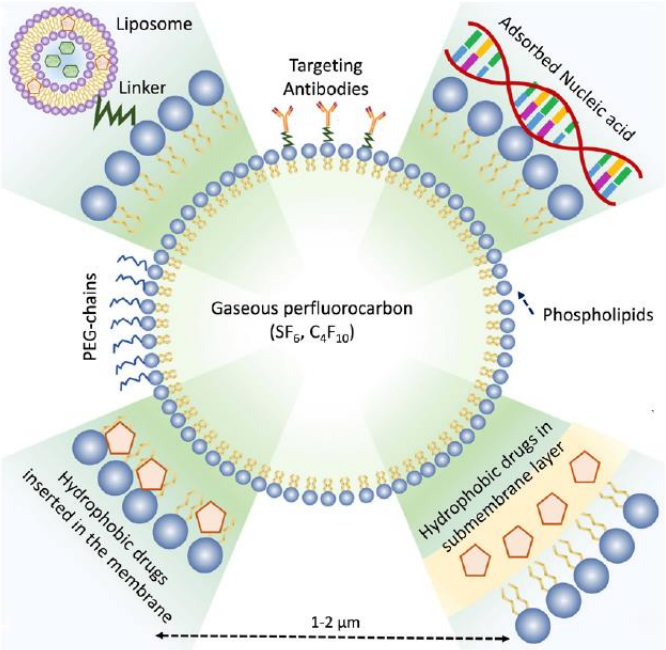


Figure I.4. Représentation schématique de différentes structures de microbulles utilisées pour la délivrance de principes actifs (Figure extraite de la référence 5).

C'est cette réponse aux pressions acoustiques qui permet d'envisager l'utilisation des MB pour la délivrance de composés thérapeutiques. En effet, la rupture de la coque lipidique provoque le largage des composés adsorbés ou liés à sa surface. Le déplacement des fluides environnants sous l'effet des oscillations des microbulles dans le champ acoustique facilite la diffusion et la pénétration des composés thérapeutiques. Ces effets ne dépendent pas d'une élévation locale de température mais plutôt de la fréquence et de la pression acoustique maximale. La délivrance de composés encapsulés dans des MB est de ce fait compatible avec des systèmes ultrasonores de faible intensité, voire même des appareils de diagnostic, et seules de courtes impulsions ultrasonores sont nécessaires pour obtenir l'effet désiré.

Différents types de microbulles ont été développés afin de transformer les agents de contraste en vecteurs de principes actifs.[18,19] Parmi les stratégies envisagées, une première méthode consiste à attacher, de manière covalente[20] ou à l'aide de liaisons fortes comme la liaison streptavidine-biotine,[21,22] des liposomes tels que le Doxil cité précédemment à la surface des MB (Figure I.4, en haut à gauche). Les liposomes sont ensuite largués sous l'effet des oscillations de l'agent de contraste dans le champ acoustique. Dans ce contexte, une étude *in vivo* de Tinkov *et al.* sur des microbulles fonctionnalisées avec des liposomes chargés en doxorubicine a démontré une inhibition significative de la croissance tumorale chez le rat après largage.[23]

Une autre stratégie consiste à adsorber directement les composés à larguer (principes actifs ou ADN par exemple) à de la surface chargée de la coque des MB (Figure I.4, en haut à droite).[24,25] Des composés à caractère hydrophobe peuvent également être placés sous la membrane des MB (Figure I.4, en bas à droite) ou bien au sein même de celle-ci (Figure I.4, en bas à gauche).[26] En parallèle de la délivrance d'agents anticancéreux « classiques » comme la doxorubicine, les propriétés des dérivés de MB ont été exploitées pour délivrer d'autres agents thérapeutiques, comme par exemple des acides nucléiques, dans le cadre de la thérapie génique. En effet, non seulement les transporteurs sensibles aux ultrasons permettent de transporter de tels acides nucléiques dans des zones très spécifiques, mais leur structure permet également d'éviter la dégradation par les enzymes plasmatiques du matériel génétique encapsulé.[27]

En particulier, Lentacker *et al.* ont montré que des microbulles fonctionnalisées avec des « lipoplexes » (des liposomes transportant du matériel génétique tel que des « mARN ») (Figure I.5) pouvaient être utilisées dans le but de transfecter des cellules dendritiques et développer ainsi une nouvelle immunité

[18] Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2161-2170.

[19] Geers, B.; Dewitte, H.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 248-255.

[20] Geers, B.; Lentacker, I.; Sanders, N. N.; Demeester, J.; Meairs, S.; De Smedt, S. C. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 249-256.

[21] Lentacker, I.; Geers, B.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 101-108.

[22] Escoffre, J.-M.; Mannaris, C.; Geers, B.; Novell, A.; Lentacker, I.; Averkiou, M.; Bouakaz, A. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2013**, *60*, 78-87.

[23] Tinkov, S.; Coester, C.; Serba, S.; Geis, N. A.; Katus, H. A.; Winter, G.; Bekeredjian, R. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 368-372.

[24] Borden, M. A.; Caskey, C. F.; Little, E.; Gillies, R. J.; Ferrara, K. W. *Langmuir* **2007**, *23*, 9401-9408.

[25] Frenkel, P. A.; Chen, S.; Thai, T.; Shohet, R. V.; Grayburn, P. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2002**, *28*, 817-822.

[26] Tartis, M. S.; McCallan, J.; Lum, A. F. H.; LaBell, R.; Stieger, S. M.; Matsunaga, T. O.; Ferrara, K. W. *Ultrasound Med. Biol.* **2006**, *32*, 1771-1780.

[27] Rychak, J. J.; Klibanov, A. L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 82-93.

envers les cellules tumorales, autrement dit de développer un système de « vaccination » contre le cancer.[28,29]

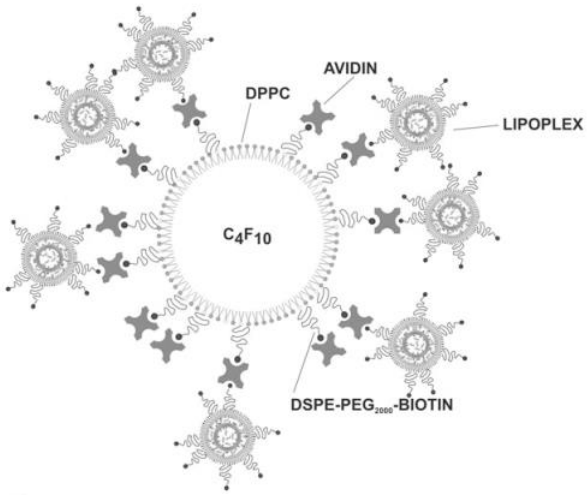


Figure I.5. Représentation schématique d'une microbulle fonctionnalisée avec des lipoplexes *via* des ponts biotine-avidine-biotine.[30]

L'inconvénient principal de ces méthodes de délivrance impliquant des microbulles réside dans le fait que la grande majorité du volume de ces dernières est composé de gaz plutôt que du produit thérapeutique à délivrer. La « charge utile » de ces transporteurs est donc limitée à la surface des MB, et donc à une faible proportion du volume total.

Afin de pallier cet inconvénient, différentes stratégies alternatives basées sur le principe de la délivrance mécanique par ultrasons ont été proposées, en particulier l'inclusion de bulles de gaz dans des liposomes,[31] ou encore l'utilisation de micelles polymériques[32] (Figure I.6), un transporteur hydrophobe similaire aux liposomes ayant la propriété de larguer son contenu à travers un processus de cavitation sous l'effet des ultrasons.[33] C'est ainsi qu'une étude menée *in vivo* sur des rats par Staples *et al*. a permis d'examiner la pharmacocinétique de micelles contenant de la doxorubicine et de la comparer à celle de la drogue libre, démontrant leur accumulation préférentielle dans la zone tumorale ainsi que

[28] De Temmerman, M.-L.; Dewitte, H.; Vanderbroucke, R. E.; Lucas, B.; Libert, C.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I.; Rejman, J. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9128-9235.

[29] Dewitte, H.; Verbeke, R.; Breckpot, K.; Vandenbroucke, R. E.; Libert, C.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I. *J. Control. Release* **2014**, *195*, 138-146.

[30] Cool, S. K.; Geers, B.; Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, **2013**, *948*, 195-204.

[31] Suzuki, R.; Takizawa, T.; Negishi, Y.; Hagisawa, K.; Tanaka, K.; Sawamura, K.; Utoguchi, N.; Nishioka, T.; Maruyama, K. *J. Control. Release* **2007,** *117*, 130-136.

[32] Husseini, G. A.; Pitt, W. G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1137-1152.

[33] Gao, Z.; Fain, H. D.; Rapoport, N. *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 317-330.

l'accroissement de la concentration de doxorubicine dans la tumeur après largage ultrasonore par rapport aux concentrations observées avec la drogue circulante.[34]

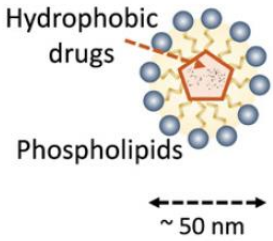


Figure I.6. Représentation schématique d'une micelle utilisée pour la délivrance de médicaments (Figure extraite de la référence 5).

I.2.4 Combinaison des effets thermique et mécanique des ultrasons

La combinaison d'un effet de stress thermique et de stress mécanique peut également être exploitée pour provoquer la vaporisation de certains liquides. Des liquides perfluorés de différentes natures comme le décafluorobutane,[35] le perfluoropentane ou encore le perfluorohexane ont notamment été utilisés. Ces perfluorocarbones (PFC) peuvent être confinés sous forme liquide dans des nano- ou des micro-gouttes grâce à la pression de Laplace. Lorsque les perfluorocarbones sont soumis à une sollicitation acoustique, ces liquides passent rapidement en phase gazeuse, ce qui entraîne la destruction de la goutte et l'expansion rapide de son contenu.[36] Le mécanisme sous-tendant la vaporisation acoustique de ces gouttes de PFC a été récemment étudié et décrit par Shpak *et al.*[37] : un phénomène de « superfocalisation » de l'onde acoustique au sein de la goutte serait ainsi à l'origine de sa vaporisation. Plus précisément, la vaporisation acoustique serait initiée par la focalisation des super-harmoniques d'une onde acoustique déformée et non-linéaire. Cette focalisation conduirait à une augmentation de la pression acoustique négative jusqu'à un facteur dix au niveau du point focal. Il est intéressant de noter qu'un tel phénomène peut être obtenu avec des pressions acoustiques compatibles avec celles délivrées par les appareils d'échographie clinique traditionnels.

Dans la perspective d'appliquer ces systèmes à la délivrance de médicaments, il faut donc trouver une façon de combiner les propriétés du PFC avec la « charge utile » du vecteur, à savoir le produit thérapeutique. Plusieurs méthodes ont été proposées parmi lesquelles l'utilisation de nanogouttes

[34] Staples, B. J.; Pitt, W. G.; Roeder, B. L.; Husseini, G. A.; Rajeev, D.; Schaalje, G. B. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3122-3131.

[35] Sheeran, P. S.; Wong, V. P.; Luois, S.; McFarland, R. J.; Ross, W. D.; Feingold, S.; Matsunaga, T. O.; Dayton, P. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2011**, *37*, 1518-1530.

[36] Kawabata, K.; Sugita, N.; Yoshikawa, H.; Azuma, T.; Umemura, S. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, 4548-4552.

[37] Shpak, O.; Verweij, M.; Vos, H. J.; de Jong, N.; Lohse, D.; Versluis, M. *PNAS* **2014**, *111*, 1697-1702.

d'émulsion de PFC liquide incorporées dans des liposomes (Figure I.7).[38] L'application d'ultrasons sur ces structures appelées « eLiposomes » conduit ainsi à la vaporisation du PFC liquide en PFC gazeux et l'augmentation de volume consécutive à ce changement de phase entraîne la rupture des liposomes et la libération de la drogue encapsulée.

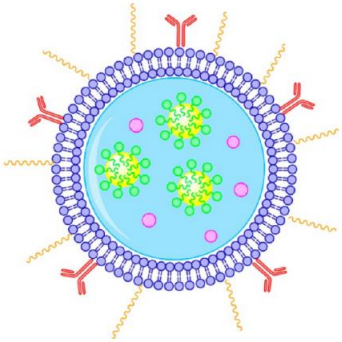


Figure I.7. Illustration de la structure d'un « eLiposome ». La membrane lipidique exprime des ligands de ciblage et des chaînes PEG pour la furtivité des liposomes *in vivo*. Au sein du eLiposome, on retrouve la drogue (en rose) et des nanogouttes d'émulsions de PFC (en jaune) stabilisées par des phospholipides (Figure extraite de la référence 38).

Une autre méthode permettant de mettre à profit l'influence thermique et mécanique des ultrasons consiste à encapsuler une nanoémulsion d'eau dans le PFC sous forme de gouttes micrométriques (la phase aqueuse contenant le composé à délivrer) (Figure I.8). En effet, grâce aux propriétés de non-miscibilité du PFC avec la plupart des solvants usuels et à l'utilisation de tensioactifs appropriés, les nanogouttes d'eau encapsulées dans la matrice restent isolées du milieu extérieur.

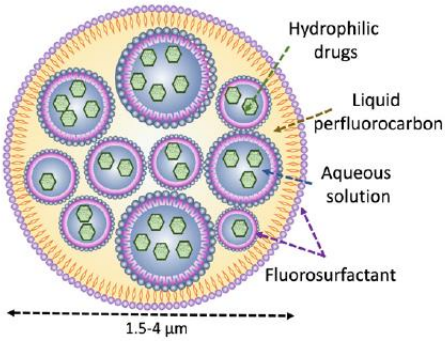


Figure I.8. Représentation schématique d'une microgouttelette de perfluorocarbone liquide (Figure extraite de la référence 5).

[38] Javadi, M.; Pitt, W. G.; Belnap, D. M.; Tsosie, N. H.; Hartley, J. M. *Langmuir* **2012**, *28*, 14720-14729.

La vaporisation de la matrice perfluorocarbonée (perfluoropentane[39] ou perfluorohexane[40,41]) de ces doubles émulsions sous l'effet d'impulsions ultrasonores engendre alors la déstructuration des gouttes et la libération de la phase aqueuse interne dans le milieu environnant. Ce type de transporteur a pour avantage que près de 2/3 du volume correspond à la « charge utile », à savoir la phase aqueuse contenant le produit d'intérêt.

C'est ainsi que notre équipe a récemment utilisé ces microgouttes de PFC pour encapsuler de la fluorescéine (un traceur biocompatible fluorescent) dans ces microgouttes. Les premières études menées au laboratoire chez le rat ont démontré qu'une précision de l'ordre du millimètre pouvait être atteinte au niveau du largage dans les tissus avec une excellente rétention de la fluorescéine dans les gouttes en amont du largage (Figure I.9).[42]

Figure I.9. Largage de microgouttes de PFC chez le rat à l'aide d'un échographe clinique : apparition de zones de largage sur l'image échographique (en haut) et sous lumière UV (en bas).

La précision du largage est d'autant plus élevée que les transporteurs sont de taille monodisperse. En effet, chaque taille de transporteur va réagir à une pression acoustique donnée. La monodispersité assure donc un largage optimal des microgouttes de PFC. C'est l'un des avantages d'une thérapie basée sur un système à seuil de sensibilité comme l'est le largage de microgouttes de PFC sous l'effet d'une pression acoustique. Une telle méthode confère une résolution spatiale supérieure à une méthode de libération par effet de température par exemple (Figure I.10).

[39] Fabiilli, M. L.; Haworth, K. J.; Sebastian, I. E.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Ultrasound Med. Biol.* **2010**, *36*, 1364-1375.

[40] Fabiilli, M. L.; Lee, J. A.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2753-2765.

[41] Couture, O.; Faivre, M.; Pannacci, N.; Babataheri, A.; Servois, V.; Tabeling, P.; Tanter, M. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 1116-1123.

[42] Couture, O.; Urban, A.; Bretagne, A.; Martinez, L.; Tanter, M.; Tabeling, P. *Med. Phys.* **2012**, *39*, 5229-5237.

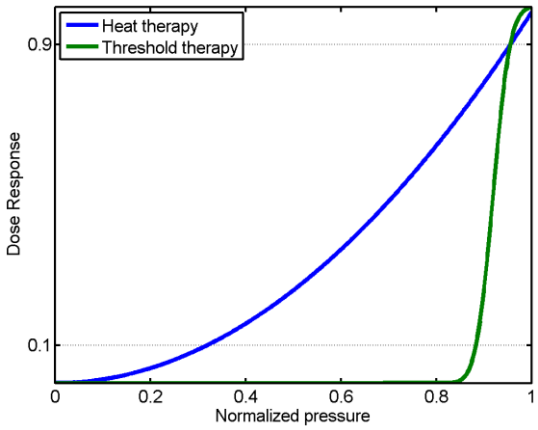


Figure I.10. Comparaison schématique de la précision d'une thérapie thermique et d'une thérapie à seuil de pression.

Les microgouttes de PFC vectorisant de la fluorescéine pourraient être utilisées pour tatouer des contours tumoraux et ainsi offrir un outil visuel pour guider les chirurgiens dans la résection de tumeurs.

I.2.5 Méthodes de ciblage

Outre le transport des produits actifs, les méthodes de délivrance se doivent d'adresser aussi précisément que possible ces produits actifs sur le site à traiter (les tumeurs dans le cas de la délivrance d'anticancéreux). Quels que soient les transporteurs conçus (liposomes, microbulles, ou encore microgouttes de PFC liquide), il est donc non seulement nécessaire que ces transporteurs soient spécifiquement sensibles aux ultrasons pour délivrer leur contenu, mais également que cette délivrance ait lieu sur le site ciblé. Or les MB sont des agents intravasculaires, qui ne sont capables de circuler que quelques minutes après leur injection par voie intraveineuse. La sonication doit donc avoir lieu lors du passage de ces vecteurs au niveau de la cible. Du fait de leur taille (plusieurs micromètres), les microgouttes de PFC se comportent de manière très similaire aux MB, et ne peuvent circuler que pendant un certain temps après leur injection.[43] Cependant, afin d'allonger le temps de rétention de ces vecteurs dans les zones tumorales, leur surface peut notamment être fonctionnalisée avec des agents de ciblage tels que des anticorps spécifiques de marqueurs tumoraux ou encore des peptides ou des carbohydrates.[44] A l'inverse, des vecteurs de taille submicrométrique tels que les liposomes ou les micelles peuvent être conçus pour s'accumuler naturellement dans les zones tumorales. En effet, en dessous de 200 nm, ces vecteurs ont la capacité de traverser les parois plus poreuses des structures vasculaires angiogéniques

[43] Fabiilli, M. L.; Piert, M. R.; Koeppe, R. A.; Sherman, P. S.; Quesada, C. A.; Kripfgans, O. D. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 366-374.

[44] Hernot, S.; Klibanov, A. L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1153-1166.

vers l'espace extravasculaire (c'est ce qu'on appelle « l'effet EPR », pour « Enhanced Permeability and Retention effect »).[45] Ces vecteurs peuvent ainsi être injectés plusieurs heures, voire plusieurs jours avant leur libération par sonication, pour favoriser leur accumulation dans la zone tumorale ciblée.

I.2.6 Limites et perspectives

Les méthodes de délivrance par ultrasons décrites précédemment possèdent chacune leurs forces et leurs limites. Elles partagent cependant toutes le même risque de largage non-spécifique. En effet, une partie non négligeable de la quantité totale de drogue injectée s'accumule dans les tissus sains, ce qui constitue une limite. Il serait donc idéal de pouvoir circonscrire l'effet toxique de ces drogues aux seules zones cancéreuses ou, de façon plus générale, aux seules zones concernées par le largage ultrasonore.

Pour notre part, nous avons donc proposé une nouvelle stratégie de délivrance par ultrasons appelée « chimie *in* situ », où le principe actif pourrait être généré directement et exclusivement sur le site de largage. Ainsi, des précurseurs non toxiques de la drogue active, ou pro-drogues, pourraient être encapsulés dans des microgouttes de PFC, isolés les uns des autres par une matrice de PFC, avant d'être mis en contact sur le site de largage par déstructuration des gouttes sous l'effet des ultrasons. Le produit actif serait dans ces conditions généré uniquement dans la zone de largage, tandis que hors de cette zone, les précurseurs resteraient isolés les uns des autres (Figure I.11).

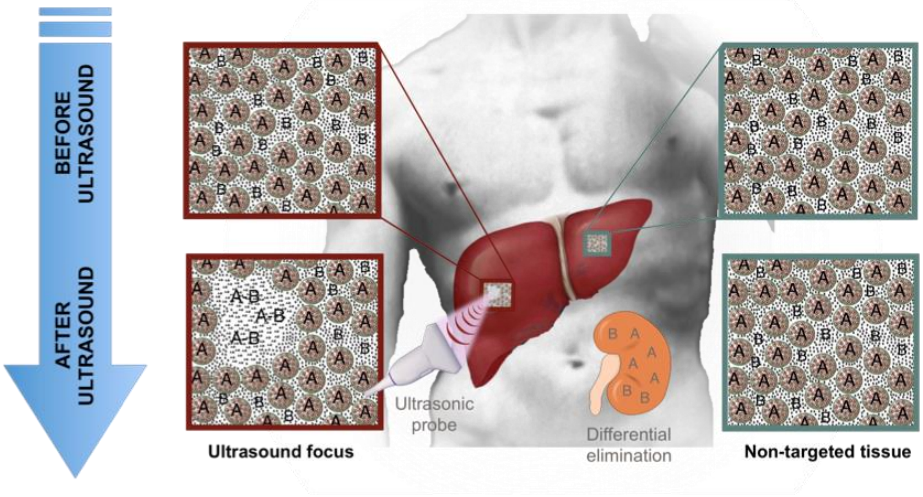


Figure I.11. Principe de la « chimie *in situ* » : le composé thérapeutique **A-B** est généré exclusivement au niveau de la zone de largage ultrasonore par libération du composé encapsulé **A** en présence de **B**. Hors de la zone ciblée, les deux précurseurs sont isolés par la barrière de PFC que constitue l'encapsulation en microgouttes.

[45] Pour plus d'informations sur l'effet EPR dans le cadre de la délivrance de produits thérapeutiques, voir notamment : (a) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271-284.; (b) Maeda, H. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 138-144.

Une telle stratégie implique donc de devoir générer spécifiquement un produit actif sur un lieu déterminé à partir de précurseurs. Cela signifie qu'en premier lieu il faut être capable de contrôler spatio-temporellement une réaction chimique spontanée *via* l'encapsulation des différents partenaires réactionnels dans des microgouttes. Nous allons dans un premier temps reporter les méthodes déjà décrites pour obtenir un tel contrôle spatio-temporel, puis nous décrirons les résultats que nous avons obtenus grâce à notre stratégie combinant le largage par ultrasons et les gouttes de perfluorocarbone liquide contenant une substance chimique.

I.3. Contrôle spatio-temporel d'une réaction chimique

I.3.1 Généralités

Depuis plusieurs années, le développement de méthodes permettant un contrôle spatial et/ou temporel de réactions chimiques s'est intensifié. Un tel contrôle permet de nombreuses applications, que ce soit dans le domaine de la synthèse organique ou de la biologie. La fonctionnalisation de surfaces selon des motifs précis est l'un de ces domaines d'application. L'étude de la biologie du développement, par le fait de marquer spécifiquement des cellules ou des organismes vivants fait également partie des domaines où un contrôle spatio-temporel des événements est nécessaire. Nous avons par ailleurs évoqué précédemment le fait que les méthodes de délivrance pourraient être améliorées par la capacité à générer des drogues *in situ* par une réaction chimique ou enzymatique contrôlée. Différentes stratégies ont ainsi été développées afin de contrôler spatio-temporellement une réaction chimique. Pour une grande majorité d'entre elles, il s'agit d'exploiter des caractéristiques intrinsèques au système chimique choisi afin de prédire où et/ou quand une réaction sera initiée. Dans ce cadre, nous nous attarderons en particulier sur les méthodes de photo-activation de réactions chimiques, catalysées ou non. D'autres stratégies reposent sur l'utilisation d'un stimulus externe pour contrôler à distance le largage de composés préalablement encapsulés, et ainsi initier la réaction chimique de façon contrôlée. Nous décrirons ainsi plusieurs exemples d'encapsulation en vue de contrôler l'initiation d'une réaction.

I.3.2 Contrôle par photo-activation à distance de la réaction

I.3.2.1 Introduction

Parmi les sources d'activation à distance d'une réaction chimique, la lumière est sans nul doute la plus utilisée. Un nombre croissant de systèmes chimiques photo-activables ont ainsi été rapportés dans la littérature,[46] et parmi ces systèmes, un intérêt particulier a été porté aux réactions dites de « chimie click ».[47] Cependant, bien qu'en principe toutes les réactions photo-induites peuvent être contrôlées temporellement (en contrôlant le début de l'illumination du système) et spatialement, nous examinerons plus particulièrement les systèmes chimiques photo-activables ayant été développés dans la perspective d'un contrôle spatio-temporel.

[46] Göstl, R.; Senf, A.; Hecht, S. Chem. Soc. Rev. 2014, 43, 1982-1996.
[47] Tasdelen, M. A.; Yagci. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938.

I.3.2.2 Photo-activation de réactions de cycloaddition non catalysées

En 2009, Poloukhtine *et al.* ont mis en avant l'idée que la chimie « click » photo-activée pouvait être utilisée pour attacher des marqueurs chimiques sur des cellules vivantes de façon temporellement contrôlée.[48] Ils ont défendu l'idée selon laquelle un contrôle temporel de l'initiation de la réaction permettrait d'accéder à une meilleure homogénéité des réactifs sur la surface à traiter, en l'occurrence dans leur cas à la surface de cellules adhérentes. Leur stratégie est basée sur la décarboxylation photo-induite de cyclopropénones en cyclooctynes permettant d'initier dans la foulée une réaction de cycloaddition spontanée avec un azoture par relâchement de la tension de cycle du cyclooctyne (Schéma I.1).

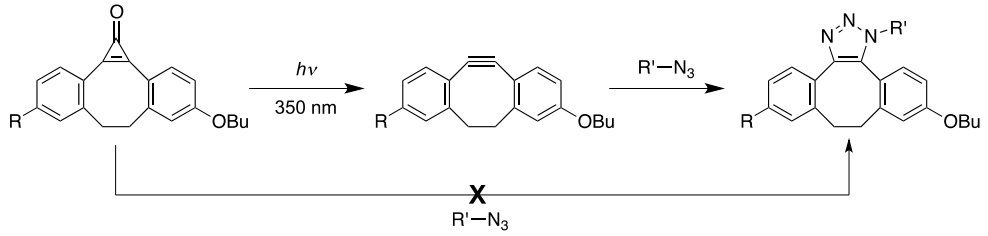


Schéma I.1. Décarboxylation photo-induite de cyclopropénones en cyclooctynes suivie d'une cycloaddition.

Cependant, la résolution spatiale de ce type de processus pourrait être dégradée par la diffusion possible des réactifs dans le milieu. En particulier, la décarboxylation photo-induite conduit au dérivé cyclooctyne qui peut tout à fait diffuser et ainsi amoindrir la précision spatiale du contrôle. Afin de contourner ce problème, la même équipe a proposé d'atteindre une meilleure résolution spatiale de l'activation chimique par l'immobilisation de la cyclopropénone sur une surface composée de polymères en brosse (Schéma I.2).[49] Ainsi, en faisant réagir les alcynes obtenus par photo-activation des cyclopropénones avec des dérivés d'azoture fluorescents, des surfaces fonctionnalisées par des dérivés fluorescents ont été obtenues de manière spatialement contrôlée.

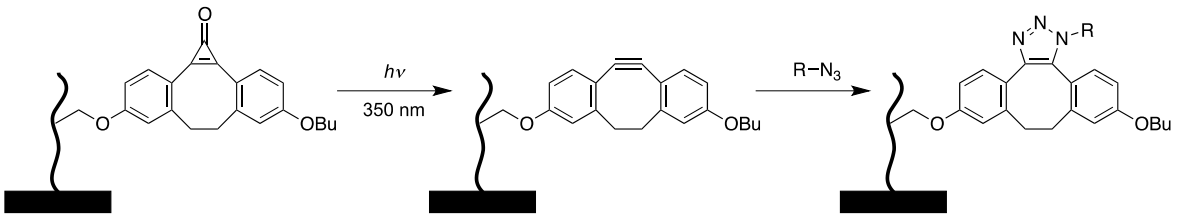


Schéma I.2. Décarboxylation de cyclopropénones suppportées suivie d'une cycloaddition.

[48] Poloukhtine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.

[49] Orski, S. V.; Poloukhtine, A. A.; Arumugam, S.; Mao, L.; Popik, V. V.; Locklin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024-11026.

Dans la même logique, Pauloehrl *et al*. ont développé une méthode de fonctionnalisation de surface en utilisant, pour leur part, une réaction de Diels-Alder photo-activée.[50] Leur stratégie repose sur la photoisomérisation de *o*-methylphényl cétones ou *o*-methylphényl aldéhydes en hydroxyl-*o*-quinodiméthanes. Ces derniers vont alors jouer le rôle de diène et subir une cycloaddition en présence d'un diénophile (Schéma I.3). De la même façon que pour la photo-activation des cyclopropénones où aucun catalyseur n'est nécessaire, aucun sous-produit n'est libéré dans le milieu réactionnel. Le contrôle temporel de la réaction reste inhérent à son caractère photo-induit, et le contrôle spatial est rendu possible par la fonctionnalisation des surfaces à traiter avec l'espèce photo-sensible.

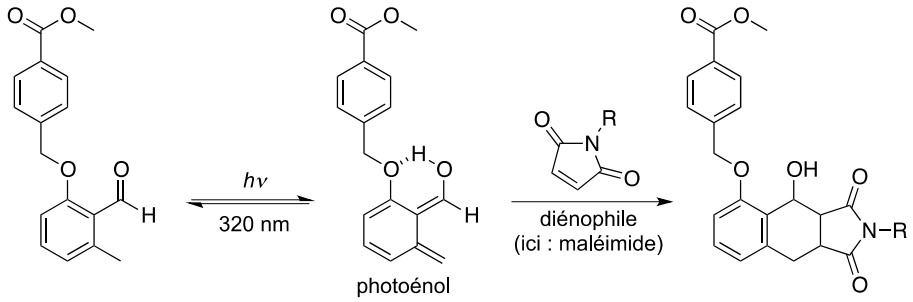


Schéma I.3. Isomérisation photo-induite suivie d'une cycloaddition de Diels-Alder avec un diénophile.

I.3.2.3 Photo-activation de réactions « click » catalysées au cuivre

Avec le même objectif de pouvoir contrôler spatio-temporellement la fonctionnalisation de surfaces, le groupe de Bowman a publié en 2011 une étude portant également sur la photo-activation d'une réaction de chimie « click ».[51] Cependant, contrairement aux études citées précédemment, il ne s'agit pas dans leur cas de chimie « click » non-catalysée mais de la réaction la plus connue en chimie « click », c'est à dire la « cycloaddition de Huisgen » et correspondant à la cycloaddition entre un azoture et un alcyne catalysée au cuivre (CuAAC). La catalyse est l'élément essentiel qui permet le contrôle spatio-temporel de la cycloaddition, puisque c'est la réduction photo-induite du Cu(II) en Cu(I) (l'espèce active) qui permet d'initier la réaction (Schéma I.4). En effet, selon les auteurs, la synthèse des substrats de chimie « click » non-catalysée (à savoir en général des alcynes tendus dans des cycles à 7 ou 8 chaînons), étant souvent fastidieuse, cela limite les applications de ces composés. Dans leur cas, le contrôle spatio-temporel de la réaction de CuACC, très simple à mettre en œuvre et largement utilisée dans de

[50] Pauloehrl, T.; Delaittre, G.; Winkler, V.; Welle, A.; Bruns, M.; Börner, H. G.; Greiner, A. M.; Bastmeyer, M.; Barner-Kowollik, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071-1074.

[51] Adzima, B. J.; Tao, Y.; Kloxin, C. J.; DeForest, C. A.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Nature Chemistry* **2011**, *3*, 256-259.

nombreuses applications, leur permet d'accéder à la formation localisée d'hydrogels ainsi qu'à la création de motifs fluorescents sur ces mêmes hydrogels.

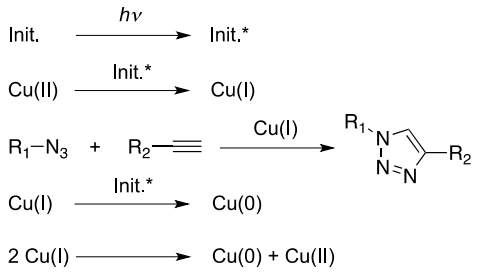


Schéma I.4. Stratégie suivie par le groupe de Bowman pour la photo-activation d'une réaction de CuAAC.

Les applications d'une telle méthode sont nombreuses, allant de la fonctionnalisation de surfaces diverses à l'utilisation dans des systèmes biologiques. Cependant, dans ce dernier cas, les conditions expérimentales ne sont pas toujours cytocompatibles, en particulier les conditions d'irradiation lumineuse, la nature des photo-initiateurs et des différents catalyseurs au cuivre qui sont autant d'obstacles à des applications biologiques. Enfin, la résolution spatiale peut être amoindrie par le fait que les espèces impliquées peuvent diffuser dans le milieu réactionnel. Cependant, ce phénomène de diffusion peut être éliminé en immobilisant l'un des partenaires réactionnels sur une surface avant de l'activer. Dans cette perspective, une stratégie similaire exploitant la photoréduction *in situ* du cuivre catalysant la cycloaddition entre un alcyne et un azoture a été suivie par Chen *et al*.[52] Ainsi, dans leur cas, un contrôle spatial complet a pu être obtenu par la fonctionnalisation d'une surface de polymères avec l'azoture. De la même manière que dans les travaux cités précédemment, Chen *et al*. ont réalisé le greffage de chaînes PEG tetraalcynes sur leur surface fonctionnalisée par la réduction photo-chimique localisée de leur catalyseur. Les espèces radicalaires ainsi générées peuvent alors entraîner la réticulation des chaînes de polymères en hydrogels. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour moduler l'épaisseur de ces hydrogels et y attacher des cellules de façon contrôlée sur ces surfaces.

I.3.2.4 Utilisation de composés photo-labiles

Toujours dans le but de photo-activer une réaction chimique à distance, une autre méthode basée sur l'utilisation de composés photo-labiles a été récemment développée. En effet, de tels composés peuvent être clivés de manière intramoléculaire sous l'effet d'une excitation lumineuse, ce qui procure un contrôle spatial sur l'initiation de la réaction.

[52] Chen, R. T.; Marchesan, S.; Evans, R. A.; Styan, K. E.; Such, G. K.; Postma, A.; McLean, K. M.; Muir, B. W.; Caruso, F. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 889-895.

Dans ce cadre, deux stratégies ont principalement été suivies. Ces deux stratégies sont basées sur la photo-activation de réactions d'addition de Michael sur des thiols ; réactions qui ont été particulièrement explorées ces dernières années.[53] En effet, contrairement aux réactions de type thiol-ène,[54] elles ne passent pas par un mécanisme radicalaire et ont ainsi une meilleure cytocompatibilité, notamment avec la perspective de former des gels 3D autour des cellules à étudier. Cependant, cette réaction d'addition de Michael sur des thiols n'étant *a priori* pas photo-initiée, il était donc nécessaire de la rendre photo-sensible afin d'être en mesure de contrôler spatio-temporellement l'initiation de cette réaction. Dans cette perspective, la première approche proposée par l'équipe de Bowman consiste à utiliser des amines photo-labiles comme catalyseurs.[55] Ces amines jouent alors le rôle de déclencheurs photo-sensibles de la réaction (Schéma I.5). Bowman et son équipe ont ainsi pu démontrer qu'une telle méthode pouvait être utilisée pour photo-induire la fonctionnalisation d'une surface, ainsi que pour contrôler cinétiquement la formation d'un réseau de polymère.

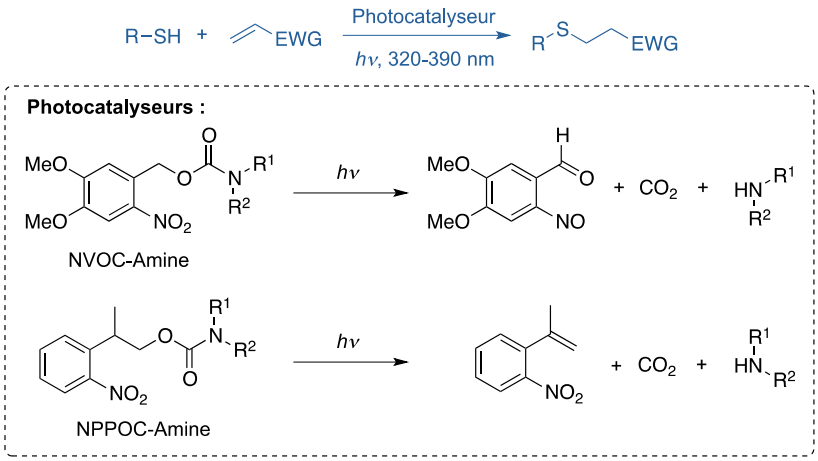


Schéma I.5. Stratégie d'utilisation d'amines photo-labiles comme catalyseurs de la réaction d'addition de Michael sur des thiols.

Une autre approche a été proposée par Liu *et al.* afin de construire des matrices tridimensionnelles pour héberger des cultures cellulaires.[56] Dans leur cas, des réactions de réticulation de type thio-Michael sont ainsi contrôlées de manière spatiale et temporelle pour permettre l'élaboration de matrices 3D. Comme cela a été montré au cours des paragraphes précédents, la lumière est en effet un moyen de choix pour décider *où* et *quand* une réaction chimique peut avoir lieu, mais l'étude de Liu *et al.* démontre qu'en outre il est également possible de contrôler la rigidité du gel par des modulations de l'intensité lumineuse incidente. Contrairement à l'équipe de Bowman, la lumière n'est pas utilisée ici pour libérer la base

[53] Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 724-744.

[54] DeForest, C. A.; Polizzotti, B. D.; Anseth, K, S. *Nature Materials* **2009**, *8*, 659-664.

[55] Xi, W.; Peng, H.; Aguirre-Soto, A.; Kloxin, C. J.; Stansbury, J. W.; Bowman, C. N. *Macromolecules* **2014**, *47*, 6159-6165.

[56] Liu, Z.; Lin, Q.; Sun, Y.; Liu, T.; Bao, C.; Li, F.; Zhu, L. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3912-3917.

catalysant la réaction, mais bien pour activer directement le réactif soufré. Ce dernier étant incorporé dans une structure macrocyclique conjointement avec un dérivé de la coumarine, il est indisponible pour subir une addition de type Michael. Le photo-clivage intramoléculaire de cette structure macrocyclique libère le thiol et permet ainsi la réaction avec un partenaire polymérique supportant un groupement maléimide en bout de chaîne (Schéma I.6). Les auteurs espèrent ainsi pouvoir appliquer cette méthode à de la « bio-impression » 3D ou encore à des techniques de médecine régénérative.

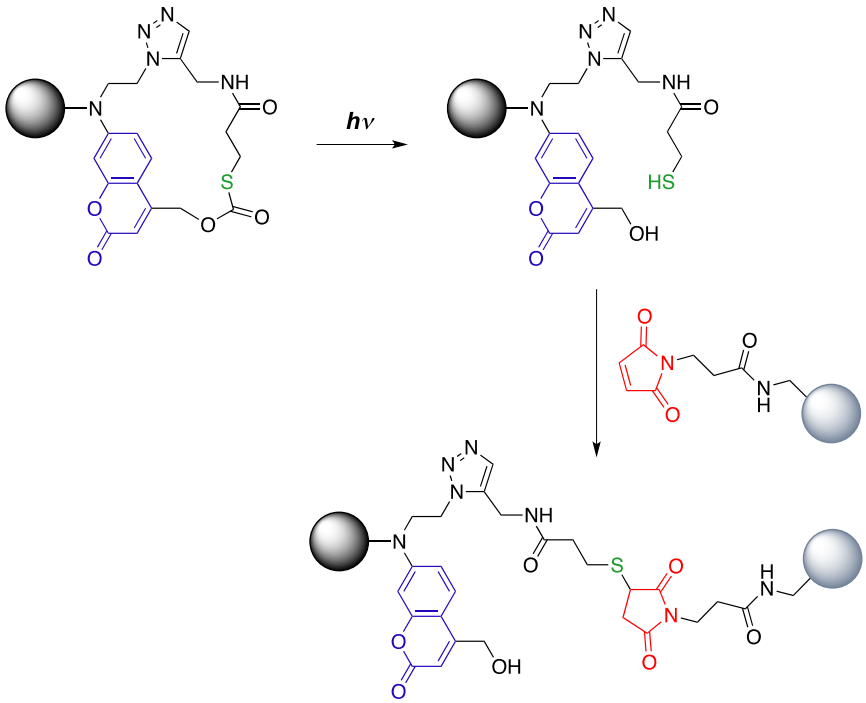


Schéma I.6. Photoclivage intramoléculaire d'une structure macrocyclique libérant une fonction thiol qui est alors en mesure de réagir avec un partenaire maléimide.

I.3.3 Contrôle par encapsulation et largage des réactifs

I.3.3.1 Introduction

L'activation à distance de composés dont la réactivité a été préalablement inhibée, est, comme nous venons de le voir, l'une des stratégies privilégiées pour contrôler de manière spatio-temporelle des réactions chimiques. D'autres stratégies reposent sur l'utilisation d'un stimulus externe pour contrôler à distance le largage de composés actifs mais préalablement isolés du milieu extérieur, et ainsi d'initier la réaction chimique de façon contrôlée. Contrairement à l'activation photo-chimique où les réactifs sont répartis de façon homogène, le largage à distance pourrait permettre de générer des sources ponctuelles de réactifs et ainsi créer des gradients chimiques, et certains produits pourraient alors être synthétisés en libérant localement de fortes concentrations de réactifs. La création de structures chimiques hétérogènes

dans l'espace tridimensionnel pourrait également trouver une application dans l'étude de processus inter ou intracellulaires. De nombreuses méthodes de confinement et de largage de substrats ont été développées,[57] pour notre part, nous nous attarderons plus particulièrement sur celles permettant d'initier une réaction chimique de manière spatio-temporellement contrôlée.

I.3.3.2 Utilisation de capsules métalliques combinées à des champs radio-fréquence

Parmi toutes les stratégies d'encapsulation possibles, le groupe de Gracias a développé, à l'aide de techniques de photo-lithographie, des capsules métalliques (fabriquées à partir d'alliages de Nickel) de différentes formes et de différentes tailles, picolitrique à nanolitrique.[58] Une ou plusieurs faces de ces capsules a été rendue poreuse, et comme la taille typique de cette porosité peut être modulée, toute une gamme de profils de largage pour les composés encapsulés peut être créée (Figure I.12). Ainsi, un contrôle temporel peut être obtenu dans une certaine mesure en jouant sur la vitesse de largage grâce à la modulation de la taille des pores, à la nature des solvants et à la température du milieu, ainsi qu'à la nature du gel ou du polymère au sein desquels les substrats sont immobilisés à l'intérieur des capsules. Quant au contrôle spatial, il est rendu possible par l'utilisation de champs magnétiques permettant de guider à distance ces micro-conteneurs dans l'espace (Figure I.13). Il faut souligner qu'un champ magnétique est difficile à focaliser à distance. Un tel contrôle n'est donc possible qu'en se plaçant à des distances très faibles des capsules, ce qui est difficile à réaliser en pratique.

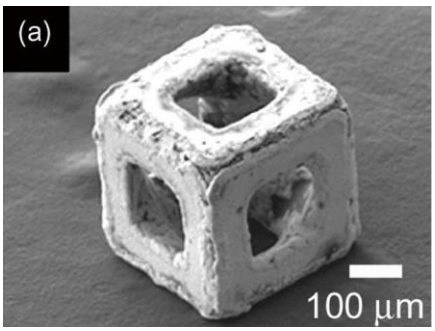


Figure I.12. Image en microscopie électronique à balayage d'une capsule métallique possédant une porosité isotrope.[60]

L'utilisation de champs radiofréquence a permis une amélioration significative du contrôle temporel : en effet, ces champs permettent de chauffer à distance les micro-capsules par effet Joule et ainsi d'engendrer le ramollissement ou l'effondrement d'un gel préalablement encapsulé et donc de relarguer

[57] Kalinin, Y. V.; Murali, A.; Gracias, D. H. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 9707-9726.

[58] Leong, T.; Gu, Z.; Koh, T.; Gracias, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11336-11337.

des composés immobilisés dans ces gels.[59,60] Des aiguilles magnétiques peuvent être utilisées pour guider les capsules dans le but d'obtenir un bon contrôle spatial du largage.

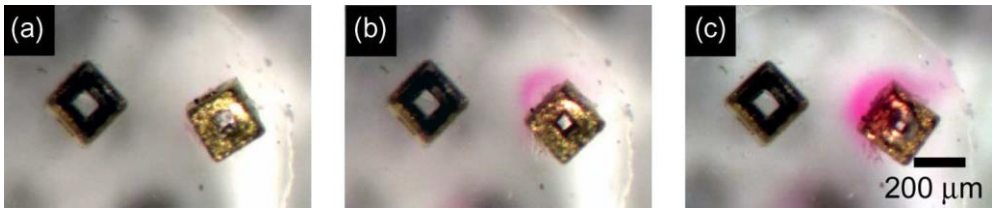


Figure I.13. (a) Deux capsules de porosité isotrope contenant respectivement de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de potassium KOH. (b) Les composés sont relargués sous l'effet d'un champ radiofréquence (4 W). La couleur rose est caractéristique de la réaction entre la phénolphtaléine et le KOH. (c) KOH diffuse plus vite que la phénolphtaléine, la réaction se produit donc plus près de la capsule de phénolphtaléine.[60]

Les auteurs sont convaincus qu'une telle méthode d'encapsulation et de largage contrôlé pourrait être utilisée afin de transporter des composés chimiques dans des zones difficiles d'accès, ou encore de synthétiser des composés instables directement sur un site d'intérêt. Cependant, une des limites de cette méthode réside dans l'encapsulation de réactifs qui doivent être préalablement immobilisés sur des gels, et non pas directement des réactifs liquides ou en solution. Encapsuler des réactifs liquides supposerait cependant de développer un nouveau type de capsule permettant le contrôle de l'ouverture et la fermeture des pores.

I.3.3.3 Cages d'or photo-sensibles

Plus récemment, Yavuz *et al.* ont décrit la conception de nanocages d'or photo-sensibles pour l'encapsulation et le largage spatio-temporellement contrôlé de composés chimiques.[61] Bien que l'intérêt porté aux cages d'or dans le cadre d'applications biomédicales soit déjà bien établi, [62] Yavuz *et al*. proposent une nouvelle stratégie basée sur la conception de nanocubes d'or poreux recouverts d'une couche de polymère poly(*N*-isopropylacrylamide (pNIPAAm) capable de changer de conformation en réponse à un stimulus thermique de faible amplitude (Figure I.14).

[59] Ye, H.; Randall, C. L.; Leong, T. G.; Slanac, D. A.; Call, E. K.; Gracias, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4991-4994.

[60] Park, J-R.; Slanac, D. A.; Leong, T. G.; Ye, H.; Nelson, D. B.; Gracias, D. H. Journal of Microelectromechanical Systems 2008, 17, 265-271.

[61] Yavuz, M. S.; Cheng, Y.; Chen, J.; Cobley, C. M.; Zhang, Q.; Rycenga, M.; Xie, J.; Kim, C.; Song, K. H.; Schwartz, A. G.; Wang, L. V.; Xia, Y. *Nature Materials* **2009**, *8*, 935-939.

[62] Skrabalak, S. E.; Chen, J.; Sun, Y.; Lu, X.; Au, L.; Cobley, C. M.; Xia, Y. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1587-1595.

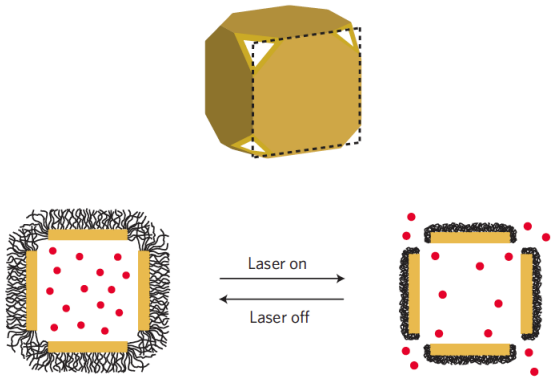


Figure I.14. Illustration du principe de largage contrôlé du contenu des nanocages d'or (figure extraite de la référence 62).

Ainsi, sous l'effet d'une exposition lumineuse, les cages d'or dissipent de la chaleur dans le milieu par effet photo-thermique. Cette augmentation de température autour de la nanocage suffit à provoquer l'effondrement des chaînes de polymères, exposant ainsi les pores de la cage et donc le largage des composés encapsulés. A l'inverse, l'arrêt de l'excitation lumineuse entraîne la relaxation du polymère dans sa conformation allongée et ainsi la refermeture des pores et l'arrêt du largage.

Ce système réversible a été utilisé pour libérer de façon contrôlée des composés fluorescents et des agents anticancéreux comme la doxorubicine. Cependant, à notre connaissance, il n'a pas été appliqué au contrôle de réactions chimiques spontanées bien que ce système soit très prometteur en la matière.

I.3.3.4 Microgouttes

Nous avons vu que des capsules métalliques de différentes natures pouvaient être utilisées afin d'immobiliser des réactifs et de les larguer de façon spatio-temporellement contrôlée. Cependant, le caractère métallique de ces structures peut être problématique pour certaines applications. Il existe un autre type de capsules, plus souples et faciles à fabriquer, que sont les microgouttes. En effet, les techniques de microfluidique permettent aujourd'hui de générer et de manipuler facilement des gouttes de taille micrométrique. En particulier, il est possible de trier, de diviser ou de fusionner des gouttes en temps réel.[63,64] Parmi ces opérations élémentaires, cette dernière permet au manipulateur de contrôler le mélange du contenu des gouttes fusionnées,[65] que ce soit spatialement, mais également temporellement. Dans ce cadre, on peut distinguer deux stratégies : la fusion « passive » de deux gouttes qui est obtenue par un choix astucieux de la géométrie du système (rétrécissements des canaux en particulier) mais qui

[63] Teh, S-Y.; Lin, R.; Hung, L-H.; Lee, A. P. *Lab Chip* **2008**, *8*, 198-220.

[64] Gu, H.; Duits, M. H. G.; Mugele, F. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2572-2597.

[65] Pour des applications en synthèse, voir : Theberge, A. B.; Mayot, E.; El Harrak, A.; Kleinschmidt, F.; Huck, W. T. S.; Griffiths, A. D. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1320-1326.

n'assure pas un contrôle spatial ou temporel flexible de la fusion. La fusion « active » quant à elle requiert en général l'utilisation d'électrodes, mais permet, comme le décrivent Tan *et al.*, de contrôler précisément le moment où les gouttes fusionnent, et ainsi de déterminer exactement le début d'une réaction chimique.[66] Un tel système permet de contrôler précisément la quantité de réactifs en jeu, puisque le volume des gouttes est déterminé par la géométrie du canal de production de celles-ci et par les caractéristiques de l'écoulement (les débits en jeu notamment). Cependant, bien que Tan *et al.* aient développé un système de pinces optiques afin de déplacer les gouttes pour les mettre en contact, obtenant ainsi un contrôle spatial modéré, l'initiation de la réaction reste limitée à une zone précise de ces systèmes microfluidiques conçus avec des électrodes intégrées. La microfluidique en gouttes se positionne donc comme une stratégie prometteuse pour le contrôle de réactions chimiques, notamment car elle rend possible la fabrication de micro-réacteurs de taille très contrôlée que l'on peut manipuler par des opérations simples. Cependant, les techniques actuelles souffrent d'un manque de flexibilité afin de contrôler à la fois temporellement mais également spatialement l'initiation d'une réaction.

Afin de se libérer des contraintes liées à la manipulation en canal microfluidique, et surtout de pouvoir envisager des applications biologiques, on peut envisager de coupler l'utilisation de microgouttes avec celle d'un stimulus externe permettant de déstabiliser leur structure et de libérer le produit encapsulé. Fabiilli *et al.* ont ainsi proposé d'irradier des microgouttes de PFC avec des ultrasons pour libérer de manière spatio-temporellement contrôlée des facteurs de croissance, et initier une régénération cellulaire contrôlée autour de structure poreuses biodégradables.[67] Une telle étude ouvre ainsi la voie à un contrôle à distance de réactions chimiques grâce à la vaporisation acoustique de microgouttes de PFC.

I.3.3.5 Conclusion

Nous avons pu constater au cours de cette recherche bibliographique que de nombreuses méthodes ont été proposées dans le but de contrôler spatialement et temporellement des réactions chimiques. Dans la plupart des cas, la réaction est déclenchée à distance à l'aide de stimuli externes tels que la lumière, les ondes radiofréquence ou magnétiques. Chacune des stratégies présentées possède des avantages et des inconvénients, et participe à l'ouverture de nouvelles voies pour réaliser des études chimiques et biochimiques : mesures de cinétiques réactionnelles précédemment impossibles à calculer, nouvelles méthodes de fonctionnalisation de surface ou amélioration de la structure de certains matériaux, meilleur contrôle de la biologie moléculaire cellulaire et de la croissance cellulaire…

[66] Tan, W-H.; Takeuchi, S. *Lab Chip* **2006**, *6*, 757-763.

[67] Fabiilli, M. L.; Wilson, C. G.; Padilla, F.; Martin-Saavedra, F. M.; Fowlkes, J. B.; Franceschi, R. T. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9*, 7399-7409.

Pour notre part, nous avons proposé une nouvelle stratégie de contrôle spatio-temporel de réactions chimiques en utilisant des microgouttelettes de perfluorocarbone afin de libérer leur contenu à distance sous l'effet d'ultrasons cliniques.

I.3.4 Résultats et discussion

I.3.4.1 Introduction

Comme nous l'avons abordé à la fin du Paragraphe **I.1**, une des limites de toutes les techniques de délivrance est aujourd'hui le risque de largage non-spécifique des produits encapsulés, en général hautement toxiques. Pour prévenir ce largage non-spécifique, nous avons envisagé de développer une méthode pour générer directement le composé actif à partir de précurseurs peu ou non-toxiques sur le site à traiter, par exemple une tumeur. Ainsi, les composés circulants ne présentent pas de toxicité en cas de largage non-spécifique. Une telle stratégie implique une activation chimique de ce(s) précurseur(s) dans la tumeur elle-même, ce qui signifie que le manipulateur doit être capable de contrôler à distance de manière spatiale et temporelle cette activation. Nous avons choisi de transporter les produits jusqu'aux zones d'intérêt à l'aide d'une double émulsion d'eau dans le perfluorocarbone dans l'eau (W/PFC/W) sous forme de microgouttes de 4 à 10 µm de diamètre développées par les équipes de P. Tabeling et M. Tanter. Ces gouttes sont donc majoritairement composées d'une matrice de perfluorocarbone (perfluorohexane et/ou perfluoropentane), que l'on est capable de vaporiser à l'aide d'ultrasons cliniques focalisés, qui ont pour rôle de détruire la structure de la goutte et permettre le largage des produits encapsulés. Les ultrasons sont un outil de choix pour contrôler le largage et donc la mise en contact des produits encapsulés notamment en raison de leur capacité à garder leur cohérence sur une longue distance, assurant ainsi une bonne profondeur de pénétration dans les tissus. De plus, les ultrasons ne sont ni invasifs, ni destructifs envers les tissus traversés. Afin de démontrer la faisabilité de notre stratégie, dans un premier temps, nous avons essayé de montrer notre capacité à contrôler spatio-temporellement et à distance une réaction chimique modèle à l'aide des gouttes décrites précédemment et à l'aide d'ultrasons focalisés.

I.3.4.2 Fabrication des microgouttes de perfluorocarbone

Les microgouttes de perfluorocarbone ont pour structure une double émulsion d'eau ou de DMSO dans le perfluorohexane dans l'eau ou dans le DMSO, sous forme de gouttes d'environ 4 à 10 µm (Figure I.17). Ces microgouttes sont fabriquées en deux étapes. Dans un premier temps, il s'agit de réaliser une nanoémulsion dite « primaire », composée d'une solution d'eau ou de DMSO contenant les composés à encapsuler, dispersée dans une phase de perfluorohexane et stabilisée par un surfactant fluoré dérivé du

Krytox® commercial (Schéma I.7). L'acide carboxylique terminal de ce dernier est ainsi converti en sel d'ammonium par injection d'ammoniac gazeux dans le mélange réactionnel. En utilisant ces conditions, le surfactant obtenu possède de meilleures propriétés tensioactives que le produit commercial. Pour le Krytox commercial, tout comme dans le cas de son carboxylate d'ammonium, la concentration micellaire critique (CMC) dans le perfluorohexane a été estimée entre 0.5 et 1% w/v.[68]

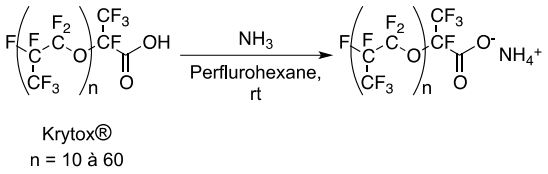


Schéma I.7. Synthèse du Krytox-NH_4^+ à partir de la molécule commerciale.

L'émulsion primaire nanométrique est obtenue grâce à une pointe sonique vibrant à 20 kHz (280 W) que l'on plonge dans le mélange biphasique composé de la solution d'eau ou de DMSO et de l'huile fluorée contenant le tensioactif (Figure I.15).

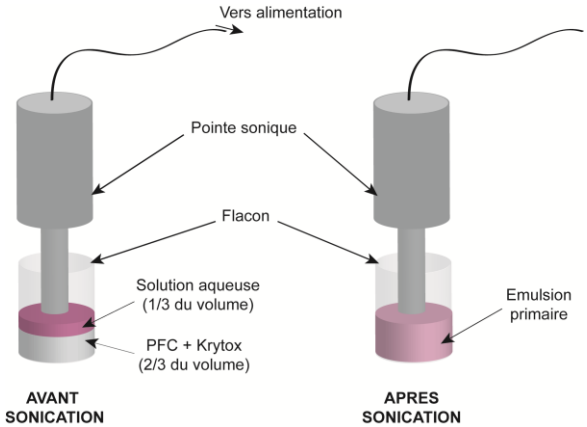


Figure I.15. Représentation schématique du montage expérimental d'émulsification.

On évalue ensuite la taille moyenne de ces émulsions par une technique de DLS (dynamic light scattering = diffusion dynamique de la lumière). Cette technique spectroscopique permet d'accéder à la taille de particules en suspension (si tant est que la taille de ces particules soit comprise entre 1 et 1000 nm environ) par l'étude du phénomène de diffusion d'une lumière laser incidente par les particules en question. Ces dernières étant soumises à un mouvement brownien dans l'échantillon étudié, la distance entre chaque diffuseur change au cours du temps. Une fonction dite « d'autocorrélation » est utilisée pour comparer à deux instants successifs le signal mesuré avec lui-même. En particulier, lorsque les particules sont de petite taille, elles ont tendance à se déplacer plus rapidement, et de manière aléatoire

[68] Travaux de Magalie Faivre, post-doc, 2009-2010.

et décorrélée. Le signal lumineux mesuré varie alors lui aussi rapidement, ce qui entraîne une décroissance rapide de la fonction d'autocorrélation. On obtient donc grâce à cette méthode une estimation de la distribution de taille des nanogouttes de solution aqueuse ou de DMSO dans le perfluorohexane (Figure I.16), et donc une estimation de la taille moyenne de l'émulsion primaire étudiée.

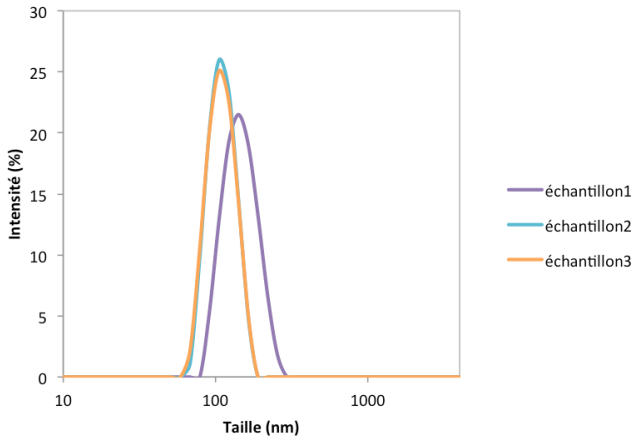


Figure I.16. Résultat typique d'une mesure de DLS sur plusieurs échantillons d'une même émulsion (ici solution de fluorescéine à 3% w/v + perfluorohexane/Krytox 3%).

Le vieillissement de ces émulsions primaires est également contrôlé pour chaque produit encapsulé, d'une part grâce à une évaluation visuelle de l'homogénéité de l'émulsion (démixion des phases, apparition de zones non homogènes, etc…), d'autre part grâce à un suivi de la taille de l'émulsion au cours du temps en utilisant une fois encore la technique de DLS. La concentration en tensioactif fluoré dans la phase perfluorocarbonée et celle du produit à encapsuler dans la phase interne peuvent alors être modulées afin d'obtenir une émulsion primaire la plus stable possible dans le temps.

L'émulsion « primaire » nanométrique est ensuite elle-même encapsulée sous forme de gouttes de taille micrométrique (taille typiquement comprise entre 4 et 10 µm) dans le DMSO (Figure I.17).

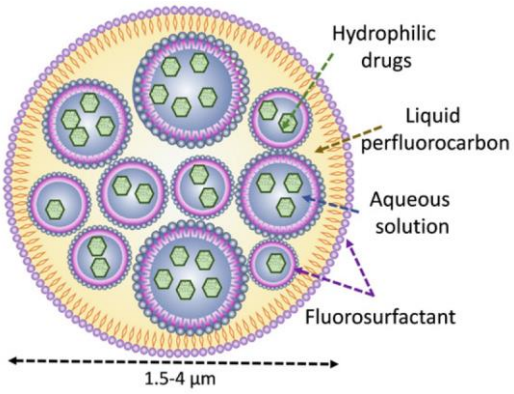


Figure I.17. Schéma d'une double émulsion d'eau dans le perfluorocarbone dans l'eau (figure extraite de la référence 5).

Parmi les techniques les plus utilisées en microfluidique pour produire des gouttes monodisperses,[69] on peut citer notamment les jonctions T ou Y,[70] les méthodes dites de « flow-focusing », ou encore les systèmes de « co-flow ».[71] Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser un système microfluidique basé sur un système de « step-emulsifiers » parallélisés.[72] Dans le cadre de la méthode de production de gouttes dite « à la marche », des gouttes d'émulsion primaire sont générées le long d'une série de canaux peu profonds débouchant eux-mêmes dans un autre canal beaucoup plus profond (Figure I.18**.d**).[73,74] Notre système de production possède deux entrées et une sortie (Figure I.18**.a**). L'une des entrées permet d'injecter l'émulsion primaire nanométrique obtenue par sonication, l'autre la phase externe aqueuse ou de DMSO, contenant un second tensioactif non fluoré, le Pluronic® F-68 (Schéma I.8), à une concentration de 3% w/v.

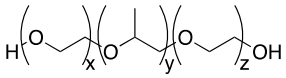


Schéma I.8. Structure du Pluronic® F-68. Ce copolymère tri-bloc est composé de deux blocs polyoxyéthylène (relativement hydrophiles) et d'un bloc polyoxypropylène (relativement hydrophobe).

[69] Baroud, C. N.; Gallaire, F.; Dangla, R. *Lab Chip* **2010**, *10*, 2032-2045.

[70] Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163-4166.

[71] Utada, A. S.; Lorenceau, E.; Link, D. R.; Kaplan, P. D.; Stone, H. A.; Weitz, D. A. *Science* **2005**, *308*, 537-541.

[72] Kobayashi, I.; Wada, Y.; Uemura, K.; Nakajima, M. *Microfluid. Nanofluid.* **2010**, *8*, 255-262.

[73] Li, Z.; Leshansky, A. M.; Pismen, L. M.; Tabeling, P. *Lab Chip* **2015**, *15*, 1023-1031.

[74] Mittal, N.; Cohen, C.; Bibette, J.; Bremond, N. *Phys. Fluids* **2014**, *26*, 082109.

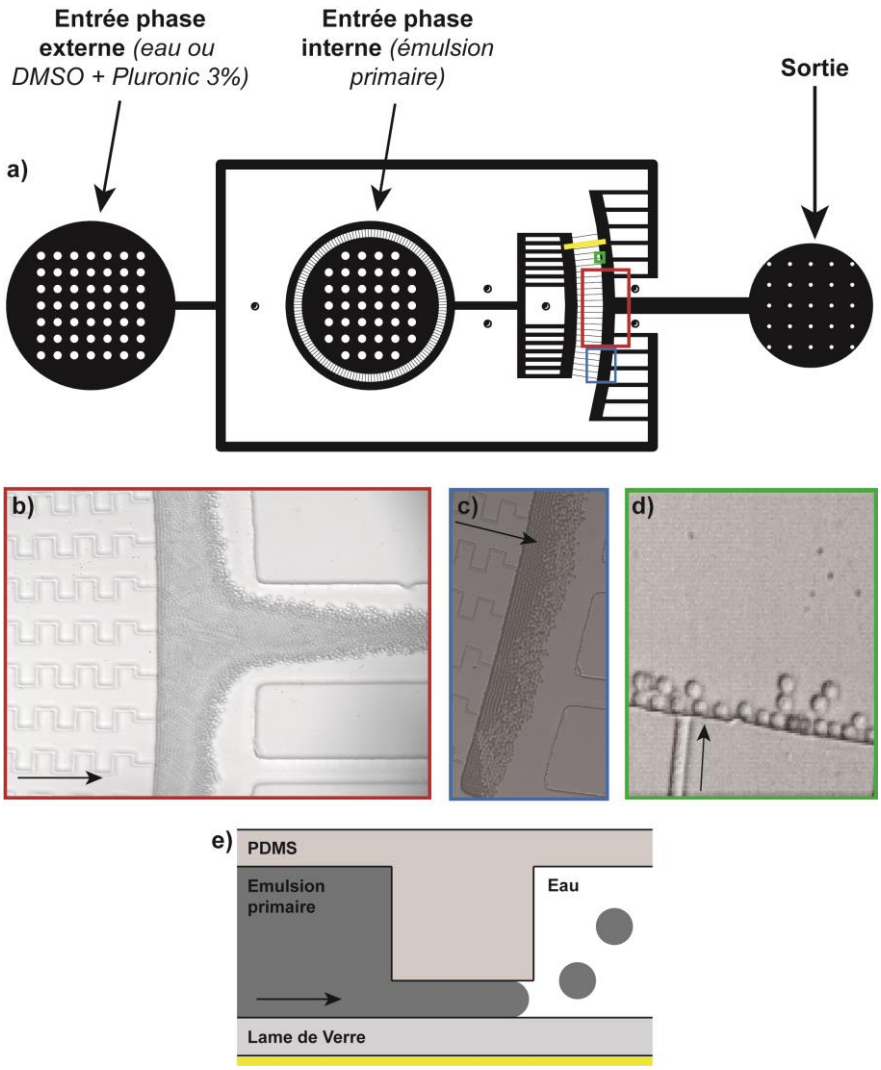


Figure I.18. (a) Structure du système microfluidique de production de gouttes d'émulsion de PFC. (b) Production de gouttes à haut débit. (c) Les gouttes produites sont monodisperses (elles forment des arrangements cristallins). (d) Evaluation de la taille des gouttes, sachant que la largeur du canal de production est de 5 µm. (e) Représentation schématique de la coupe du système au niveau des canaux de production. La flèche représente le sens du flux.

Les fluides sont injectés à l'aide d'un contrôleur de pression (MFCS-100, Fluigent), la pression appliquée à la phase interne d'émulsion primaire étant typiquement 10 fois plus élevée que celle appliquée à la phase externe d'eau ou de DMSO (de manière générale, $P_{émulsion} \approx 150\,mbar$ et $P_{phase\ externe} \approx 1500\,mbar$). L'émulsion primaire injectée est alors dirigée vers une série de 32 canaux parallèles d'une largeur de 5 µm et de hauteur environ égale à 1 µm, débouchant eux-mêmes dans un canal beaucoup plus profond (environ 15 µm) au niveau desquel les gouttes sont stockées.

A la sortie de la zone de production, les gouttes obtenues sont collectées pour une utilisation future, et conservées dans un surnageant contenant 3% w/v de pluronic. Un tel système parallélisé permet d'atteindre des débits de production élevés (jusqu'à 50 µL/h) de gouttes monodisperses, comme on peut l'observer sur la Figure I.18**.b** etFigure I.18**.c**. La taille des gouttes obtenues est indépendante de la

tension de surface, et dépend majoritairement de la géométrie des canaux de production. En effet, il a été montré[73] que la hauteur des microcanaux de production détermine l'ordre de grandeur de la taille des gouttes produites. A titre indicatif, le diamètre des gouttes correspond environ à 4 fois la hauteur des canaux de production. Dans notre cas, la hauteur de ces canaux est de 1 µm environ, et les gouttes produites ont donc un diamètre d'environ 5 µm (Figure I.18**.d**). L'un des avantages de cette méthode de production réside notamment dans le fait qu'en dessous d'un certain seuil, cette taille ne dépend pas de la valeur des pressions d'injection, comme cela est souligné notamment dans les travaux de Sugiura *et al.*[75] et de Kobayashi *et al.*[72] Il est donc possible avec de tels systèmes d'atteindre des débits de production relativement élevés pour des gouttes de cette taille.

I.3.4.3 Choix d'une réaction modèle

Dans le but d'obtenir dans un premier temps une preuve de concept du contrôle spatio-temporel d'une réaction chimique par l'encapsulation de réactifs dans les doubles émulsions de perfluorocarbone décrites précédemment, il nous fallait choisir une réaction modèle adaptée. En particulier, la réaction choisie devait être spontanée et rapide, et de préférence n'impliquer que les réactifs **A** et **B**, sans besoin d'adjuvant tel qu'un catalyseur pour ne pas complexifier le système :

$$\mathbf{A} + \mathbf{B} \longrightarrow \mathbf{A\text{-}B}$$

Dans ce contexte, l'étude d'une réaction de chimie « click » non-catalysée paraissait répondre particulièrement bien à ces différents critères. En effet, la chimie « click » est connue pour faire partie des réactions dites « bioorthogonales »,[76] à savoir des réactions remplissant les critères suivants :

Les réactions doivent :

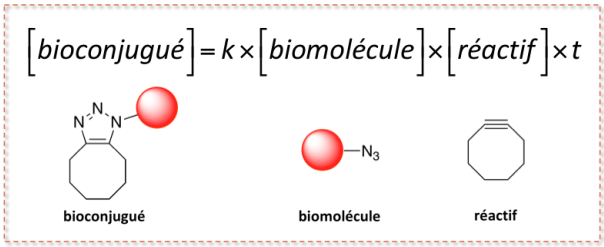
- être possibles en conditions physiologiques (eau, pH neutre),
- posséder des rendements et des constantes de vitesse élevés à de faibles concentrations en molécules,
- être réalisées avec des substrats n'interagissant pas avec les électrophiles et nucléophiles biologiques présents dans les cellules,

[75] Sugiura,S.; Nakajima, M.; Kumazawa,N.; Iwamoto, S.; Seki, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9405-9409.

[76] Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *PNAS* **2003**, *100*, 18846-18851.

- être réalisées avec des réactifs stables thermiquement et métaboliquement dans les cellules, et doivent être non-toxiques,
- et former des produits de réaction stables en conditions physiologiques (pour pouvoir procéder à des mesures).

Pour notre part, la nécessité de s'affranchir de la présence d'un catalyseur impliquait de se tourner vers la chimie « click » non-catalysée. Comme nous l'avons abordé dans le paragraphe **I.2.2**, l'absence de catalyse est en général rendue possible par l'utilisation d'alcynes où la triple liaison est incorporée dans un cycle à 7 ou 8 chaînons car l'alcyne est activé naturellement par la tension de cycle.[77] De nombreux composés ont été développés au cours des dix dernières années (Schéma I.9) et ont été utilisés notamment pour le marquage de biomolécules modifiées par un azoture[78] ou un autre dipôle adapté.[79,80] L'efficacité des cyclooctynes est en général caractérisée par la constante de vitesse associée à la réaction de cycloaddition avec un azoture. En combinant des effets électroniques grâce à la substitution des cycles aryles et des effets de tension de cycle (décroissance de l'angle imposé à l'alcyne), la réactivité de ces molécules peut être modulée.[81,82]



[77] Agard, N J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.

[78] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.

[79] McKay, C. S.; Moran, J.; Pezacki, J. P.; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 931-933.

[80] McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.

[81] Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.

[82] Schoenebeck, F.; Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.

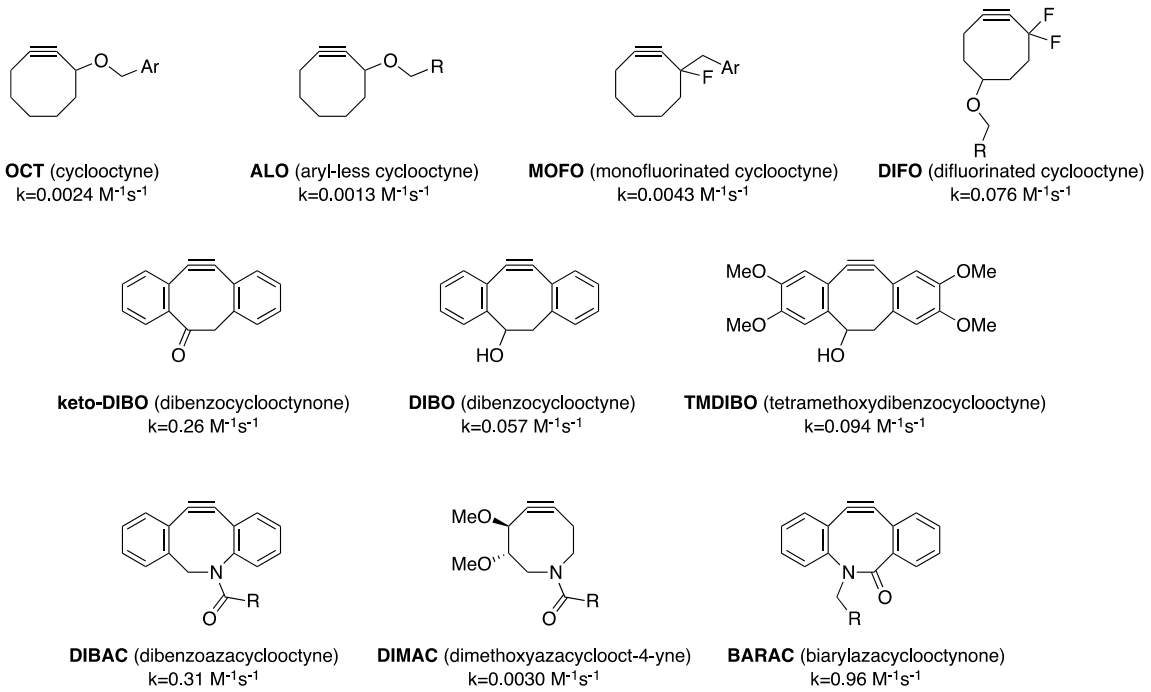


Schéma I.9. Exemples de cyclooctynes et constantes de vitesse du second ordre associées (réaction avec l'azoture de benzyle dans l'acétonitrile ou le méthanol).[78]

Dans ce cadre, en 2009, l'équipe de Leeper[83] a publié une étude concernant la synthèse et l'application en chimie « click » de nouveaux cyclooctynes, et en particulier du TMDIBO (tetramethoxydibenzocyclooctyne). Ce composé a retenu notre attention en raison de sa grande stabilité dans le temps à température ambiante et de sa synthèse relativement directe (8 étapes, bons rendements rapportés dans la littérature) comparés à d'autres composés similaires.

Signalons qu'il était essentiel de suivre l'évolution de la réaction à partir de l'événement de largage par microscopie. La manière la plus directe pour détecter la présence de composés chimiques par microscopie repose sur l'existence de propriétés de fluorescence. C'est pourquoi nous avons décidé de choisir le partenaire azoture du TMDIBO dans la réaction de « click » de façon à ce que la cycloaddition génère un produit hautement fluorescent à partir de réactifs peu ou pas fluorescents. Le choix de l'azoture s'est alors porté sur la 3-azido-7-hydroxycoumarine. En effet, ce composé avait été décrit en 2004 par Sivakumar *et al*. pour la mise au point d'une librairie de composés issus de cycloadditions entre le 3-azido-7-hydroxycoumarine et des dérivés d'alcyne provoquant une induction de fluorescence.[84] La coumarine s'est avérée être un bon candidat pour le choix du pro-fluorophore, notamment en raison de sa synthèse rapide et de ses propriétés de fluorescence qui sont facilement

[83] Stockmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci*. **2011**, *2*, 932-936.

[84] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4603−4606.

modulables par des substitutions en positions C3- et C7- du squelette de la coumarine.[85] En particuler, Sivakumar *et al*. ont mis en évidence que la formation du cycle triazole lors de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre des dérivés de 3-azidocoumarine et des alcynes entraînait une forte augmentation de l'intensité de fluorescence, en particulier lorsque la position C7- de ces composés était substituée par un groupement électrodonneur.

Finalement, les composés choisis pour notre réaction modèle sont les suivants :

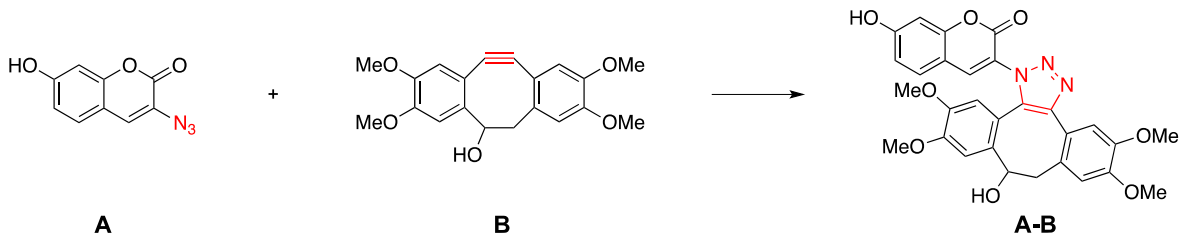


Schéma I.10. Réaction modèle choisie.

I.3.4.4 Synthèse

I.3.4.4.(1) Synthèse de l'azidocoumarine, A

Le squelette de la coumarine **A** a été obtenu à partir du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **1** et de la *N*-acétylglycine **2** (NaOAc, Ac_2O), puis la fonction azoture a été introduite par une diazotisation de l'amide **3** (HCl/EtOH, puis $NaNO_2$ et NaN_3). Une simple recristallisation a permis d'obtenir le produit **A** pur avec un rendement de 20% sur deux étapes.

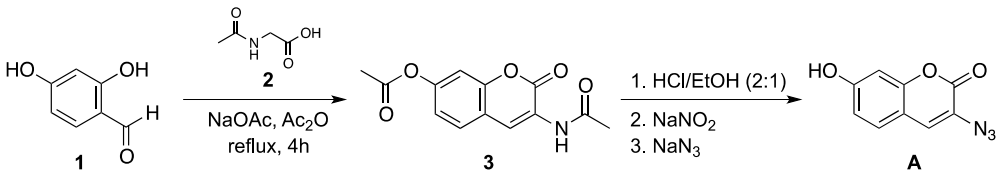


Schéma I.11. Synthèse de l'azido-coumarine **1**.

I.3.4.4.(2) Synthèse du cyclooctyne, B

La stratégie de synthèse décrite par l'équipe de Leeper repose sur trois étapes clés :

[85] Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bauerle, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4677-4680.

- la dimérisation d'un aldéhyde obtenu en deux étapes à partir de l'acide correspondant commercial, afin de générer un composé bicyclique ponté,
- l'ouverture du pont éther par une base forte,
- la dibromation de la double liaison endocyclique suivie d'une élimination en milieu basique pour mettre en place la triple liaison désirée.

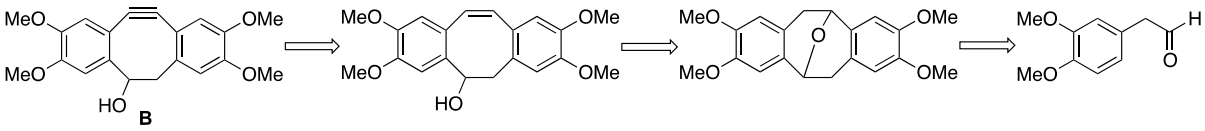


Schéma I.12. Analyse rétrosynthétique du TMDIBO.

La synthèse du composé **B** a été réalisée en huit étapes à partir de l'acide carboxylique **4** commercial. Dans un premier temps, après une réduction de **4** par du $LiAlH_4$, suivie d'une oxydation par le périodinane de Dess-Martin (DMP), l'aldéhyde **6** a été obtenu avec un rendement global de 69%. La dimérisation de ce dernier à l'aide de l'iodure de triméthylsilyle (TMSI) permet d'atteindre le composé tétracyclique **7** avec un rendement de 90%.

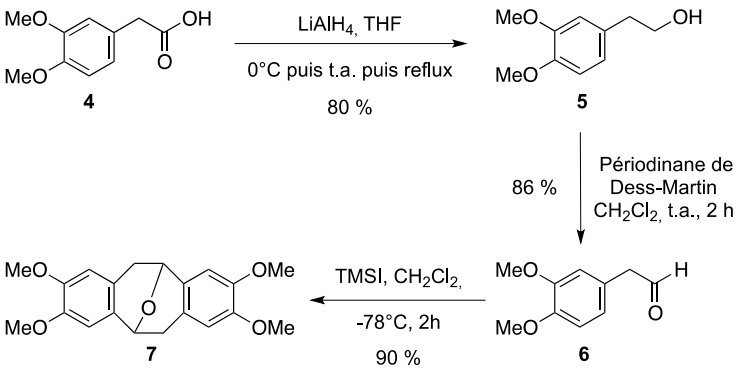


Schéma I.13. Synthèse du composé bicyclique **7**.

Il est important de noter le rôle prépondérant que joue le TMSI dans la dimérisation du 3,4-diméthoxyphényl acétaldéhyde. Cette dimérisation résulterait de la formation d'un iodoacétal qui subirait par la suite une double cyclisation de type Friedel-Crafts (Schéma I.14).[86] On peut également souligner que cette dimérisation est d'autant plus intéressante qu'elle ne nécessite aucune étape de purification : le produit a été obtenu après simple recristallisation dans le méthanol avec un rendement de 90%.

[86] Jung, M. E.; Mossman, A. B.; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.

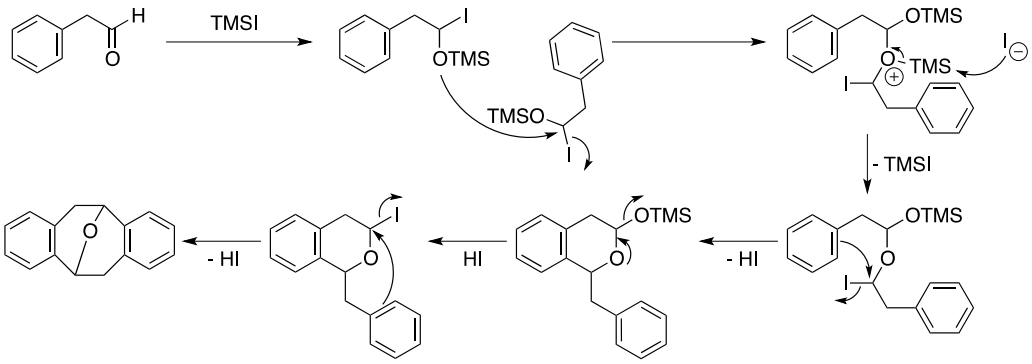
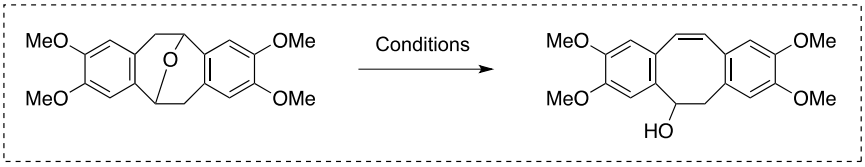


Schéma I.14. Mécanisme de dimérisation du 3,4-diméthoxyphényl acétaldéhyde avec le TMSI.

L'ouverture du cycle par le *n*-BuLi selon le protocole décrit dans les travaux de l'équipe de Leeper a été source de nombreux problèmes, en particulier l'apparent manque de réactivité de l'éther face au *n*-BuLi, quelle que soit la température d'addition (Tableau I.1, entrées 1 et 2), la force de la base (Tableau I.1, entrée 3) ou encore la propension du produit d'ouverture à se dégrader dans le milieu réactionnel (Tableau I.1, entrée 4). Pour parvenir à l'ouverture de l'éther avec un rendement satisfaisant, nous avons dû, d'une part s'assurer du caractère absolument anhydre du milieu réactionnel en utilisant une combinaison phénanthroline/MeLi et, d'autre part, activer l'éther à l'aide d'un acide de Lewis (TBSOTf, Tableau I.1, entrée 5). Cette stratégie s'est finalement avérée payante puisque le produit d'ouverture a été obtenu de manière quasi-quantitative.

Tableau I.1. Optimisation de l'ouverture de l'éther

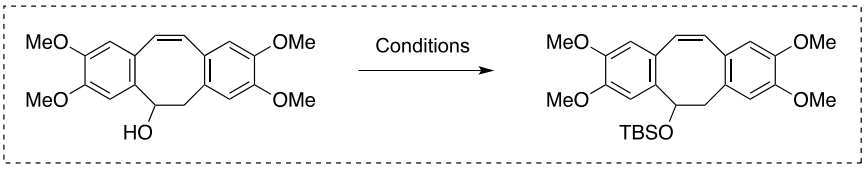


Entrée	Base (equiv)	Conditions	Rdt (%)
1	*n*-BuLi (2.05)	Add. à –10 °C, THF	--[a]
2	*n*-BuLi (1.1)	ta, THF	--[a]
3	*n*-BuLi (1.5)	Add. à 0 °C, THF, TBSCl (1.5 equiv)	--[a]
4	*n*-BuLi/*t*-BuOK (2)	–78 °C à ta, THF	--[a]
5	*n*-BuLi (2)	TBSOTf (1 equiv), phénanthroline/MeLi, THF	quant.

[a] La RMN du brut montre uniquement la présence du produit de départ.

L'étape de protection de l'alcool obtenu lors de l'ouverture du cycle, pourtant simple en apparence, a dû également faire l'objet d'un travail d'optimisation. En effet, quels que soient les temps de réaction (Tableau I.2, entrées 1 et 2) dans les conditions décrites dans la littérature (TBSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2), le rendement reste médiocre, notamment dû à la présence d'un produit inconnu dont la RMN laisse supposer qu'il s'agit d'un dimère du dibenzocyclooctène. Une autre condition classique de protection a été testée (TBSCl, pyridine), mais aucune conversion du produit de départ n'a été observée (Tableau I.2, entrée 3). Finalement, en modifiant légèrement les conditions opératoires (TBSCl et imidazole dans le DMF), il a été possible d'isoler l'alcool silylé avec un rendement de 69%.

Tableau I.2. Optimisation des conditions de protection de l'alcool



Entrée	Conditions	t (h)	Température	Solvant	Rdt (%)
1	TBSOTf, 2,6-lutidine	4	0 °C à ta	CH_2Cl_2	34[a]
2	TBSOTf, 2,6-lutidine	18	0 °C à ta	CH_2Cl_2	34[a]
3	TBSCl, pyridine, DMAP	36	ta	CH_2Cl_2	--
4	TBSCl, imidazole	18	ta	DMF	69

[a] Présence d'un produit non identifié, probablement un dimère.

Après l'ouverture du cycle (*n*-BuLi, TBSOTf), et la protection de la fonction hydroxyle obtenue sous forme d'éther silylé (TBSCl, DMF, imidazole), le composé **9** résultant est alors dibromé (Br_2, CH_2Cl_2, – 40 °C) puis engagé dans un traitement en milieu basique (*N*-méthylpipérazine, *t*-BuOK, THF) afin de générer le cyclooctyne **11** correspondant par double élimination des deux atomes de brome. Ce dernier composé a ensuite été déprotégé (TBAF, THF) pour donner le tetramethoxydibenzocyclooctyne (TMDIBO) **B** attendu avec un rendement de 68 % sur les trois dernières étapes et un rendement global sur l'ensemble de la synthèse de 30 % à partir de l'acide carboxylique **4**.

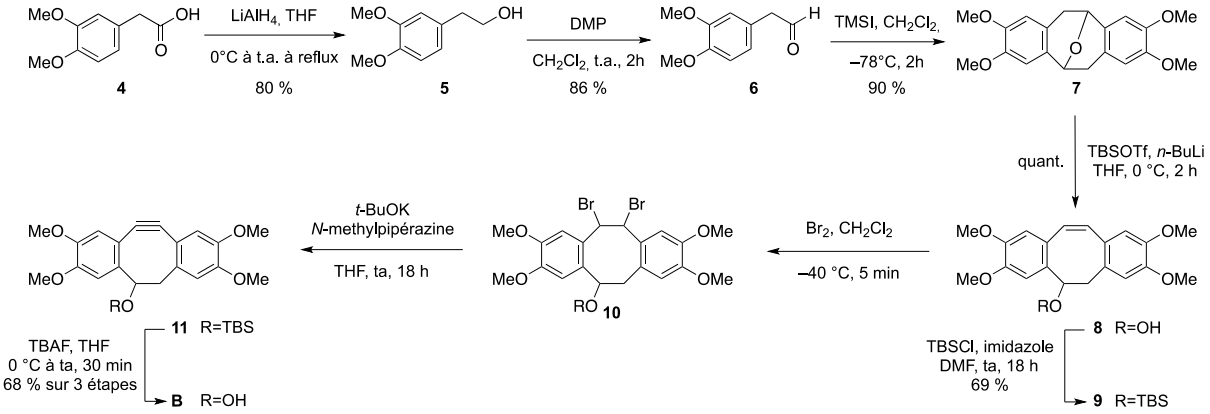


Schéma I.15. Synthèse du TMDIBO **B**.

I.3.4.4.(3) Réaction de click 1 et 2.

Dans un premier temps, nous avons entrepris de faire réagir les deux partenaires **A** et **B** de la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire non-catalysée dans des conditions réactionnelles « usuelles », à savoir dans un ballon, dans un mélange EtOH/H_2O 1:1. Le milieu réactionnel protégé de la lumière a alors été agité à température ambiante pendant 1 h.

Nous avons alors obtenu des résultats préliminaires particulièrement encourageants puisqu'on a pu observer une très nette induction de fluorescence lorsque la réaction se produit (Figure I.19). Le produit de réaction présente une forte fluorescence sous excitation UV (à droite) comparée à la fluorescence de la coumarine de départ (au centre) ou au solvant seul (à gauche).

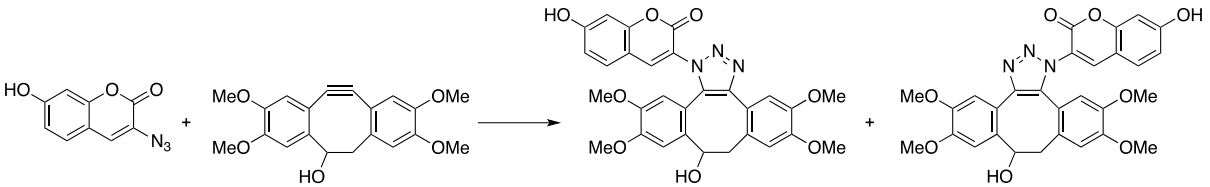


Schéma I.16. Cycloaddition 1,3-dipolaire entre **A** et **B**.

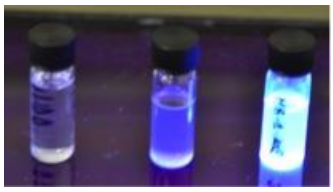


Figure I.19. De gauche à droite (sous illumination UV) : blanc (DMSO pur), coumarine **A** et produit de la réaction entre **A** et **B.**

Il est possible d'isoler les produits de la réaction après évaporation de l'éthanol et précipitation dans l'eau à 0 °C. On obtient alors un mélange de deux isomères.

I.3.4.5 Analyse spectroscopique

Afin de quantifier la différence de fluorescence entre les réactifs de la réaction de cycloaddition non-catalysée et le produit de réaction, nous avons procédé à des mesures d'absorption (Cary 5E UV-visible spectrometer). Il apparaît que l'azidocoumarine **A** et le produit de la réaction **A-B** ont le même comportement en matière d'absorbance, puisqu'ils présentent tous les deux un maximum d'absorbance à environ 350 nm (Figure I.20).

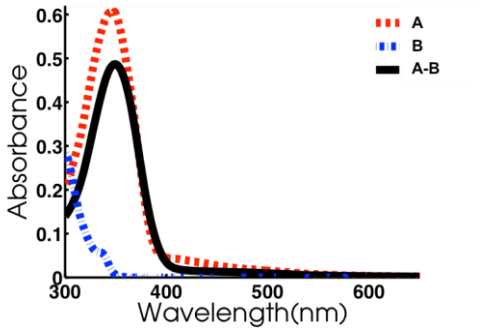


Figure I.20. Mesure d'absorbance des réactifs et produit de la réaction de « click »

En ce qui concerne les propriétés d'émission de ces différents composés (spectromètre Edinburgh Instruments FCS900 équipé avec un photomultiplieur R928-P Hamamatsu), on voit que le produit de la réaction **A-B** présente une fluorescence nettement supérieure aux deux réactifs (λ_{em} = 450 nm) (Figure I.21). Il est cependant à noter que la coumarine **A** et le produit de cycloaddition **A-B** présentent également le même comportement en émission avec, dans les deux cas, un maximum à 450 nm.

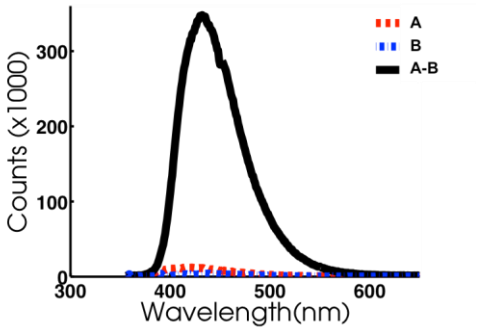


Figure I.21. Mesures de l'émission des réactifs et produit de la réaction de « click »

I.3.4.6 Optimisation de l'encapsulation des composés A et B

Ayant désormais en main les composés impliqués dans notre réaction modèle, il s'agissait ensuite de les encapsuler selon le protocole décrit au paragraphe **I.2.4.2**. Les produits impliqués dans notre réaction de chimie click non catalysée n'étant pas hydrosolubles, ils ont été mis en solution dans du DMSO. Lors de l'étape de production parallélisée des gouttes, la phase externe sera donc également une solution de pluronic dans le DMSO.

Les émulsions primaires obtenues par sonication sont ensuite analysées selon la méthode de DLS mentionnée plus haut, et l'étude de la stabilité dans le temps de cette émulsion primaire nous permet d'optimiser les quantités de tensioactif nécessaires dans la phase fluorée et les concentrations optimales de produit dans la phase DMSO.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à optimiser la composition des émulsions primaires contenant la coumarine **A**. La concentration massique dans la solution de DMSO a tout d'abord été fixée à 3% w/v (concentration identique à celle utilisée pour la fluorescéine dans les études précédentes menées au laboratoire). L'effet de la concentration en krytox K-NH_4^+ a alors été évalué sur la taille des émulsions (Figure I.22). Celle-ci semble ainsi plus faible pour des concentrations en krytox de 2% et plus.

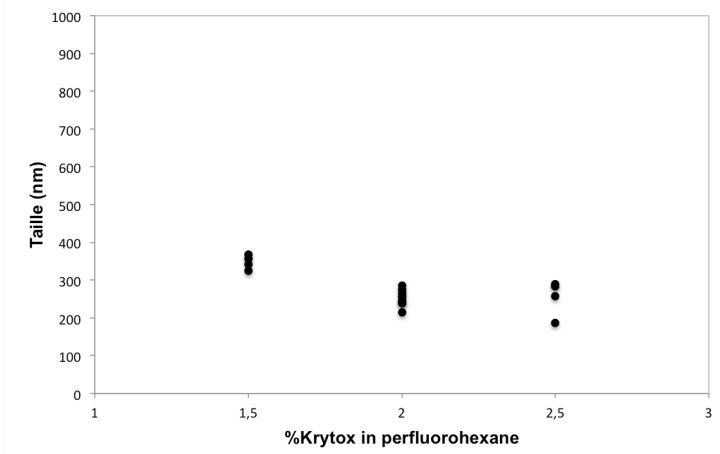


Figure I.22. Evolution de la taille moyenne de l'émulsion primaire en fonction de la concentration en Krytox dans la phase fluorée ([**A**]=3% w/v).

Cependant, si la concentration en tensioactif est trop importante, on risque par la suite d'observer plus de fuites hors des microgouttes par transport micellaire. Afin de minimiser la concentration en tensioactif tout en minimisant également la taille de l'émulsion, nous avons décidé de poursuivre cette étude avec une concentration en K-NH_4^+ égale à 2% w/v.

Il était également nécessaire d'optimiser la concentration en coumarine dans le DMSO avec une concentration en tensioactif fixée. Les résultats correspondant à cette étude sont rassemblés dans la Figure I.23 (résultats à t=0 et t=24 h). On constate alors que toutes les concentrations en coumarine **A** supérieures à 1% donnent des résultats satisfaisants post-sonication. Cependant, après 24 h, seule l'émulsion primaire contenant 3% de composé **A** encapsulé semble conserver une taille moyenne faible et similaire dans le temps.

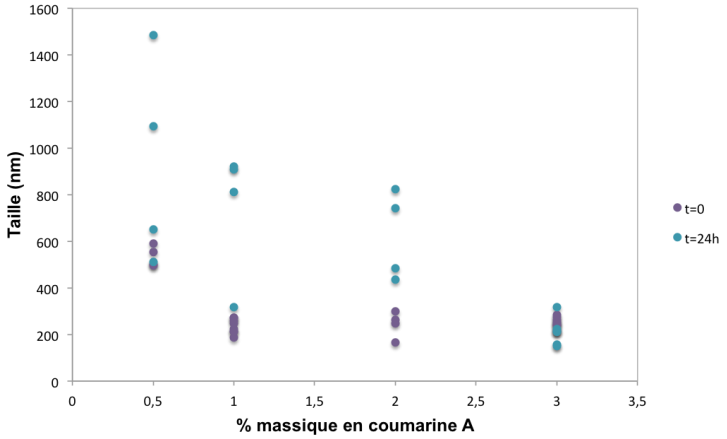


Figure I.23. Evolution de la taille moyenne de l'émulsion primaire en fonction du pourcentage massique en coumarine **A** dans la phase DMSO ([K-NH_4^+]=2% w/v, t=0 et t=24 h).

Finalement, les valeurs optimales de 3% w/v en coumarine **A** dans le DMSO et 2% w/v en K-NH_4^+ dans la phase fluorée ont été validées pour la suite de l'étude.

Nous avons également vérifié la stabilité de l'émulsion dans le temps (Figure I.24).

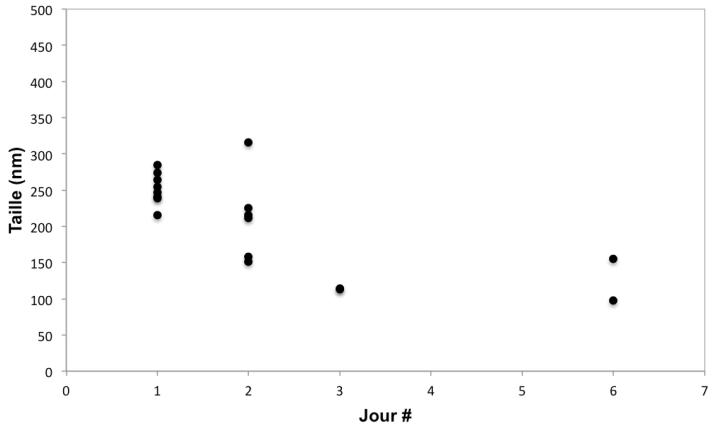


Figure I.24. Evolution au cours du temps de la taille d'une émulsion primaire composée d'une phase interne de DMSO+**A** (3%w/v) et d'une phase externe de perfluorohexane+K-NH_4^+ (2%w/v).

Il apparaît que notre choix de formulation semble judicieux, puisque la taille de l'émulsion primaire reste stable et inférieure à 300 nm jusqu'à 6 jours après sa production.

Dans un second temps, nous avons également souhaité optimiser la formulation de l'émulsion primaire contenant le composé **B**. Pour ce faire, nous avons fixé le pourcentage massique de **B** dans le DMSO à 3% et nous avons observé l'effet d'une variation du pourcentage de krytox dans la phase fluorée (Figure I.25). L'émulsion à 3.5% en Krytox semble ainsi donner les meilleurs résultats aussi bien en termes de taille que de stabilité au cours du temps.

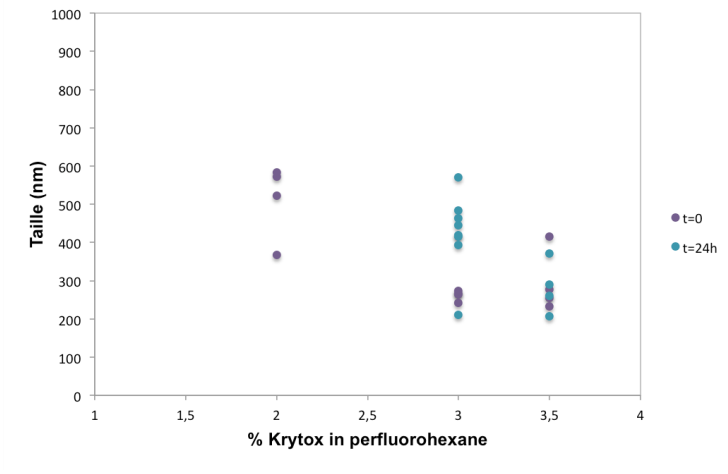


Figure I.25. Evolution de la taille moyenne de l'émulsion primaire en fonction de la concentration en krytox dans la phase fluorée ([**B**]=3% w/v, t=0 et t=24 h).

Le produit **B** étant difficile à synthétiser à grande échelle, nous n'avons pas poursuivi nos investigations concernant la formulation de l'émulsion primaire, et nous avons retenu comme paramètres optimaux une concentration en **B** de 3% w/v dans la phase DMSO et une concentration en K-NH_4^+ de 3.5% w/v dans la phase fluorée.

I.3.4.7 Largage avec un transducteur monoélément en canal microfluidique

Afin d'évaluer la qualité du contrôle spatio-temporel de la réaction de chimie « click » sélectionnée, plusieurs séries d'expériences ont été menées, en premier lieu en canal microfluidique. D'une part, une solution de 3-azido-7-hydroxycoumarine **A** dans du DMSO (3.0% w/v) a été encapsulée dans des doubles émulsions de 8 µm, tandis que le partenaire de cycloaddition, le TMDIBO **B**, était dissout dans le DMSO (0.3% w/v) et constituait le milieu extérieur des gouttes. Cette suspension de gouttes de **A** dans un milieu contenant **B** (Figure I.26) a été injectée dans un canal microfluidique droit de largeur 100 µm et d'épaisseur 40 µm.

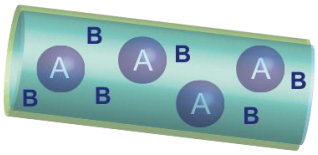


Figure I.26. Schéma d'une portion de canal microfluidique contenant un mélange de microgouttes du composé **A** avec le composé **B** dissout dans la phase externe.

Un transducteur monoélément de fréquence centrale 2.25 MHz (focale = 38 mm et f/d = 1) est focalisé sur le canal préalablement immergé dans un bain d'eau. Un pulse unique de 30 cycles à 2.25 MHz est envoyé par un générateur de fonctions arbitraires à un amplificateur radio-fréquence pour finalement atteindre un signal de 12.3 MPa PNP (« Peak-Negative Pressure »). Ce pulse déclenche également l'acquisition d'une série d'images à 34 Hz (Figure I.27).

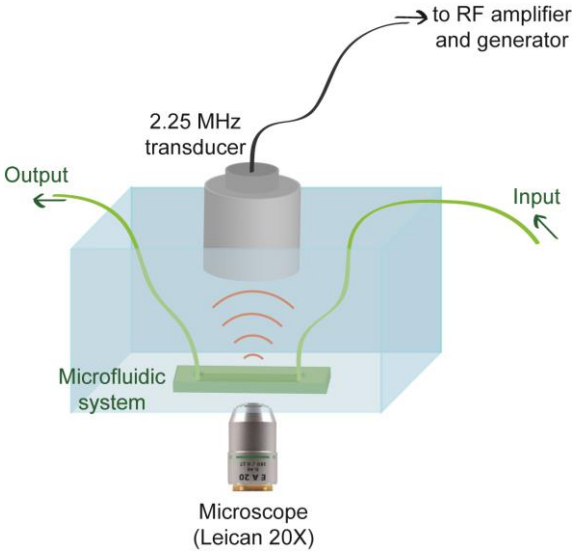


Figure I.27. Montage expérimental pour les expériences de largage en canal microfluidique.

Nous avons enregistré l'évolution de la fluorescence induite par la réaction chimique avant et après le largage du partenaire **A** hors des gouttes grâce à une caméra (34 images par seconde) montée sur un microscope à fluorescence (filtre DAPI). Nous avons été en mesure de constater qu'au sein du canal microfluidique, l'unique pulse ultrasonore émis entraînait la vaporisation de plusieurs gouttes et ainsi le largage du composé **A** encapsulé dans le milieu environnant (Figure I.28 et Figure I.29). On constate notamment sur la Figure I.28 que la réaction demeure très localisée spatialement. En moyenne, le diamètre du « nuage » de largage est du même ordre de grandeur, voire inférieur à la taille de la tâche focale du transducteur, qui mesure environ 600 µm de diamètre. Les gouttes présentes dans cette zone sont alors détruites et leur contenu largué dans le milieu environnant, tandis qu'à l'extérieur de cette zone, les gouttes ne sont pas affectées par le pulse ultrasonore.

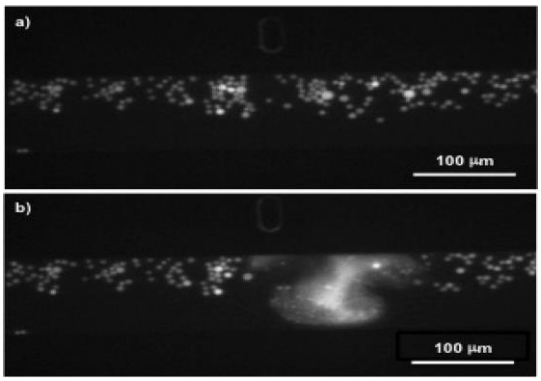


Figure I.28. Canal microfluidique droit contenant des gouttes de 3-azido-7-hydroxycoumarine **A** dans un flux contenant une solution de TMDIBO **B** dans le DMSO avant **(a)** et après **(b)** le pulse ultrasonore.

La Figure I.29 établit l'existence d'une différence de fluorescence significative entre le cas témoin (correspondant au composé **A** encapsulé dans les gouttes, elles-mêmes suspendues dans un milieu de DMSO pur), et le cas où la réaction se déclenche (composé **A** encapsulé dans les gouttes, elles-mêmes suspendues dans une solution de **B** dans le DMSO). Cette différence de fluorescence s'explique par la formation du produit de cycloaddition lorsque la coumarine **A** est larguée dans un milieu contenant le partenaire **B**. En effet, si on s'intéresse à l'intensité moyenne de fluorescence dans la fenêtre d'observation (Figure I.30), on constate que cette intensité augmente considérablement lorsque le « nuage » de largage diffuse dans le milieu et que la réaction de « click » a lieu. A la fréquence d'observation qui est ici de 34 images par seconde, on remarque que la rupture des gouttes sous l'effet du pulse ultrasonore (d'une durée de 13 µs) intervient de manière instantanée. Les images Figure I.29**.b** et Figure I.29**.g** représentent respectivement une superposition de l'état du canal avant et juste après le largage, le temps d'exposition étant supérieur à la durée de l'événement de largage lui-même, qui intervient à t=100 ms.

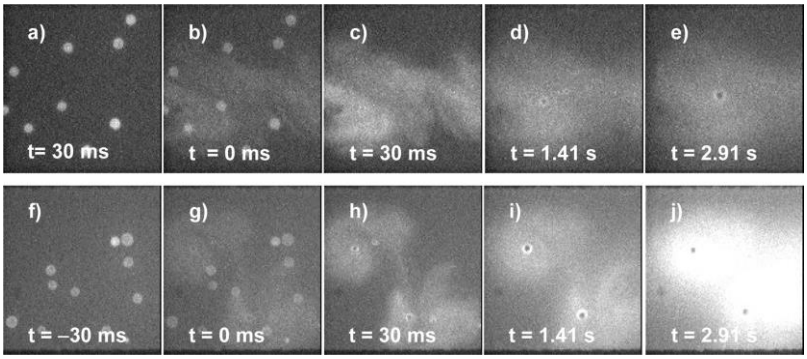


Figure I.29. Gouttes de 3-azido-7-hydroxycoumarine **A** dans un flux de DMSO (a à e) ou de TMDIBO **B** dans le DMSO (f à j). Séquences d'images prises à 34 Hz, le pulse ultrasonore intervenant aux images b et g respectivement. La largeur de chaque image est de 100 µm

Après 5 secondes, l'intensité de fluorescence mesurée atteint un plateau (Figure I.30), tandis que dans le cas témoin, l'intensité de fluorescence reste stable au cours du temps après le largage, même si une légère augmentation de fluorescence est observée. Celle-ci est attribuée à la diminution du phénomène « d'auto-quenching » lors de la diffusion de la coumarine **A** dans le milieu après sa libération hors des gouttes. Cependant, il est notable que l'intensité de fluorescence du cas témoin reste de dix fois inférieure à la valeur du plateau atteint par l'intensité de fluorescence liée à la réaction chimique. Il faut également souligner que l'intensité maximale est atteinte très rapidement après largage (moins de 5 secondes dans le cas ci-dessous), ce qui dénote une réaction chimique particulièrement rapide.

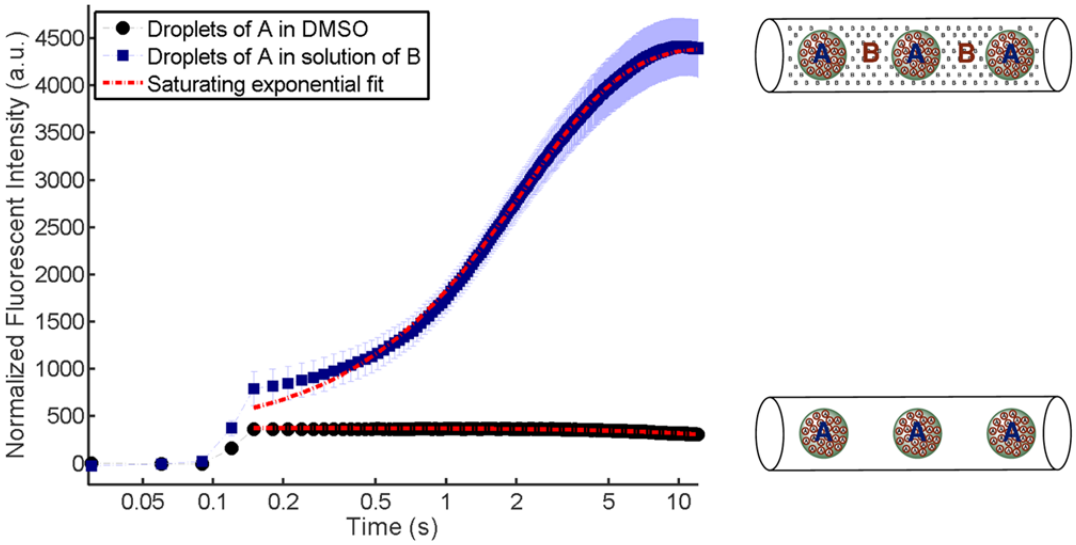


Figure I.30. Augmentation de fluorescence après l'événement de largage (t = 100 ms) : comparaison entre le cas témoin (gouttes de **A** dans le DMSO pur, courbe noire) et la réaction (gouttes de **A** dans une solution de **B** dans le DMSO, courbe bleue). La cinétique de réaction est modélisée par une exponentielle avec une constante de temps de 2.2 s (R^2 = 0.99).

Les résultats ci-dessus montrent que notre méthode permet un excellent contrôle temporel de la réaction chimique étudiée. En effet, moins de 3 ms sont nécessaire pour initier la rupture des gouttes et le relargage de leur contenu dans le milieu extérieur. L'intensité de fluorescence du milieu augmente dès l'application du pulse ultrasonore. L'utilisation de microgouttes de perfluorocarbone permet donc un bon isolement des réactifs, et la rupture de ces microgouttes sous l'effet des ultrasons entraîne la mise en contact de ces réactifs et leur réaction.

Remarque :

Les autres cas expérimentaux envisageables (gouttes de **B** dans solution de **A** et gouttes de **A** et **B** dans DMSO pur) ont également été testés afin de vérifier qu'on obtenait bien une augmentation de signal en cas de largage.

En premier lieu, une solution de TMDIBO **B** dans du DMSO (3.0% w/v) a été encapsulée dans des doubles émulsions de 8 µm, tandis que le partenaire de cycloaddition, la 3-azido-7-hydroxycoumarine

A, est dissout dans le DMSO (0.03% w/v) et constitue le milieu extérieur des gouttes. Cette suspension de gouttes de **B** dans un milieu contenant **A** (Figure I.31) a été injectée dans un canal microfluidique droit de largeur 100 µm et d'épaisseur 40 µm.

On observe une augmentation du signal de fluorescence après le pulse ultrasonore (même protocole que l'étude décrite précédemment) indiquant que la réaction de cycloaddition a eu lieu. Une seconde après le largage, l'intensité de fluorescence diminue. Dans ce cas, cela est du au fait que le flux n'a pas pu être parfaitement stabilisé devant la fenêtre d'observation. Une partie du nuage de fluorescence se décale donc hors de cette dernière, ce qui induit la diminution du signal.

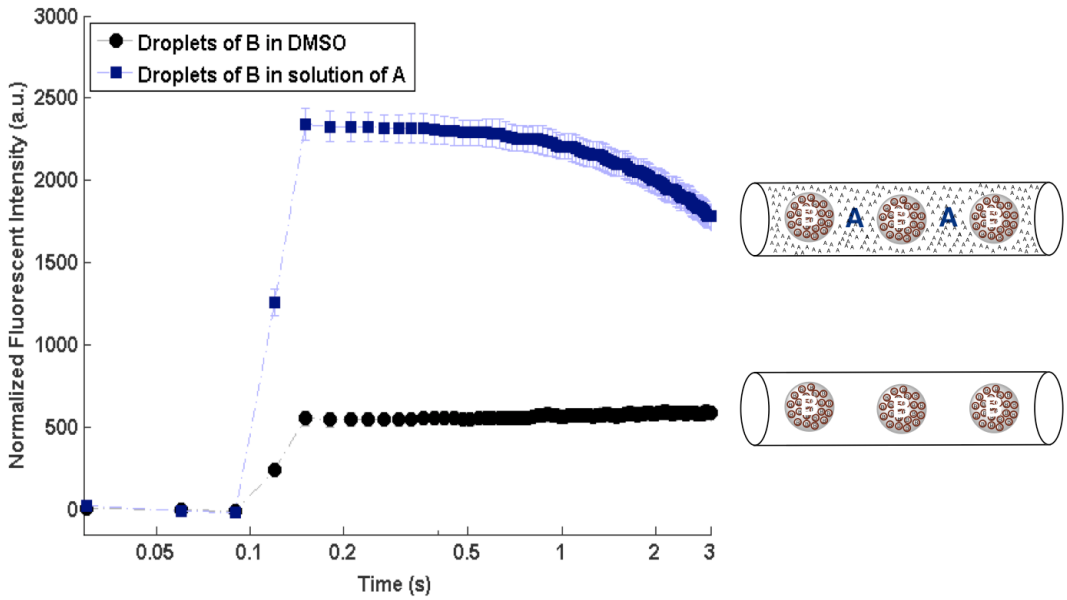


Figure I.31. Augmentation de fluorescence après l'événement de largage (t = 100 ms) : comparaison entre le cas témoin (gouttes de **B** dans le DMSO pur, courbe noire) et la réaction (gouttes de **B** dans une solution de **A** dans le DMSO, courbe bleue).

En second lieu, une solution de TMDIBO **B** dans du DMSO (3.0% w/v) a été encapsulée dans une première série de doubles émulsions de 8 µm, tandis que le partenaire de cycloaddition, la 3-azido-7-hydroxycoumarine **A** en solution dans le DMSO (3.0% w/v) est encapsulée dans une seconde série de microgouttes de PFC. Ce mélange de gouttes de **A** et de gouttes de **B** (Figure I.32) a été injectée dans un canal microfluidique droit de largeur 100 µm et d'épaisseur 40 µm.

Après largage ultrasonore (toujours suivant le même protocole d'un pulse unique déclenchant l'acquisition vidéo), on constate que l'intensité de fluorescence augmente environ d'un facteur 1000. Cette augmentation de fluorescence est nettement supérieure à l'augmentation obtenue lors de la libération de gouttes contenant **A** uniquement (courbe noire), ou de celle de gouttes contenant **B** uniquement (courbe bleue). La différence d'intensité de fluorescence entre ces expériences de contrôle et l'expérience de largage des deux composés **A** et **B** encapsulés indique là encore l'apparition du produit de cycloaddition.

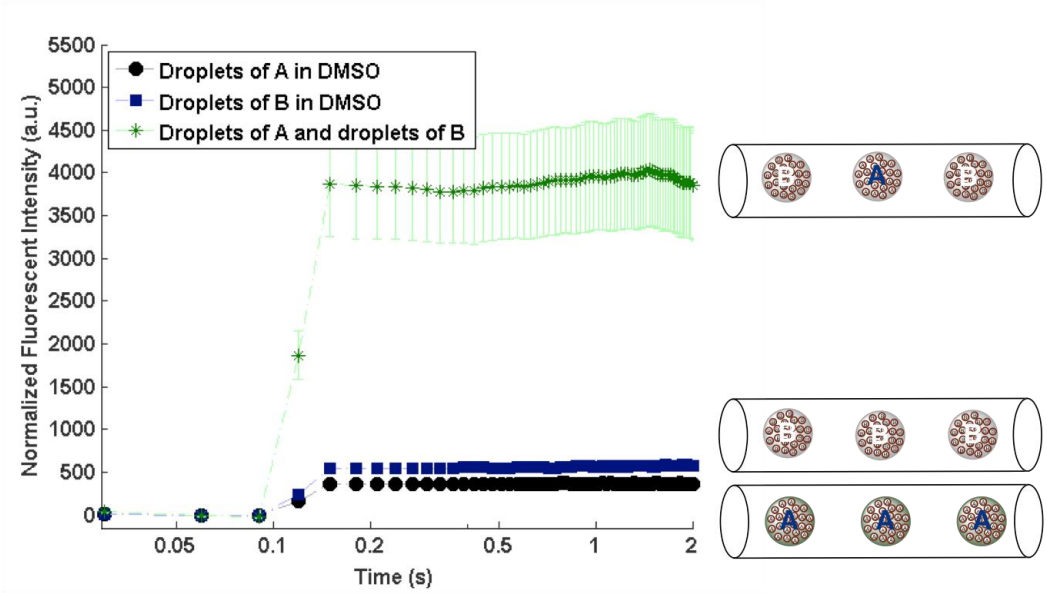


Figure I.32. Augmentation de fluorescence après l'événement de largage (t = 100 ms) : comparaison entre les cas témoin (gouttes de **A** dans le DMSO pur, courbe noire et gouttes de **B** dans le DMSO pur, courbe bleue) et la réaction (gouttes de **A** et gouttes de **B** en solution dans le DMSO pur, courbe verte).

Ces résultats viennent donc confirmer la possibilité de contrôler spatio-temporellement une réaction chimique spontanée comme la cycloaddition de Huisgen non-catalysée par l'encapsulation de l'un, l'autre ou des deux partenaires réactionnels dans des microgouttes de PFC, suivi de leur libération par largage ultrasonore de ces microgouttes.

I.3.4.8 Largage avec un échographe clinique dans une plaque OptiCell

Contrairement au transducteur monoélément utilisé pour l'étude précédente, dont la position de la tâche focale est prédéterminée, un scanner d'échographie équipé d'une sonde multi-éléments peut être focalisé à différents endroits d'un même plan si on impose des délais électroniques appropriés aux différents éléments de la sonde.

Afin de démontrer qu'un contrôle à la fois spatial et temporel de la réaction pouvait être obtenu avec un appareil clinique dont les pressions acoustiques respectent les normes imposées par la FDA, nous avons injecté dans une plaque de culture constituée de deux membranes de plastiques, espacées de 2 mm et transparentes aux ultrasons et à la lumière (OptiCell®), une suspension similaire à celle utilisée dans l'étude précédente. Une suspension à 1% v/v de gouttes contenant la coumarine **A** est ainsi préparée dans une solution contenant l'alcyne **B** (0.15% w/v). Cette plaque de culture est ensuite immergée dans un bain d'eau thermostaté à 12 °C et placée dans l'axe d'une sonde échographique de 196 éléments (Vermon) fonctionnant à 5 MHz connectée à un échographe (Aixplorer, Supersonic Imagine) (Figure

I.33). Ce dernier (de focale 2 cm) émet un pulse unique de 2 cycles en chacun des points de largage prédéterminés et programmés *via* une interface logicielle (Figure I.34, à gauche). La distance entre deux points de largage est égale au pas du transducteur, ici 0.3 mm.

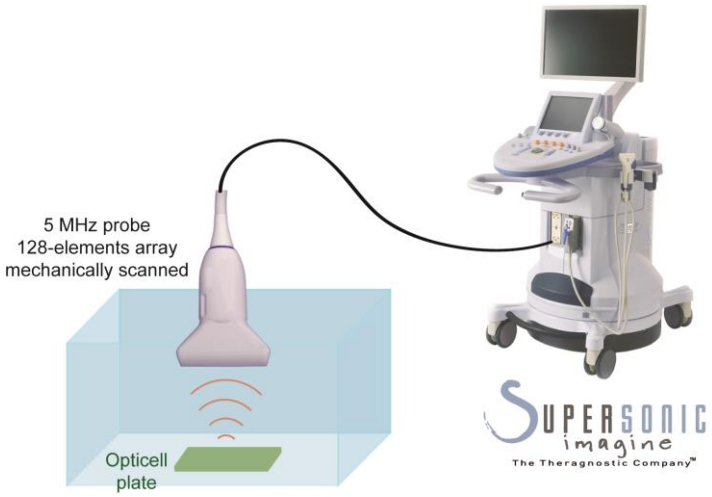


Figure I.33. Montage expérimental pour les expériences de largage en plaque Opticell.

En chaque point de focalisation et donc de largage, la réaction de cycloaddition est initiée, et induit alors une augmentation de l'intensité de fluorescence extrêmement localisée. C'est ainsi que le motif de la tour Eiffel présenté sur la Figure I.34 a pu être créé point par point en moins de 6 secondes.

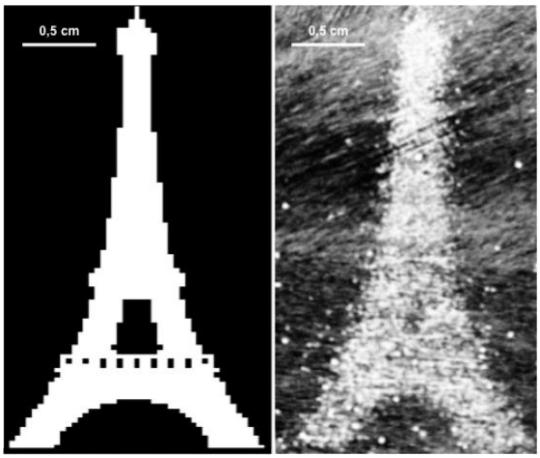


Figure I.34. Photographie prise sous lumière UV sous filtre à 350 nm quelques secondes après la fin du largage. Le transducteur ultrasonore focalise point après point selon le modèle (à gauche) dans une plaque OptiCell® remplie d'une suspension de gouttes de 3-azido-7-hydroxycoumarine dans une solution de TMDIBO dans le DMSO.

I.3.4.9 Conclusion

Finalement, nous avons été capables d'initier une réaction de cycloaddition non-catalysée par des sels de cuivre sous l'effet d'une activation ultrasonore avec un excellent contrôle spatial et temporel. Ce double contrôle a été obtenu en isolant l'un des réactifs dans des microgouttes contenant une émulsion de DMSO dans le perfluorohexane stabilisées à l'aide de différents tensioactifs (fluorés et non-fluorés). Le partenaire réactionnel a été laissé libre dans le milieu extérieur. Un unique pulse ultrasonore a été nécessaire pour vaporiser la matrice de perfluorocarbone des gouttes, permettant ainsi le relargage instantané (en moins de 3 ms) du contenu des gouttes dans le milieu environnant, et ce dans une zone restreinte à la seule zone focale du transducteur d'un diamètre de 600 µm. Si l'on considère que ces résultats ont pu être reproduits avec succès à l'aide d'un appareil d'échographie clinique, cette méthode de contrôle nous ouvre donc la possibilité de générer une réaction chimique en profondeur dans des tissus, dans les zones typiquement atteignables par l'imagerie échographique.

I.4. Etude *in vitro* de la fabrication *in situ* d'un anticancéreux

I.4.1 Introduction

Afin de prévenir au maximum le risque de largage non-spécifique inhérent à la plupart des méthodes de délivrance, nous avons envisagé une nouvelle stratégie consistant à générer une drogue toxique directement sur le site à traiter (une tumeur par exemple), à partir de précurseurs peu ou non-toxiques. Ces précurseurs seraient encapsulés dans des microgouttes de perfluorocarbone sensibles aux ultrasons focalisés et délivrés *in situ* pour promouvoir leur réaction et générer le produit thérapeutique.

Ainsi, deux niveaux de contrôle permettent de limiter les doses toxiques au niveau des tissus sains. En effet, comme dans le cas d'une stratégie de délivrance traditionnelle, la matrice de PFC de nos microgouttes permettrait d'isoler le composé encapsulé du milieu extérieur. En outre, en cas de largage non-spécifique (fuites hors des gouttes par exemple), le produit libéré sera non-toxique et donc inoffensif pour les tissus rencontrés.

A condition de choisir pertinemment les composés précurseurs **A** et **B**, il peut être judicieux de n'encapsuler que l'un des deux composés (par exemple le composé **A**) dans les microgouttes de PFC, l'autre partenaire **B** étant non encapsulé à l'extérieur (Figure I.35, **a**). En effet, à condition de choisir **B** tel qu'il soit rapidement métabolisable par exemple, ou encore spécifiquement présent sur le site à traiter, cela préviendrait tout risque de mise en contact de **A** avec **B** hors de la zone de largage (Figure I.35, **d**). Sur le site à traiter, les deux partenaires réactionnels **A** et **B** seraient mis en contact par largage ultrasonore des gouttes contenant **A** (Figure I.35, **b** et **c**)

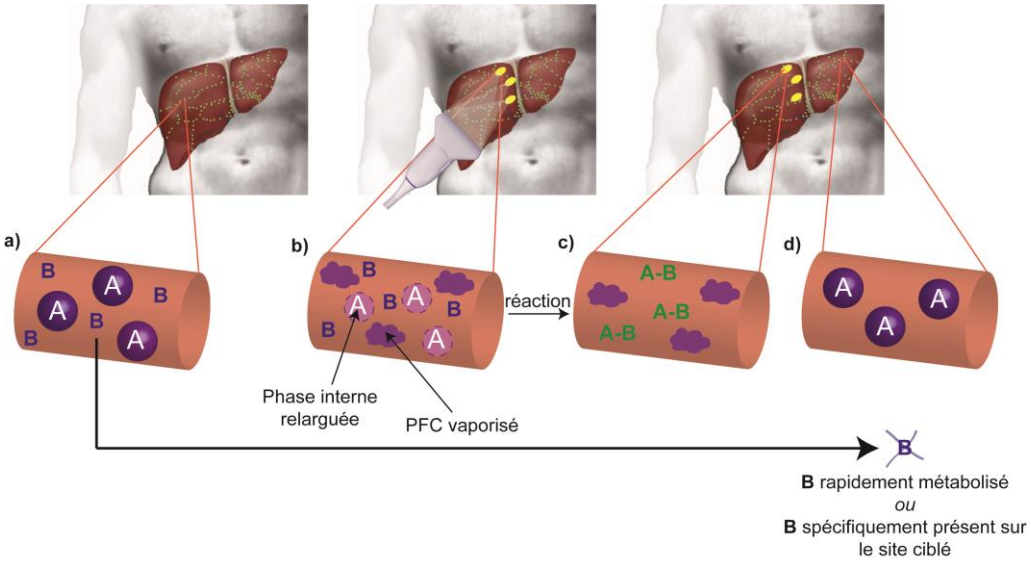


Figure I.35. Principe de la stratégie de chimie *in situ* : **a)** deux partenaires réactionnels **A** et **B** sont isolés au moyen de microgouttes de PFC, **b)** sur le site à traiter, le produit **A** encapsulé est libéré sous l'effet des ultraons, **c)** **A** et **B** peuvent ainsi réagir pour former le produit actif **A-B**, **d)** hors de la zone focale, le composé **A** reste encapsulé dans les microgouttes tandis que le partenaire réactionnel **B** est soit métabolisé, soit spécifiquement présent sur le site à traiter.

Afin de démontrer le concept de « chimie *in situ* », dans un premier temps, nous avons montré que nous étions capables de contrôler de manière spatiale et temporelle l'initiation d'une réaction chimique spontanée de cycloaddition entre un azoture et un alcyne contraint dans un cycle à 8 chaînons à l'aide de nos microgouttes de PFC et d'ultrasons. Dans un second temps, nous avons mené une étude *in vitro*, en collaboration avec l'équipe du Pr Sébastien Papot à l'université de Poitiers. La fabrication *in situ* d'anticancéreux par encapsulation dans des microgouttes de PFC d'une pro-drogue peu ou non-toxique et son activation après largage par une enzyme a été entreprise. Cette étude a pour but de prouver que notre nouvelle stratégie de « chimie *in situ* » peut effectivement permettre la synthèse ou l'activation *in situ* d'une drogue.

I.4.2 Choix du système prodrogue/enzyme

Comme nous avons pu le voir au Paragraphe **I.1**, la molécule anticancéreuse « doxorubicine » (DOX) est un modèle relativement standard pour étudier les propriétés de transporteurs sensibles aux ultrasons et la délivrance ciblée de leur contenu. La DOX est l'une des rares molécules dont la forme vectorisée dans des liposomes, le doxil, soit sur le marché et utilisée en clinique. Cette molécule, de la famille des anthracyclines, est utilisée dans le traitement de nombreux types de cancers, comme le cancer du poumon, du sein, des ovaires, de l'estomac… Elle agit comme un agent intercalant de l'ADN, et c'est un inhibiteur de topoisomérases de l'ADN, empêchant ainsi la réplication de ce dernier. Un effet secondaire notable de cette drogue réside cependant en une toxicité cardiaque importante. Celle-ci apparaît immédiatement après le traitement, mais est également cumulative et irréversible à plus long terme à mesure que le traitement se prolonge et que les doses injectées augmentent.

C'est donc *a priori* un candidat de choix pour notre étude, d'autant plus qu'il existe un certain nombre de pro-drogues (formes inactivées ou plus sélectives) de cette molécule. La vectorisation d'une pro-drogue permettrait potentiellement de diminuer de manière significative la toxicité cardiaque de la DOX, d'une part du fait de la baisse de toxicité due à l'utilisation d'une pro-drogue, mais également grâce à l'isolement de la molécule du milieu cardiaque du fait de l'encapsulation sous forme de microgouttes de PFC.

Parmi ces pro-drogues, une forme inactivée de la DOX comportant une gâchette glucuronylée, le HMR1826, a été développée par les laboratoires Hoechst-Marion-Roussel à la fin des années 1990 (Schéma I.17).[87]

[87] Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech J.; Gerken, M.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.

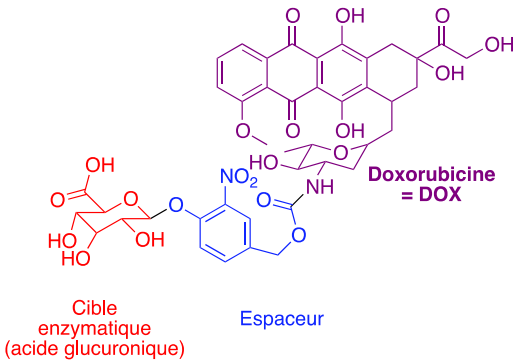


Schéma I.17. Structure de la molécule « HMR1826 ».

Cette molécule présente une cardiotoxicité environ 100 fois plus faible que la DOX, et elle est activée par la β-glucuronidase de façon à restaurer l'activité initiale de la DOX.[88] Cette enzyme est secrétée de manière extracellulaire par les cellules du système inflammatoire dans les zones tumorales nécrotiques, tandis que dans les tissus sains, elle est confinée au sein même des cellules dans les lysosomes.[89] C'est donc une enzyme qui est spécifiquement présente dans le microenvironnement tumoral et qui pourrait ainsi jouer dans notre cas le rôle de second partenaire réactionnel.

La molécule HMR1826 est composée d'un acide glucuronique greffé au moyen d'une liaison dite « glycosidique » à un espaceur dit « auto-immolable », lui même lié de manière covalente à la structure même de la drogue. La β-glucuronidase va ainsi pouvoir cliver la liaison glycosidique, entraînant la décomposition spontanée de l'espaceur, et ainsi la libération de la doxorubicine (Schéma I.18).

[88] Mürdter, T.; Friedel, G.; Backman, J. T.; McClellan, M.; Schick, M.; Gerken, M.; Bosslet, K.; Fritz, P.; Toomes, H.; Kroemer, H. K.; Sperker, B. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 223-228.

[89] Albin, N.; Massaad, L.; Toussaint, C.; Mathieu, M.-C.; Morizet, J.; Parise, O.; Gouyette, A.; Chabot, G. G. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3541-3546.

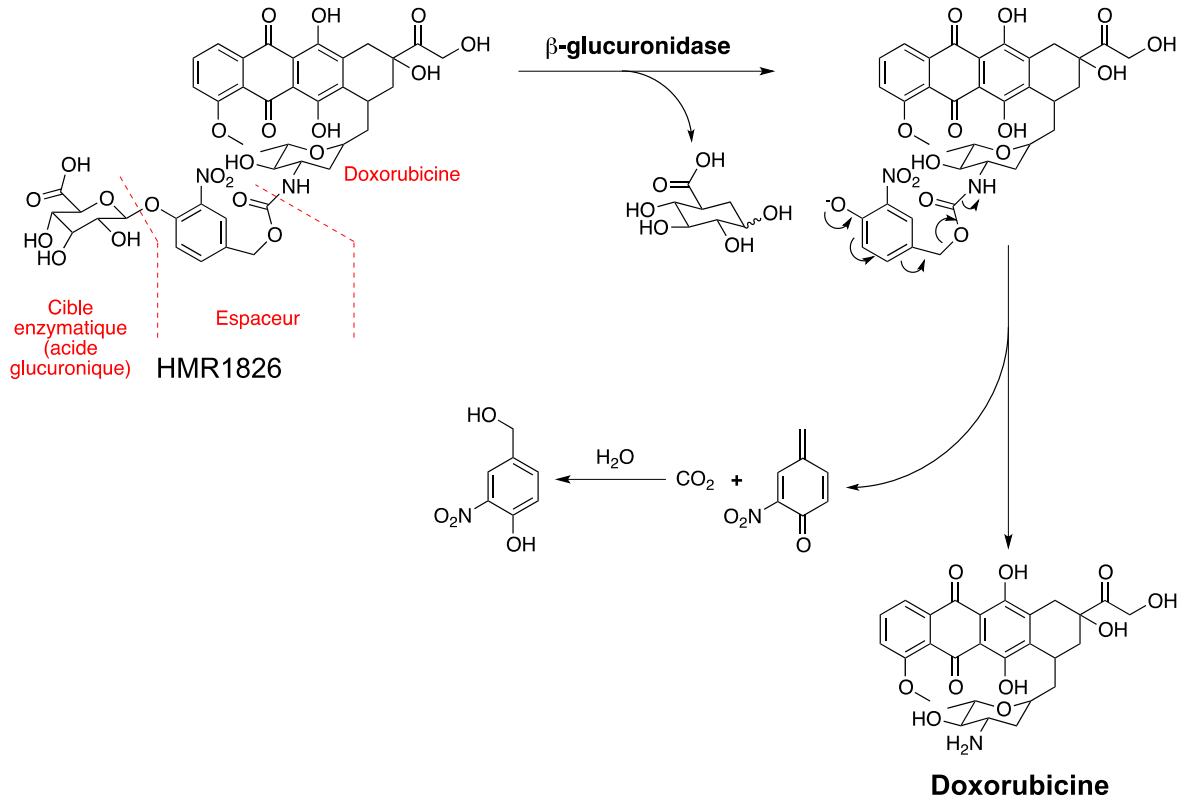


Schéma I.18. Activation de la doxorubicine par l'enzyme β-glucuronidase à partir de la pro-drogue HMR1826.

La doxorubicine est l'un des anticancéreux les plus utilisés en clinique, elle est également au centre de nombreuses études d'encapsulation. Elle est cependant loin d'être le seul candidat possible pour notre étude. En effet, de nombreux efforts de recherche ont été portés sur le développement d'autres drogues glucuronylées activables par la β-glucuronidase.[90] Ces pro-drogues possèdent une structure généralement commune, à savoir un acide glucuronique greffé à la structure initiale de la drogue *via* un espaceur auto-immolable. L'adjonction de ce site de reconnaissance enzymatique à la structure initiale de la drogue entraîne en général une forte diminution de la toxicité de celle-ci, notamment du fait de l'augmentation du caractère hydrophile de la molécule induite par l'adjonction de l'acide glucuronique. En effet, une molécule hydrophile va être difficilement internalisée dans les cellules, ce qui prévient dans le cas des pro-drogues glucuronylées leur activation intracellulaire par la β-glucuronidase lysosomale. L'action de la β-glucuronidase extra-tumorale permet de libérer la drogue et de restaurer ses propriétés initiales de manière spatialement restreinte.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la pro-drogue glucuronylée de la monométhylauristatine E (MMAE), développée par l'équipe du Pr Sébastien Papot.[91] La MMAE est un

[90] Tranoy-Opalinski, I.; Legigan, T.; Barat, R.; Clarhaut, J.; Thomas, M.; Renoux, B.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 302-313.

[91] Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Jayle, C.; Alsarraf, J.; Thomas, M.; Papot, S. *Eur J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 75-80.

agent antimitotique qui empêche la division cellulaire en inhibant la polymérisation de la tubuline. Cette molécule est un polypeptide synthétisé par des mollusques marins, les *Dolabella auricularia*. Du fait de sa cytotoxicité extrêmement élevée (subnanomolaire *in vitro*), cette molécule ne peut pas être utilisée telle quelle, car létale même à de très faibles doses. Sa conjugaison avec un anticorps monoclonal a cependant mené au développement et à la mise sur le marché en 2011 du produit anticancéreux « Brentuximab vedotin ».[92, 93] Le développement de la pro-drogue glucuronylée de la MMAE (« MMAE-glu ») s'inscrit dans la même logique de contrôler sa cytotoxicité en libérant spécifiquement la drogue dans le milieu extra-tumoral. En effet, l'étude menée par Legigan *et al*. montre que la MMAE-glu était jusqu'à 100 fois moins toxique que la MMAE elle-même sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (A549, KB, MDA-MB-231…), mais également qu'il est possible de restaurer l'activité de la MMAE grâce à la β-glucuronidase (Schéma I.19). La MMAE, ainsi que sa pro-drogue MMAE-glu sont toutes deux des molécules relativement hydrophiles, et qui sont donc de bons candidats pour leur encapsulation dans nos doubles émulsions aqueuses. Signalons que la MMAE étant beaucoup plus toxique que la doxorubicine, la quantité de produit à encapsuler pour observer un effet serait plus faible tout comme la quantité de gouttes à larguer par ultrasons.

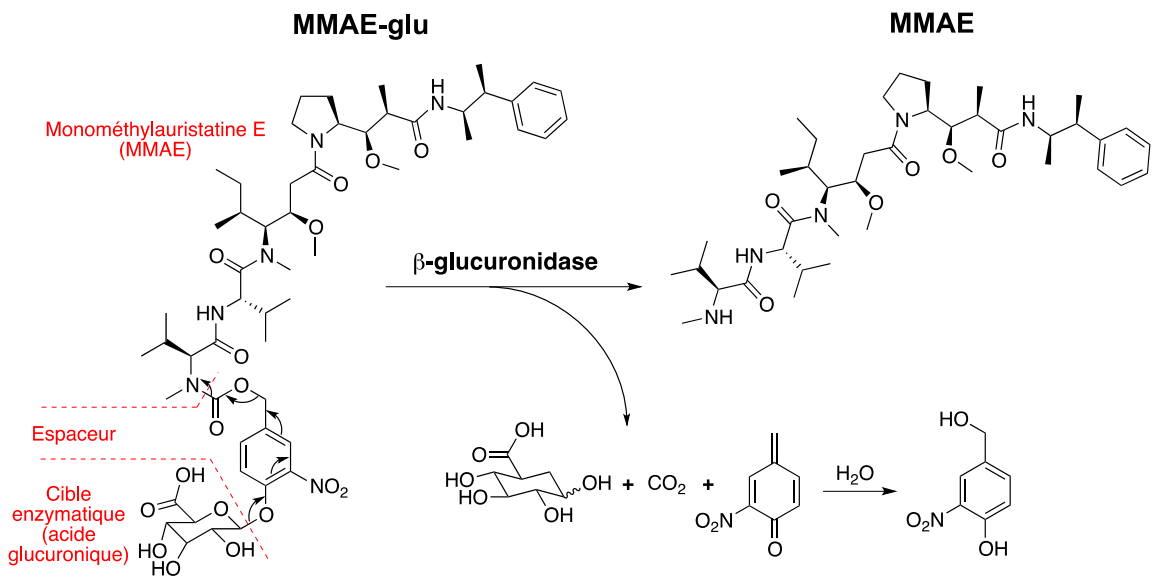


Schéma I.19. Activation de la monométhylauristatine E (MMAE) par l'enzyme β-glucuronidase à partir de la pro-drogue MMAE-glu.

L'un des inconvénients majeurs des pro-drogues glucuronylées réside dans leur temps de demie vie plasmatique réduit. En effet, tout comme la plupart des glucuronides, l'élimination rénale rapide de ces

[92] Doronina, S. O.; Toki, B. E.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cerveny, C. G.; Chace, D. F.; DeBlanc, R. L.; Gearing, R. P.; Bovee, T. D.; Siegall, C. B.; Francisco, J. A.; Wahl, A. F.; Meyer, D. L.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778-784.

[93] Senter, P. D.; Sievers, E. L. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 631-637.

composés implique souvent l'utilisation de doses très importantes pour atteindre un effet thérapeutique mesurable.[94] Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des stratégies permettant d'améliorer la pharmacocinétique de ces composés, comme par exemple le couplage *in vivo* avec l'albumine plasmatique proposé par Legigan *et al.*[95] Pour notre part, nous avions émis l'hypothèse que l'encapsulation de ces pro-drogues glucuronylées dans des microgouttes de perfluorocarbone pourrait prévenir leur dégradation rapide par le système rénal et ainsi permettre à la fois un ciblage des zones tumorales grâce au largage spatialement contrôlé induit par l'échographe clinique, mais également l'injection de doses plus faibles de produit thérapeutique grâce à l'isolement de ce dernier au sein des microgouttes.

Au cours de l'étude *in vitro* présentée ici, nous allons donc mettre en évidence les résultats de la combinaison de la stratégie de « chimie *in situ* » avec l'utilisation de pro-drogues glucuronylées telles que le HMR1826 et la MMAE-glu.

I.4.3 Encapsulation des composés

I.4.3.1 Etude de l'encapsulation de composés dilués

Jusqu'à présent, dans le cadre des études d'encapsulation de la fluorescéine tout comme pour l'encapsulation de la coumarine **A** ou de l'alcyne **B**, nous avions travaillé à des concentrations massiques élevées de produit dans les gouttes (3% w/v), ce qui correspondait à des concentrations molaires dans les gouttes égales respectivement à 90 mM pour la fluorescéine, 88 mM pour la coumarine **A** et 148 mM pour l'alcyne **B**. Paradoxalement, l'encapsulation de composés plus dilués (concentrations dans la gamme µM par exemple) s'est avérée problématique. Nous avons alors postulé que lorsqu'un composé était encapsulé à forte concentration (centaine de mM), il participait à la stabilisation de l'émulsion, stabilisation qui faisait alors défaut dans le cas de solutions diluées (µM). Afin d'être en mesure d'encapsuler les composés désirés indépendamment de leur concentration, nous avons de ce fait étudié la stabilité d'émulsions primaires « vides », c'est à dire dont la phase interne aqueuse ne contient aucun composé. Si de telles émulsions s'avéraient stables, nous pourrions *a fortiori* supposer que des émulsions de composés très dilués de même formulation seraient stables également.

Nous avons tout d'abord cherché à estimer la taille d'une émulsion primaire d'eau pure (eau MilliQ). On peut voir sur la Figure I.36 qu'à 2% w/v en krytox dans la phase fluorée, non seulement les tailles d'émulsion mesurées par DLS sont très variables (de 300 à presque 1000 nm), mais que visuellement,

[94] Stachulski, A. V.; Meng, X. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 806-848.

[95] Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516-4520.

l'émulsion semble se démixer. Si l'on augmente drastiquement le pourcentage de tensioactif dans la phase fluorée (à 6% w/v), aucune amélioration notable n'est constatée, ni du point de vue de la taille de l'émulsion, ni du point de vue de son aspect visuel.

L'eau pure a alors été remplacée par de l'eau tirée du robinet, et une émulsion entre cette eau et une phase de PFC à 2% w/v en krytox a été préparée : on constate alors une légère amélioration des propriétés de l'émulsion. Sa taille telle que mesurée par la méthode de DLS reste inférieure à 550 nm et l'émulsion semble moins démixée que précédemment. Un tel résultat nous encourage à conclure que c'est la présence d'impuretés dans l'eau du robinet (ions, molécules diverses, etc…) par rapport à l'eau pure qui permet d'améliorer la stabilité de l'émulsion primaire correspondante. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons encapsulé diverses solutions aqueuses tamponnées, et donc chargées en ions, comme le TRIS base (Tris(hydroxymethyl)aminométhane), le MOPS (acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique) et le PBS (tampon phosphate salin couramment utilisé en biologie contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique, ainsi qu'un peu de chlorure de potassium). Dans ces trois cas, l'aspect visuel de l'émulsion est homogène, et par conséquent très satisfaisant. Quant aux tailles mesurées par la méthode de DLS, elles s'échelonnent entre 150 et 400 nm environ, ce qui est également l'objectif poursuivi.

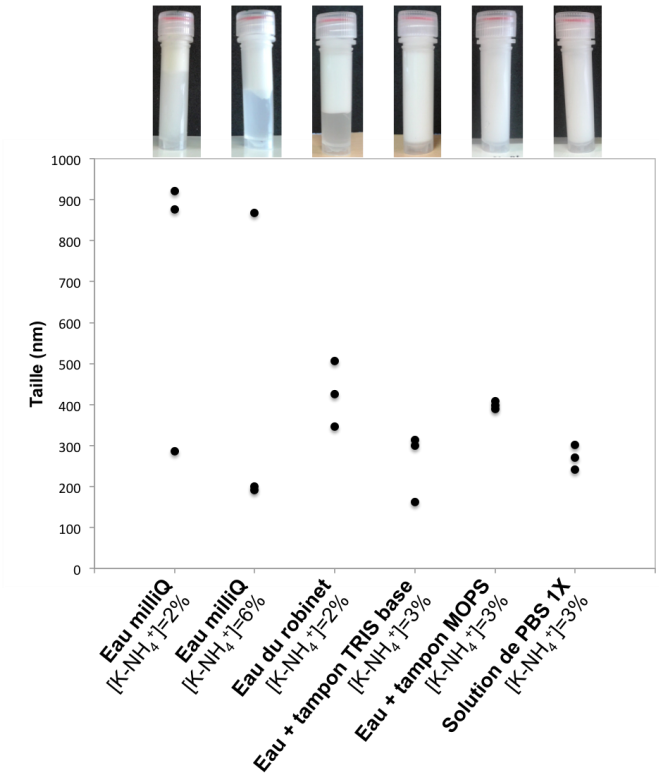


Figure I.36. Mesure par DLS de la taille de différentes émulsions primaires, et aspect visuel des émulsions étudiées.

Finalement, il semble que l'utilisation des solutions salines de différentes nature mentionnées précedemment (TRIS, MOPS, PBS) permette d'obtenir des émulsions primaires « vides » de bonne qualité.

A partir de l'étude précédente, nous avons alors opté pour une solution saline de PBS 10X (concentration commerciale) ou de PBS 1X (solution commerciale diluée 10 fois) comme base de dilution pour nos composés d'intérêt. Nous avons étudié les caractéristiques en termes de taille de différentes émulsions de PBS, en faisant varier le pourcentage de krytox dans la phase fluorée de 2% à 3.5% (Figure I.37). Nous avons constaté peu de différences entre ces différentes émulsions : leur taille restait comprise entre 50 nm et 400 nm et surtout restait stable (même gamme de valeurs, de 100 nm à 400 nm) après 24 h. Un tel résultat est encourageant dans la perspective de pouvoir encapsuler des produits dilués au µM ou de concentrations encore inférieures, puisque la concentration en krytox pourra être ajustée en fonction du composé encapsulé afin d'obtenir une stabilité maximale.

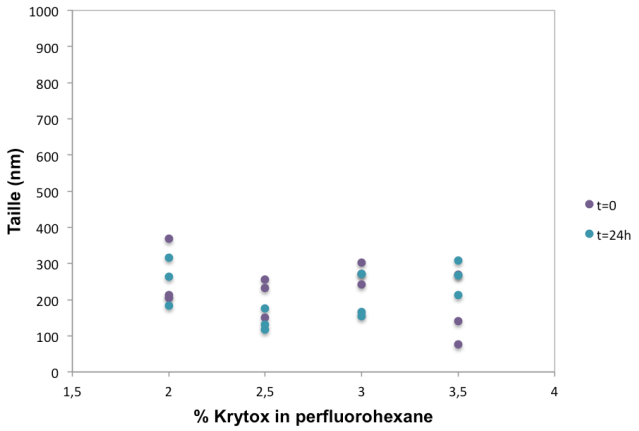


Figure I.37. Evolution de la taille d'émulsions primaires de PBS1X en fonction du pourcentage de krytox dans la phase fluorée (à t=0 et t=24h).

I.4.3.2 Encapsulation des composés actifs

Les composés à encapsuler pour l'étude *in vitro* (HMR1826, doxorubicine, MMAE-glu, MMAE) ont été dissous dans une solution de PBS 1X filtrée à 0.2 µm, conformément aux résultats obtenus précédemment sur l'encapsulation de produits dilués. Les concentrations des solutions mères ainsi obtenues valaient respectivement 4.5 mM pour le HMR1826 et la DOX, et 1 mM pour la MMAE-glu et la MMAE. Pour ces dernières, des dilutions à 0.5 mM (« MMAE/MMAE-glu 5X ») ou à 0.1 mM (« MMAE/MMAE-glu 1X ») ont également été réalisées. Les émulsions primaires entre ces solutions salines et le perfluorohexane ont ensuite été obtenues selon le protocole de sonication déjà décrit au paragraphe **I.2.4.2**.

Nous avions mené l'étude de preuve de concept de chimie *in situ* en utilisant le sel d'ammonium du Krytox comme tensioactif pour stabiliser les émulsions primaires encapsulées dans les microgouttes. Cependant, pour l'étude *in vitro*, l'utilisation d'un nouveau tensioactif a été envisagée. En effet, le sel d'ammonium présentait plusieurs inconvénients. Tout d'abord, l'étude de biodistribution menée par nos collaborateurs de l'Institut Langevin a montré que ce tensioactif provoquait de graves inflammations pulmonaires sur les souris traitées par les microgouttes de PFC, probablement du fait d'une intoxication à l'ammoniac liée à la structure même du tensioactif. Dans la perspective d'utiliser à terme des microgouttes pour traiter des tumeurs, il était donc nécessaire de trouver une alternative au sel d'ammonium du Krytox. Notre choix s'est très vite porté sur un copolymère non ionique de structure Krytox-PEG-Krytox (« PEG-di-Krytox »). La biocompatibilité de ce tensioactif ainsi que sa capacité à stabiliser des émulsions d'eau dans le perfluorocarbone ont été établies par Holtze *et al.*[96] Ainsi, si l'on compare le vieillissement de deux émulsions primaires de HMR1826 dans le PFC stabilisées respectivement par le sel d'ammonium du Krytox ou par le PEG-di-Krytox commercial (Schéma I.20), on constate une nette différence de stabilité (Figure I.38).

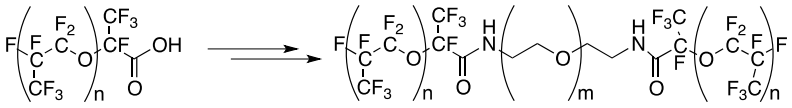


Schéma I.20. Structure du tensioactif PEG-di-Krytox dérivé du Krytox commercial.

On note en particulier une densification de l'émulsion stabilisée par le K-NH_4^+ (Figure I.38, 1) ainsi que l'apparition d'une zone plus colorée et non fluide (Figure I.38, 2). Enfin, du PFC incolore et démixé du reste de l'émulsion apparaît sous l'émulsion (Figure I.38, 3) alors que l'émulsion stabilisée par le PEG-di-Krytox présente un aspect homogène même après 72 h.

[96] Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angilè, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Köster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632-1639.

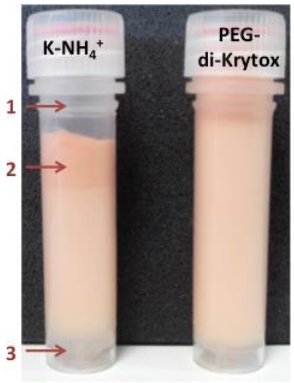


Figure I.38. Evolution à +72 h de deux émulsions de HMR1826 dans le PFC, stabilisées respectivement par le sel d'ammonium du Krytox ($K\text{-}NH_4^+$) ou par le copolymère de Krytox (PEG-di-Krytox).

Finalement, si nous avons majoritairement utilisé le PEG-di-Krytox pour l'encapsulation et le largage ultrasonore de la MMAE, certaines expériences préliminaires avec le HMR1826 ont été réalisées avec des émulsions stabilisées par le $K\text{-}NH_4^+$. La nature du tensioactif fluoré utilisé sera donc précisée pour chaque série d'expériences.

Les microgouttes de PFC utilisées pour l'étude *in* vitro sont produites à partir des émulsions primaires stabilisées par l'un ou l'autre des tensioactifs fluorés. Le système microfluidique parallélisé décrit précédemment nous a permis de produire jusqu'à 50 µL de gouttes par heure. Après la production des gouttes, le surnageant composé d'une solution de PBS 1X + 3% w/v de Pluronic-F68 a été remplacé par une nouvelle solution de PBS 1X contenant non seulement le tensioactif mais également des antibiotiques (pluronic-F68 3% w/v, pénicilline/streptomycine 2X, gentamycine 2X, kanamycine 2X) afin de prévenir tout développement bactérien. Ces microgouttes sont ensuite stockées à 4 °C pendant 48 h avant d'être mises en suspension dans du milieu de culture et avant utilisation.

I.4.4 Conditions expérimentales

I.4.4.1 Montage expérimental

Les tests de prolifération cellulaire ont menés dans des plaques 96 puits, cependant, le fond des puits des plaques commerciales étant constitué d'un plastique trop épais pour être perméable aux ultrasons, il nous a été nécessaire pour poursuivre notre étude de développer des supports à la fois adaptés aux contraintes liées à la culture cellulaire mais également à celles liées à la focalisation des ultrasons sur les cellules en culture. Nous avons donc assemblé nous-mêmes nos plaques à partir de plaques 96 puits sans fond et de feuilles de Mylar, un plastique fin et transparent aux ultrasons. Ces deux composants ont été assemblés à l'aide de colle epoxy à séchage lent (Figure I.39).

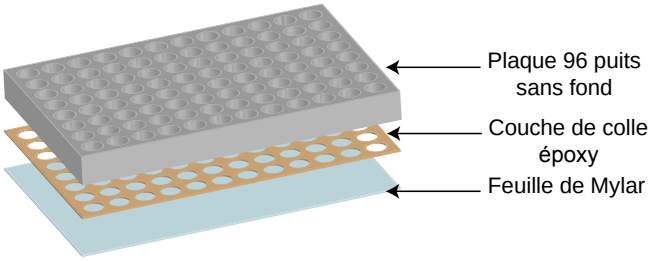


Figure I.39. Structure des plaques 96 puits « Mylar » utilisées.

Ces plaques ont ensuite été immergées dans un bain d'eau et le fond du puits en cours d'étude a été placé à la focale d'un transducteur monoélément de fréquence centrale 2.25 MHz (Figure I.40). Quatre tirs ultrasonores ont été focalisés sur chaque puits, chaque tir étant composé d'un pulse de 5 cycles d'amplitude 800 mVpp (environ 11 MPa PNP) et de fréquence 1.5 MHz.

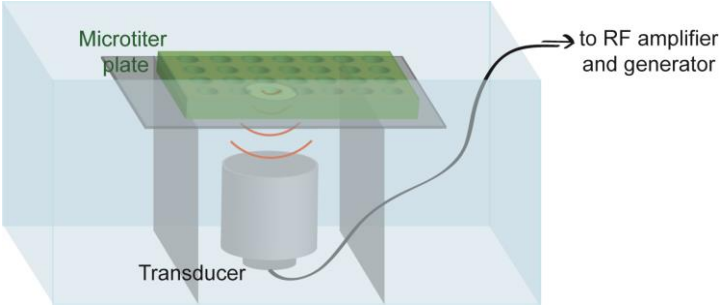


Figure I.40. Montage expérimental pour le largage de microgouttes de PFC *in vitro* dans des plaques 96 puits.

Environ 15 h avant le dépôt des gouttes et leur largage dans les plaques 96 puits, des cellules sont ensemencées dans ces plaques. Plusieurs lignées cellulaires ont été testées lors d'expériences préliminaires (A549 = adénocarcinome humain pulmonaire, KB = carcinome humain de la bouche, et A2780 = carcinome humain ovarien). Après quelques expériences préliminaires sur la lignée A549, nous avons ensuite travaillé avec la lignée qui semblait répondre le mieux à l'action du HMR1826 et de la MMAE-glu par la β-glucuronidase, à savoir la lignée KB.

I.4.4.1 Protocoles de délivrance

Le point le plus crucial de cette étude reposait bien évidemment sur l'évaluation de la prolifération cellulaire de la lignée KB sous l'effet de la délivrance d'une pro-drogue d'une molécule anticancéreuse et l'activation de cette pro-drogue par une enzyme présente en solution.

Afin d'évaluer l'effet de la délivrance, deux protocoles expérimentaux ont été suivis.

- Le premier, appelé « protocole de contact », consistait à déposer 70 µL d'une suspension de gouttes dans le milieu de culture directement dans les puits d'une plaque 96-puits avec un fond en Mylar, en présence des cellules préalablement ensemencées. Lorsque cela est nécessaire, 4 tirs ultrasonores ont été focalisés sur chaque puits, et/ou 5 µL d'une solution de β-glucuronidase d'origine bactérienne (*E. Coli*) ont été ajoutés à la suspension de gouttes (40u/puits). L'ensemble a ensuite été incubé à 37 °C pendant 72 h, et la prolifération cellulaire a été évaluée au terme de cette période d'incubation grâce à un test « XTT » (*cf* paragraphe **I.4.4.2**).
- Dans le cadre du second protocole, appelé « protocole de transfert », 90 µL d'une suspension de gouttes de concentration donnée ont été déposés dans des puits d'une plaque 96-puits avec un fond en Mylar. Sur la moitié d'entre eux, 4 tirs ultrasonores ont été appliqués afin de larguer le contenu des microgouttes de PFC déposées. A la suite de cette opération, le contenu de chaque puits a été transféré dans un tube de 1.5 mL, centrifugé, et 70 µL du surnageant de chacun des tubes ont été transférés dans un autre puits dans lequel des cellules KB avaient été mises en culture (Figure I.41). 5 µL d'une solution de β-glucuronidase (40 u/puits) ont ensuite été ajoutés dans chacun des puits de transfert où cela était nécessaire. Après 72 h d'incubation, la prolifération cellulaire a été déterminée par test XTT. Une telle opération nous a permis d'évaluer l'effet du largage de la pro-drogue et son activation par l'enzyme appropriée. Cet effet a été ici libéré du biais expérimental consistant à laisser les gouttes en présence de cellules dans l'incubateur pendant 72h, ce qui serait une situation peu réaliste *in vivo*. L'effet du largage a alors pu être comparé à l'effet du produit éventuellement présent dans le surnageant de manière passive, autrement dit à cause de fuites hors des gouttes.

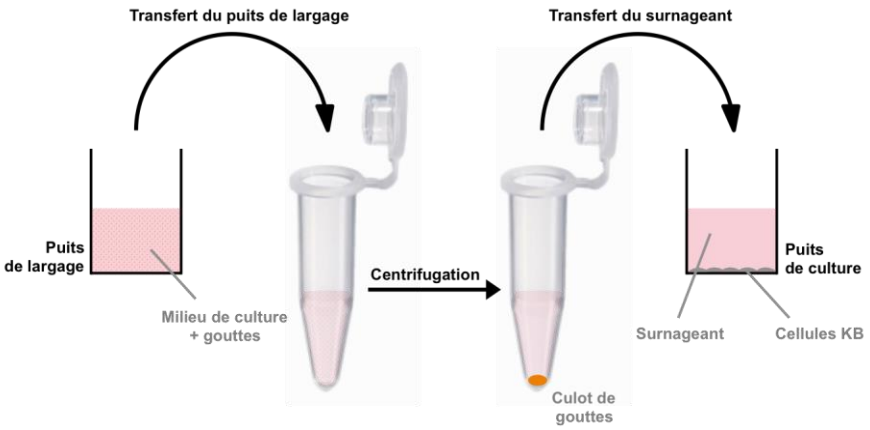


Figure I.41. Protocole de transfert du surnageant des puits de largage vers les puits de culture. L'étape de centrifugation permet d'éliminer les microgouttes de PFC non larguées.

I.4.4.2 Traitement des données expérimentales

La prolifération cellulaire dans chaque puits a été évaluée à l'aide d'un test colorimétrique standard, le test « XTT ». Ce dernier a permis une lecture par densité optique de la population cellulaire de chaque puits de culture. Pour chaque condition expérimentale testée, un triplicat a été réalisé, et la moyenne des valeurs de ce dernier a été normalisée par la valeur obtenue pour des cellules non-traitées (témoin positif). Chaque condition a été testée au moins trois fois, sauf lorsque le contraire est précisé. Tous les résultats obtenus ont été présentés dans cette étude sous forme d'une moyenne de ces trois (ou plus) expériences, associée à un écart type représentant la dispersion des données obtenues.

I.4.5 Résultats et discussion

I.4.5.1 Contrôles

Dans un premier temps, il était crucial pour notre étude de procéder à un certain nombre d'expériences de contrôle. En particulier, il nous fallait :

- vérifier l'effet des impulsions ultrasonores sur la prolifération cellulaire de la lignée sélectionnée
- vérifier la toxicité intrinsèque de nos microgouttes de perfluorocarbone. Pour cela, il était nécessaire d'observer l'évolution d'une population cellulaire en présence de gouttes « vides », c'est à dire ne contenant aucune molécule toxique,
- vérifier l'effet de la vaporisation de la matrice des microgouttes de PFC sous l'effet des ultrasons sur les cultures cellulaires.

Pour cela, nous avons conçu et produit des gouttes contenant une solution commerciale de PBS 10X (solution saline).

Dans un premier temps, l'émulsion primaire contenue dans ces gouttes de PBS a été stabilisée par le sel d'ammonium dérivé du krytox commercial. Une suspension de gouttes à 2% v/v dans le milieu de culture a été mise en contact avec les cellules en culture. Des ultrasons ont ensuite été focalisés sur les puits concernés. Après 72 h d'incubation à 37 °C, la densité de la population cellulaire dans chaque puits a été déterminée par « XTT ».

Comme on peut le constater sur la Figure I.42, l'application de 4 tirs ultrasonores sur les cellules KB en culture (« ultrasons ») n'affecte pas la viabilité de ces dernières. De plus, la présence de gouttes contenant uniquement une solution saline (« gouttes ») ne semble pas non plus induire une diminution de la prolifération cellulaire, ce qui tend à indiquer que les différents éléments entrant dans la composition des gouttes tels que les tensioactifs ou le PFC ne présentent pas de toxicité envers la lignée

cellulaire testée. Enfin, la vaporisation de la matrice des gouttes sous l'effet des ultrasons (« gouttes + ultrasons ») n'a pas eu d'effet significatif sur la prolifération des populations cellulaires. Ces résultats de contrôle nous indiquent que tout effet observé par la suite sur la viabilité des cellules proviendra de la toxicité des composés largués dans le milieu et non d'une toxicité intrinsèque à la composition des gouttes, aux ultrasons, ou à l'explosions de ces gouttes.

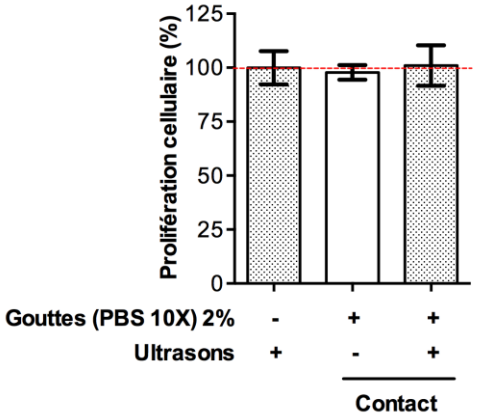


Figure I.42. Prolifération cellulaire (lignée KB) normalisée par la prolifération des cellules non-traitées, cas de gouttes de PBS stabilisées par du K-NH_4^+.

Dans un second temps, nous avons mesuré les éventuels effets de toxicité intrinsèque des gouttes « vides » de solution saline, mais cette fois-ci stabilisées par un autre tensioactif dérivé du krytox, non ionique : le PEG-di-krytox.

Nous avons ainsi testé deux suspensions de gouttes de PBS à des concentration différentes : 2% v/v et 0.01% v/v de gouttes dans du milieu de culture respectivement. Les différentes conditions de contrôle ont été testées suivant les 2 protocoles de « contact » et « transfert » décrits au paragraphe **I.4.4.1**. De manière similaire aux résultats obtenus précédemment pour le krytox sous forme de sel d'ammonium (K-NH_4^+), aucune toxicité inhérente à la composition des gouttes, à la focalisation des ultrasons sur les cellules, ou encore à la vaporisation de la matrice de PFC des gouttes n'a été observée. Au contraire, on remarque de manière étonnante que la présence de ces microgouttes au contact des cellules KB pendant 72 h induit une légère stimulation de la prolifération cellulaire. En cas de transfert, on retrouve des valeurs proches de 100% de prolifération (Figure I.43 et Figure I.44).

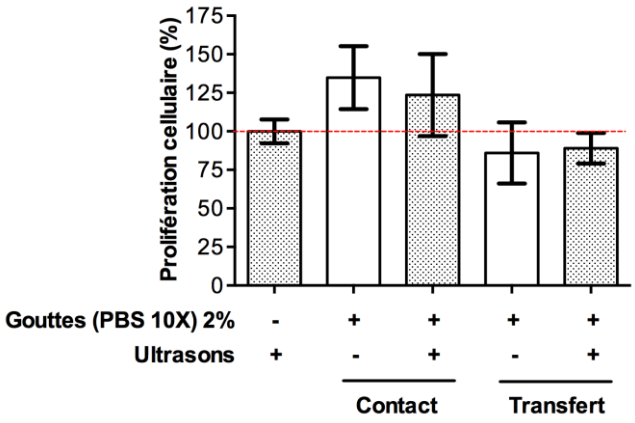


Figure I.43. Prolifération cellulaire (lignée KB) normalisée par la prolifération des cellules non-traitées, cas de gouttes de PBS 10X (suspension à 2% v/v dans du milieu de culture) stabilisées par du PEG-di-krytox.

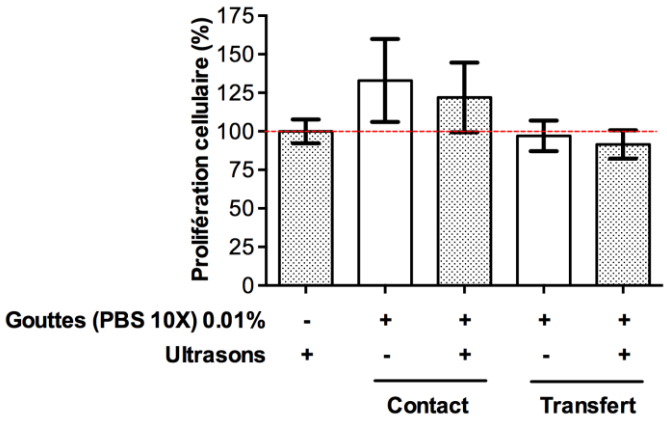


Figure I.44. Prolifération cellulaire (lignée KB) normalisée par la prolifération des cellules non-traitées, cas de gouttes de PBS 10X (suspension à 0.01% v/v dans du milieu de culture) stabilisées par du PEG-di-krytox.

Cette stimulation de la prolifération en cas de contact prolongé s'avère significative par rapport aux cellules non traitées. La seule différence entre les deux types de gouttes testées réside dans la nature du surfactant fluoré. On peut donc légitimement supposer que ce dernier influence positivement une chaîne de réplication au sein des cellules KB étudiées. Cependant, nous n'avons pas souhaité étudier plus en détails cette propriété au cours de cette étude.

I.4.5.2 Délivrance de HMR1826/doxorubicine

Une suspension à 2% v/v de microgouttes (stabilisées par du K-NH_4^+ et contenant du HMR1826 à 4.5 mM) dans du milieu de culture a été préparée. 90 µL de cette suspension ont été déposés sur des cellules A549 préalablement ensemencées et nous avons réalisé des expériences préliminaires avec ou sans largage ultrasonore. L'enzyme a ensuite été ajoutée lorsque nécessaire (40 u par puits) et

l'ensemble a été incubé pendant 72 h (protocole de « contact ») avant lecture des plaques par XTT. Ces résultats (expérience unique) sont reportés sur la Figure I.45. nous pouvons ainsi souligner plusieurs points :

- La présence de gouttes de HMR1826 ne semble pas affecter la prolifération cellulaire
- Le largage par ultrasons de la pro-drogue glucuronylée de la doxorubicine conduit à une prolifération quasi-normale des cellules (91%). Cela est cohérent avec la toxicité faible du HMR1826.
- Les gouttes de HMR incubées en présence de β-glucuronidase mènent à une prolifération altérée de 76% : il s'agit probablement de l'activation par l'enzyme des fuites « passives » de la pro-drogue hors des microgouttes.
- Enfin, dans le cas où les microgouttes ont été larguées en présence de β-glucuronidase, on observe une prolifération cellulaire significativement plus faible que la normale, à 56%. Ce résultat semble indiquer qu'il est possible d'initier la conversion locale du HMR1826 en sa forme active, activation résultant en une toxicité accrue sur les cellules cancéreuses A549 étudiées.

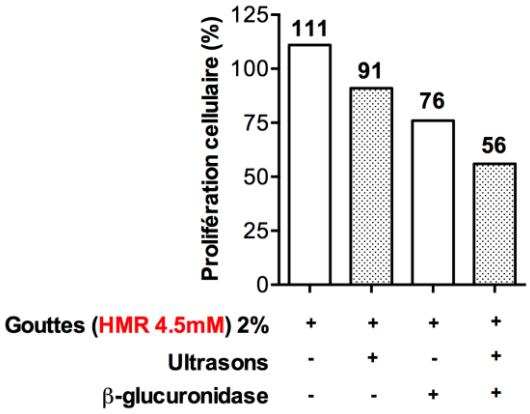


Figure I.45. Prolifération cellulaire (lignée A549) normalisée par la prolifération des cellules non-traitées, cas de gouttes de HMR1826 stabilisées par du K-NH_4^+, avec/sans enzyme et avec/sans ultrasons.

Par la suite, il nous a été très difficile de reproduire ce résultat sur la lignée A549. Nous avons donc finalement opté pour l'étude de la lignée KB. En suivant le même protocole (contact) que celui décrit précédemment, on obtient les résultats représentés sur la Figure I.46. Cela confirme la tendance observée précédemment d'un gain de cytotoxicité par largage ultrasonore en présence d'enzyme.

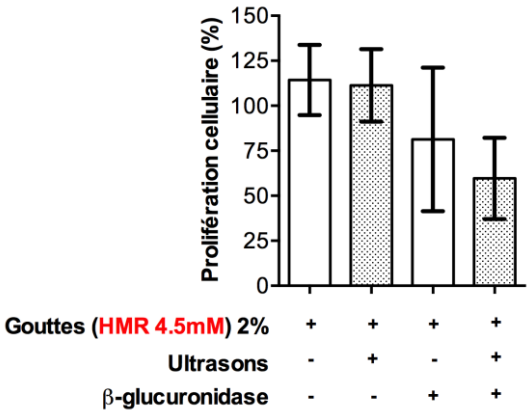


Figure I.46. Prolifération cellulaire (lignée KB) normalisée par la prolifération des cellules non-traitées, cas de gouttes de HMR1826 stabilisées par du K-NH_4^+, avec/sans enzyme et avec/sans ultrasons.

Ces résultats se sont révélés particulièrement intéressant, montrant que le largage par ultrasons d'une partie des gouttes en présence d'enzyme permettant effectivement d'initier la conversion de la pro-drogue glucurolylée en sa forme active. Pour la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'encapsulation d'une une molécule encore plus toxique et potentiellement plus intéressante : la monométhylauristatine E (MMAE), et sa pro-drogue, la MMAE-glu.

I.4.5.3 Délivrance de MMAE-glu/MMAE

I.4.5.3.(1) Expériences en transfert

La monométhylauristatin E (MMAE) étant une drogue environ 1000 fois plus toxique que la doxorubicine, une concentration trop élevée dans les gouttes mène à une mortalité totale des populations cellulaires mises en contact avec ces gouttes. En effet, même une très faible fuite du produit hors des gouttes suffit à induire, avec ou sans largage, une prolifération cellulaire proche de zéro. En particulier, on observe sur la Figure I.47 que pour une concentration en MMAE-glu *intra-gouttes* de 0.5 mM (notée MMAE-glu 5X), et une exposition systématique à la β-glucuronidase, toutes les suspensions de microgouttes étudiées (concentrations en gouttes entre 1% et 0.005%) conduisent à une prolifération cellulaire très faible, comprise entre 11% et 33%, avec ou sans largage ultrasonore. Néanmoins, à partir de 0.025% de gouttes en suspension, il semble que le largage ultrasonore induise une surmortalité par rapport au cas de non-largage. Cette différence est cependant trop faible pour être exploitable dans le cadre de la chimie *in situ*.

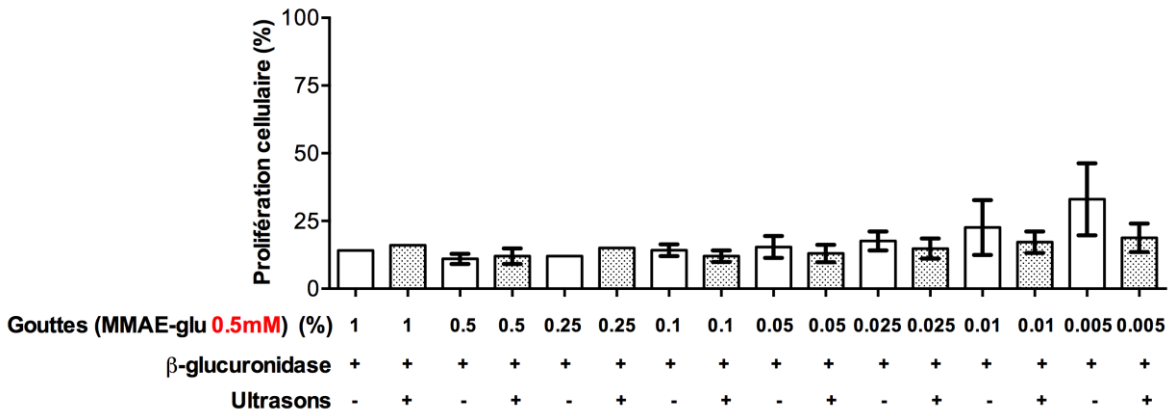


Figure I.47. Effet sur la prolifération de cellules KB de suspensions à différentes concentrations (v/v) de gouttes de MMAE-glu 5X (concentration d'encapsulation = 0.5 mM) avec/sans largage et après transfert du surnageant et incubation en présence de β-glucuronidase.

Bien que les résultats en présence d'enzyme montrent que cette concentration d'encapsulation en MMAE-glu est trop élevée, il est tout de même intéressant d'étudier ces mêmes gouttes en l'absence de β-glucuronidase, avec ou sans largage ultrasonore. Les résultats obtenus dans ces conditions sont rassemblés dans la Figure I.48. Nous avons vu que la MMAE-glu avait une toxicité environ 100 fois moindre par rapport à la MMAE. Cependant, cette dernière étant particulièrement active, des suspensions concentrées en pro-drogue induisent tout de même une mortalité non négligeable (seulement 21% à 72% de prolifération cellulaire pour les suspensions de concentrations supérieures à 0.05%). Il faut noter que malgré tout, dans ces derniers cas, le largage par ultrasons engendre une surmortalité par rapport aux fuites seules. A plus faible concentration en gouttes, la prolifération cellulaire redevient normale (88% à 96%), avec ou sans largage ultrasonore.

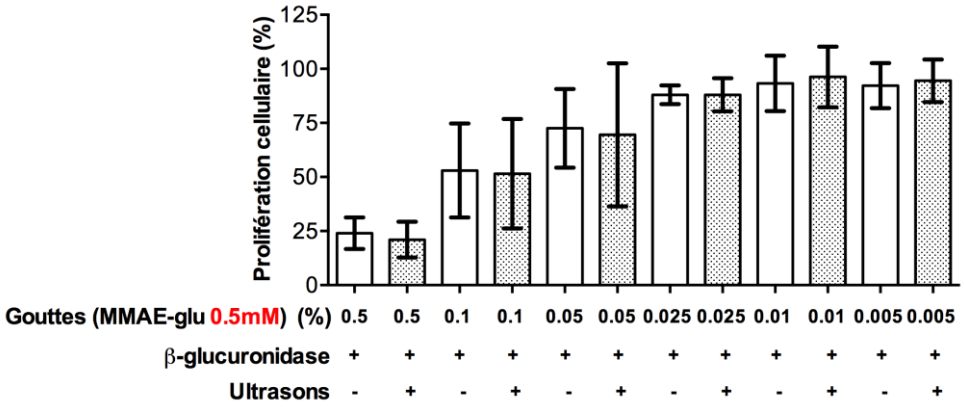


Figure I.48. Effet sur la prolifération de cellules KB de suspensions à différentes concentrations (v/v) de gouttes de MMAE-glu 5X (concentration d'encapsulation = 0.5 mM) avec/sans largage et après transfert du surnageant et incubation.

Suite à ces résultats, l'étude n'a pas été poursuivie avec les gouttes de MMAE-glu 5X, ces dernières s'étant révélées trop concentrées pour évaluer l'effet du largage sur la prolifération cellulaire de la lignée KB. La concentration *intra-gouttes* a ainsi été réduite à 0.1 mM (MMAE-glu 1X). Nous avons tout d'abord étudié la prolifération cellulaire en présence d'enzyme, avec ou sans largage ultrasonore. Comme précédemment, nous avons testé une gamme de suspensions de gouttes allant de 1% v/v à 0.005% v/v (Figure I.49). Dans chaque cas, nous avons comparé l'effet du largage avec celui des fuites. Comme pour la MMAE-glu 5X, les suspensions les plus concentrées (1% à 0.025%) donnent peu de différences entre les deux cas (+/- ultrasons). La suspension à 0.01% en gouttes semble la plus prometteuse. En effet, en l'absence de largage ultrasonore, la prolifération cellulaire en présence d'enzyme atteint 85% de la référence « non traitée ». L'exposition à 4 pulses ultrasonores mène à une chute de la prolifération à 44%. C'est la seule suspension pour laquelle on observe une telle différence entre ces deux conditions. Enfin, la suspension à 0.005% en gouttes semble trop diluée pour induire une mortalité cellulaire conséquente (87% de prolifération sans largage et 75% avec largage).

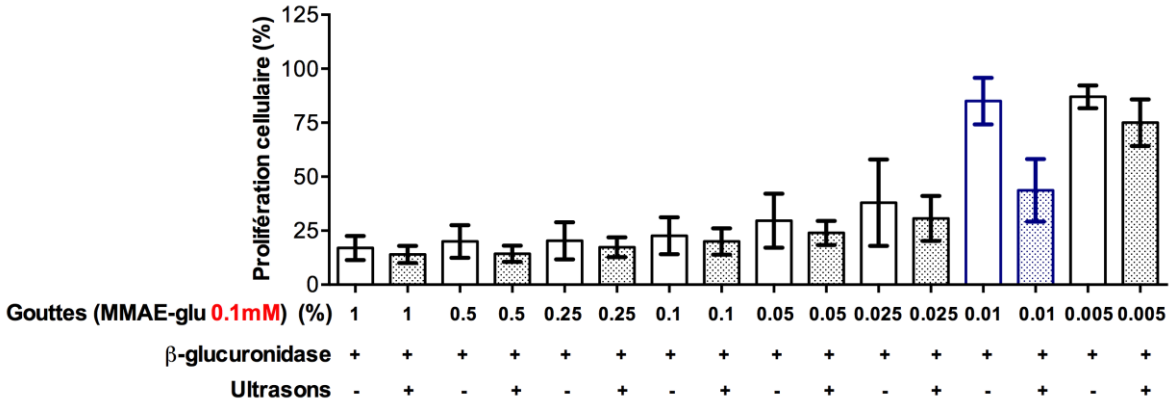


Figure I.49. Effet sur la prolifération de cellules KB de suspensions à différentes concentrations (v/v) de gouttes de MMAE-glu 1X (concentration d'encapsulation = 0.1 mM) avec/sans largage et après transfert du surnageant et incubation en présence de β-glucuronidase.

En l'absence de β-glucuronidase, on obtient pour la MMAE-glu 1X les résultats de prolifération cellulaire présentés dans la Figure I.50. Ainsi, pour des concentrations inférieures à 0.1% en gouttes, la prolifération cellulaire n'est plus affectée par la présence des gouttes, avec ou sans largage. A 0.25% en gouttes, la prolifération est normale en l'absence de largage ultrasonore (97%). En cas de largage, elle chute légèrement à 91% en moyenne. Dans le cas de l'utilisation de fortes concentrations en gouttes (1% et 0.5%), la prolifération décroît entre 52% et 76% de sa valeur de référence.

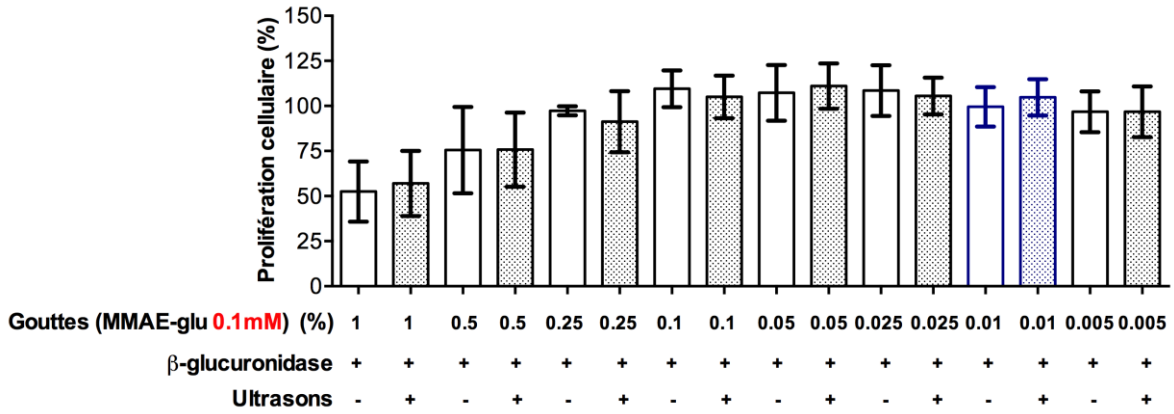


Figure I.50. Effet sur la prolifération de cellules KB de suspensions à différentes concentrations (v/v) de gouttes de MMAE-glu 1X (concentration d'encapsulation = 0.1 mM) avec/sans largage et après transfert du surnageant et incubation.

Si on compare les résultats obtenus avec la MMAE-glu 1X avec des expériences similaires sur des gouttes de MMAE 1X, on obtient les valeurs de prolifération cellulaires présentées Figure I.51. Pour des suspensions à 0.025% et plus concentrées, on observe une mortalité presque totale des cultures cellulaires. A partir, de 0.01% de gouttes dans le milieu de culture, on restaure une prolifération cellulaire presque normale (68% à 87% de prolifération selon les conditions).

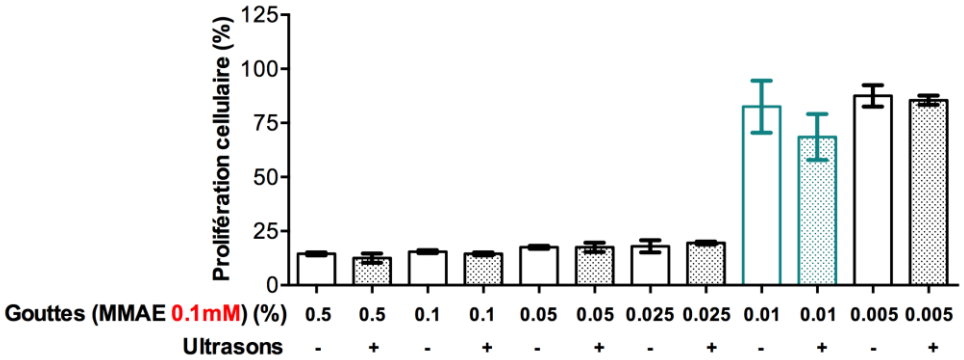


Figure I.51. Effet sur la prolifération de cellules KB de suspensions à différentes concentrations (v/v) de gouttes de MMAE 1X (concentration d'encapsulation = 0.1 mM) avec/sans largage et après transfert du surnageant et incubation.

A la suite de cette étude, il semble donc que les suspensions à 0.01% v/v de gouttes de MMAE et de MMAE-glu dans le milieu de culture donnent les meilleurs résultats. Ces derniers sont résumés sur la Figure I.52. On obtient finalement un gain de 48% de la mortalité cellulaire en cas de largage de la pro-drogue par ultrasons en présence d'enzyme par rapport à la quantité de produit activé par l'enzyme en cas de fuite « passive » hors des microgouttes.

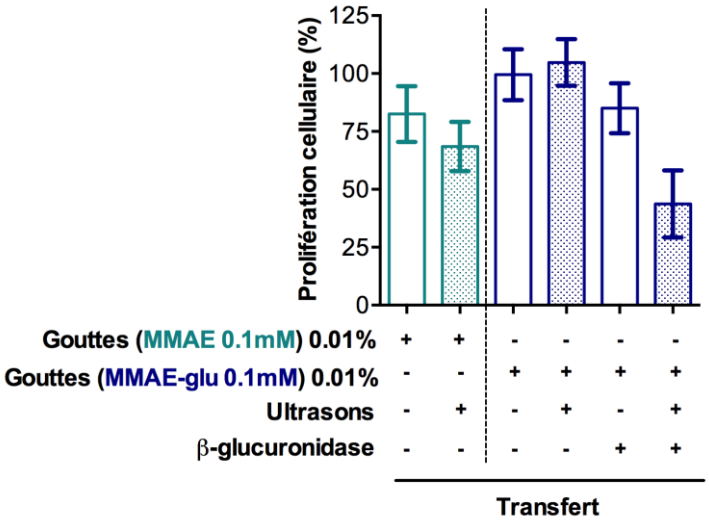


Figure I.52. Bilan des résultats obtenus en termes de prolifération des cellules KB pour des suspensions de gouttes de MMAE et MMAE-glu 1X à 0.01% (concentration d'encapsulation = 0.1 mM).

Nous avons ainsi pu montrer qu'il était possible d'initier *in vitro* la conversion locale de la MMAE-glu en sa forme active, la MMAE, par largage ultrasonore localisé et spécifiquement en présence de la β-glucuronidase. En l'absence de cette dernière, la prolifération cellulaire n'est pas affectée par le largage de la MMAE-glu, celle-ci étant significativement moins toxique que sa forme activée.

I.4.5.3.(2) Expériences avec contact de 72 h

Nous avons souligné précédemment que le protocole de « contact » était peu réaliste *in vivo*, les gouttes ayant peu de chances de s'accumuler dans un même endroit pendant 72 h. Cependant, il n'en est pas moins intéressant d'observer l'effet du contact prolongé avec les gouttes de MMAE ou MMAE-glu sur la prolifération cellulaire dans les conditions identifiées lors de l'étude « en transfert » (concentration intragouttes à 0.1 mM, suspension à 0.01% v/v). En effet, cela nous donne un aperçu de l'effet à plus long terme de la fuite « passive » hors des microgouttes des produits encapsulés sur la prolifération cellulaire. A cette fin, des microgouttes de PFC contenant respectivement de la MMAE 1X ou de la MMAE-glu 1X ont été mises en suspension dans du milieu de culture (0.01% v/v). 70 µL de la suspension de microgouttes a ensuite été mise en contact avec des cellules KB et incubés à 37 °C pendant 72 h. La prolifération cellulaire a été évaluée après ces 72 h d'incubation par test colorimétrique XTT. Les résultats normalisés par la prolifération des cellules non-traitées sont rassemblés dans la Figure I.53. En présence de gouttes de MMAE, avec/sans ultrasons et avec/sans enzyme, la prolifération cellulaire est très altérée par rapport au contrôle positif. Elle est en moyenne de 30% de la valeur de référence. En présence de gouttes de MMAE-glu cependant, en l'absence de β-glucuronidase, la prolifération est normale et proche de 100%. En présence d'enzyme mais sans largage, une certaine cytotoxicité a été observée. Cette dernière a encore été accentuée en cas de largage. Les résultats obtenus

sont donc similaires à ceux observés pour le protocole de transfert, avec une accentuation du phénomène de fuites. Cette augmentation des fuites est cependant cohérente avec le fait de laisser les gouttes dans le milieu de culture à température élevée pendant 3 jours.

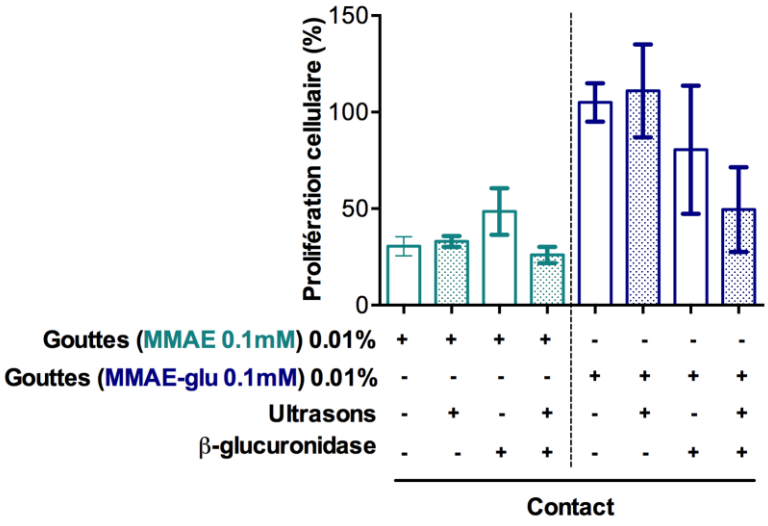


Figure I.53. Prolifération cellulaire en cas de contact prolongé (72 h) avec des gouttes de MMAE ou MMAE-glu (suspension à 0.01% v/v, concentration intragouttes de 0.1 mM), avec ou sans largage ultrasonore, avec ou sans β-glucuronidase.

I.4.6 Conclusion de l'étude *in vitro*

Au cours de cette étude *in* vitro, nous avons pu montrer qu'il était possible d'initier *in vitro* la conversion locale du HMR1826 en sa forme active, cette activation résultant en une toxicité accrue sur les cellules cancéreuses A549 et KB étudiées. Par la suite, en raison de la difficulté à obtenir des résultats reproductibles avec le couple DOX/HMR1826, nous avons concentré nos efforts sur le couple MMAE/MMAE-glu. Nous avons ainsi montré que dans le cadre du protocole dit de « transfert », pour une concentration en gouttes de MMAE-glu 1X dans le milieu de culture valant 0.01% v/v, le largage ultrasonore des microgouttes de PFC contenant la pro-drogue glucuronylée de la MMAE conduisait en présence d'enzyme à une prolifération cellulaire environ deux fois plus faible qu'en l'absence de largage. En cas de contact prolongé (72 h), ce gain n'est plus que de 38% entre largage et non-largage. Quels que soient les cas étudiés, nous avons montré l'avantage d'encapsuler une pro-drogue par rapport à la molécule active. En effet, les microgouttes contenant de la MMAE présentent systématiquement une toxicité passive plus élevée que les microgouttes de MMAE-glu. D'autre part, il est possible de restaurer la cytotoxicité de la MMAE par largage de la MMAE-glu en présence d'un partenaire réactionnel, en l'occurrence la β-glucuronidase.

I.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé un nouveau concept, appelé « chimie *in situ* », dans le but de développer une nouvelle stratégie de délivrance ciblée de composés anticancéreux et ainsi augmenter l'index thérapeutique de ces traitements tout en améliorant leurs propriétés pharmacologiques. Cette stratégie de chimie « *in situ* » consiste à générer une drogue toxique directement sur le site à traiter (dans une tumeur en l'occurrence), à partir de précurseurs peu ou non-toxiques. Ces précurseurs sont encapsulés dans des microgouttes de perfluorocarbone développées au laboratoire (des transporteurs sensibles aux ultrasons focalisés) et délivrés *in situ* pour générer le produit thérapeutique. Dans le cadre de la « chimie *in* situ », deux niveaux de contrôle permettent de limiter les doses toxiques au niveau des tissus sains. En premier lieu, comme dans le cas d'une stratégie de délivrance standard, la matrice de PFC de nos microgouttes permet d'isoler le composé encapsulé du milieu extérieur. En outre, en cas de largage non-spécifique (fuites hors des gouttes par exemple), le produit libéré étant non-toxique, il reste donc *a priori* inoffensif pour les tissus rencontrés.

Au cours de cette étude de « chimie *in situ* », nous avons ainsi été en mesure de réaliser une preuve de concept en canal microfluidique au cours de laquelle une réaction de cycloaddition non-catalysée entre un azoture et un alcyne contraint dans un cycle à 8 chaînons a pu être initiée de manière temporellement et spatialement contrôlée grâce à l'encapsulation de l'un des partenaires réactionnels dans des microgouttes de perfluorocarbone et à leur libération contrôlée sous l'effet d'ultrasons cliniques.

Cette stratégie a ensuite été appliquée à une étude *in vitro*, menée en collaboration avec l'équipe du Professeur Sébastien Papot à l'Université de Poitiers. Au cours de cette étude, nous avons pu encapsuler deux pro-drogues dérivées de deux molécules anticancéreuses : la doxorubicine et la monométhylauristatine E (MMAE). Ces pro-drogues ont l'avantage d'être 100 à 1000 fois moins toxiques que la molécule d'origine. La mise en présence de ces pro-drogues avec une enzyme, la β-glucuronidase, permet de restaurer leur activité anticancéreuse. Nous avons ainsi pu montrer qu'il était possible d'encapsuler ces composés dans des microgouttes de PFC. Le largage ultrasonore de ces dernières en présence de β-glucuronidase permet d'initier leur conversion en leur forme active. Cela entraîne une diminution de la prolifération cellulaire allant jusqu'à 50% de la prolifération obtenue en présence de la forme encapsulée de ces molécules.

I.6. Perspectives

A plus long terme, il sera nécessaire d'évaluer avec précision la biodistribution des microgouttes *in vivo*. En effet, s'il est crucial de connaître le temps de circulation de ces microgouttes après injection intraveineuse, il est également important d'identifier quels organes filtrent et éliminent les microgouttes

de PFC. La taille de ces objets semble *a priori* trop importante pour qu'ils soient éliminés par la voie rénale, mais trop faible pour être filtrés par les poumons. Il semblerait donc probable que ce soit le foie qui assure cette fonction de filtrage et d'élimination des microgouttes. Une première étude par Fabiilli *et al.* semble confirmer cette hypothèse[97] et des travaux sont actuellement en cours à l'Institut Langevin pour déterminer, à l'aide d'une méthode optique, les zones d'accumulation naturelle de ces microgouttes.

Une fois ces éléments en main, et en vue des résultats prometteurs obtenus lors de l'étude *in vitro* d'activation enzymatique de pro-drogues glucuronylées, il sera possible de réaliser ce type d'activation *in vivo*, sur des animaux xénogreffés par exemple.

Enfin, l'activation de pro-drogues glucuronylées est loin d'être la seule application possible au principe de « chimie *in situ* ». En particulier, il serait possible d'envisager une activation chimique plutôt qu'enzymatique de pro-drogues : des réactions telles que la ligation de Staudinger[98] ou encore des réactions de Diels-Alder à demande électronique inverse[99] ont d'ores et déjà été considérées comme de bons candidats pour activer des pro-drogues de la doxorubicine, et pourraient être adaptées à l'utilisation de microgouttes de PFC et d'une libération ultrasonore mettant en contact les partenaires réactionnels.

Outre la doxorubicine et les autres molécules anticancéreuses communément utilisées dans le traitement du cancer, il serait même possible d'envisager de nouveaux traitements grâce à la chimie *in situ*. En particulier, il serait envisageable de vectoriser dans les microgouttes certaines enzymes du cytochrome P450 capables de métaboliser le paracétamol (ou acétaminophène).[100][101] Ce dernier est un produit analgésique très utilisé dans le monde et très bien toléré par les patients. Cependant, un surdosage de paracétamol peut engendrer des lésions du foie parfois mortelles. En effet, ce composé est métabolisé par le foie selon trois voies métaboliques. Les deux premières, conduisant aux dérivés sulfate et glucuronide, sont inoffensives. En cas de surdosage, une voie normalement mineure, à savoir l'oxydation par le système hépatique du cytochrome P450, est activée et libère un métabolite toxique, le *N*-acétylbenzoquinonéimine (NABQI). Bien que ce dernier soit en temps normal détoxifié par conjugaison avec du glutathion réduit (GSH), en cas de surdosage, suffisamment de NABQI est alors formé pour saturer tout le GSH hépatique, conduisant alors à une accumulation de ce produit toxique dans les tissus et à de la mort cellulaire.[102] On pourrait ainsi envisager d'exploiter ce métabolite toxique dans l'optique de détruire des cellules tumorales. En effet, si l'on encapsulait l'enzyme responsable de

---

[97] Fabiilli, M. L.; Piert, M. R.; Koeppe, R. A.; Sherman, P. S.; Quesada, C. A.; Kripfgans, O. D. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 366-374.

[98] van Brakel, R.; Vulders, R. C. M.; Bokdam, R. J.; Grüll, H.; Robillard, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 714-718.

[99] Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112-14116.

[100] Thatcher, N. J.; Edwards, R. J.; Lemoine, N. R.; Doehmer, J.; Davies, D. S. *Cancer Gene Therapy* **2000**, *7*, 521-525.

[101] Denny, W. A. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *1*, 48-70.

[102] Reid, A. B.; Kurten, R. C.; McCullough, S. S.; Brock, R. W.; Hinson, J. A. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2004**, *312*, 509-516.

cette chaîne métabolique dans des microgouttes de PFC, et que l'on faisait ingérer au patient du paracétamol, qui serait donc en libre circulation dans le sang, alors la libération locale de l'enzyme du cytochrome P450 permettrait la conversion également locale du paracétamol en NABQI et un effet cytotoxique sur les cellules adjacentes.

Enfin, les zones tumorales possédant des caractéristiques physiologiques différentes des zones saines (un pH local différent par exemple), les enzymes endogènes peuvent perdre de leur efficacité au niveau du milieu tumoral/extra-tumoral. Dans l'optique d'encapsuler des enzymes, comme proposé pour le système paracétamol/cytochrome P450, il serait envisageable de transporter dans des microgouttes de PFC des enzymes bactériennes. Ces dernières, judicieusement choisies, pourraient alors présenter de meilleures activités que les enzymes endogènes dans les conditions physiologiques tumorales.

I.7. Partie expérimentale

I.7.1 Généralités

Les réactions conduites en milieu anhydre sont réalisées dans une verrerie séchée à l'étuve ou à la flamme et sous atmosphère d'argon.

L'éther éthylique (Et_2O) et le tétrahydrofurane (THF) ont été distillés sur sodium/benzophénone. Le dichlorométhane (CH_2Cl_2), la triéthylamine (Et_3N) et la *N*,*N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) ont été distillés sur CaH_2. En l'absence d'autres précisions, les produits commerciaux sont utilisés sans précautions particulières.

La nomenclature des composés organiques cités suit les règles préconisées par l'IUPAC. La numérotation des différents atomes ne correspond pas à la nomenclature et n'est utilisée que pour l'attribution des signaux des spectres RMN.

Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker AVANCE 400 respectivement à 400 MHz pour le proton (^1H) et 100 MHz pour le carbone 13 (^{13}C). En l'absence d'autres spécifications, le solvant utilisé est le $CDCl_3$. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, en utilisant pour le chloroforme une référence à 7.26 ppm pour le ^1H et 77.1 ppm pour le ^{13}C. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : *s* pour singulet, *d* pour doublet, *t* pour triplet, *q* pour quadruplet, *m* pour multiplet, *dd* pour doublet dédoublé et *td* pour triplet dédoublé. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz. Les spectres ^{13}C ont été tracés découplés et la multiplicité des différents signaux a été déterminée par des expériences de DEPT.

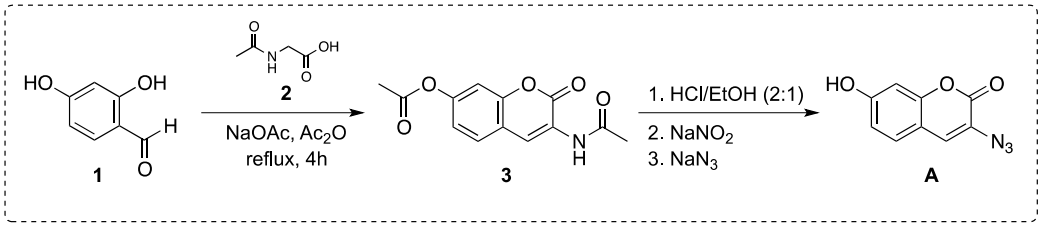
Les spectres infra-rouge (IR-FT) ont été enregistrés sur un appareil Bruker Tensor 27 équipé d'un réfractomètre ATR-diamant, sous forme de dépôt direct sur le diamant sans autre précaution. Les nombres d'onde (ν) sont exprimés en cm^{-1}.

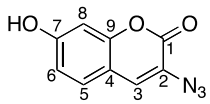
Les spectres de masse haute résolution (HRMS) ont été effectués par le groupe de Spectrométrie de Masse de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris).

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice $60F_{254}$ Merck. La visualisation a été effectuée à l'aide d'une lampe UV (254 nm) et/ou par action d'une solution aqueuse de $KMnO_4/K_2CO_3/AcOH$ ou de *p*-anisaldéhyde/H_2SO_4/acide acétique. Les purifications par chromatographies éclair ont été réalisées sur gel de silice SDS 60 (230-400 mesh). Les éluants utilisés sont des mélanges binaires à base de différents solvants comme l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle (EtOAc) ou le méthanol (MeOH).

I.7.2 Synthèse des composés A et B

*3-Azido-7-hydroxycoumarin (**A**):*[84]





Chemical formula: $C_9H_5N_3O_3$ **Molecular weight:** 203.15 g.mol^{-1}

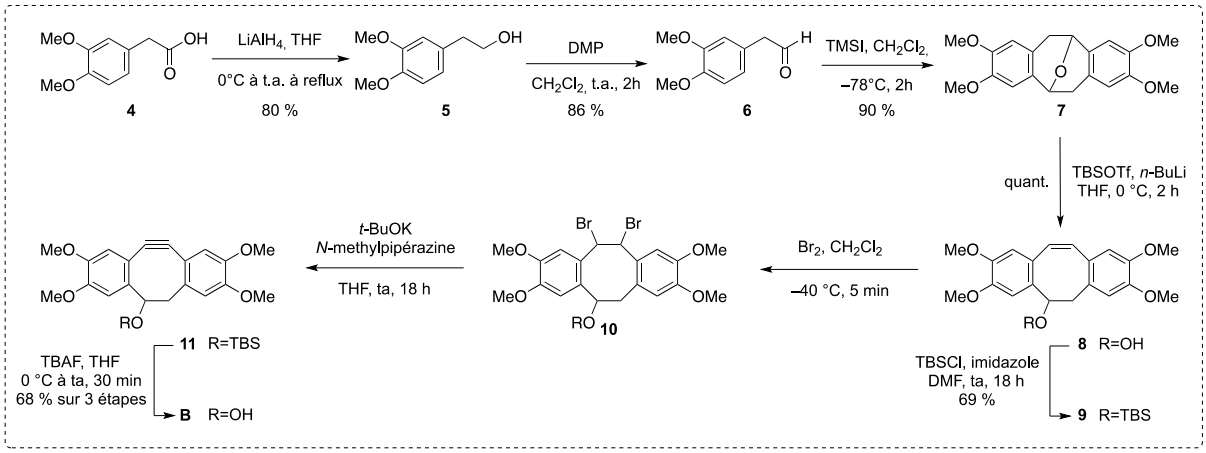
A mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (3 g, 21.7 mmol, 1 equiv), *N*-acetylglycine (2.54 g, 21.7 mmol, 1 equiv) and sodium acetate (8.86 g, 65.1 mmol, 3 equiv) in acetic anhydride (100 mL) was refluxed under stirring for 4 h. The reaction mixture was then poured onto ice to give a yellowish precipitate, which was filtered, washed with ice water and dried under vacuum to give 1.9 g of a crude yellowish solid (1.9 g, 7.33 mmol, 34%). The crude residue was then refluxed in a mixture of concentrated HCl and ethanol (15 mL, 2:1 v/v) for 1 h. Ice water (20 mL) was then added to dilute the solution. The latter was eventually cooled in an ice bath before $NaNO_2$ (1.01 g 14.66 mmol, 2 equiv) was added. After 15 min of stirring, NaN_3 (1.43 g, 22.0 mmol, 3 equiv) was added in portions. After stirring for an additional 15 min, the resulting precipitate was filtered off, washed with water and dried under reduced pressure to give **1** (860 mg, 4.23 mmol, 20% overall yield, 58% on the last step) as a brownish solid. The spectroscopic and physical data of **1** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

IR: 3054, 2830, 2112, 1681, 1613, 1463, 1303, 1154, 1125, 1066, 875 cm^{-1}.

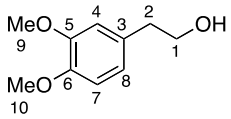
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.55 (s, 1H, H_{OH}), 7.57 (s, 1H, H_8), 7.46 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H_6), 6.79 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H_5), 6.75 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 160.3 (s, C_1 or C_7 or C_9), 157.3 (s, C_1 or C_7 or C_9), 152.8 (s, C_1 or C_7 or C_9), 129.1 (d, C_6), 127.9 (d, C_8), 121.1 (s, C_2 or C_4), 113.8 (d, C_5), 111.4 (s, C_2 or C_4), 102.1 (d, C_3).

*3-Hydroxy-2',3',2'',3''-tetramethoxy-7,8-didehydro-1,2:5,6-dibenzocyclocta-1,5,7-triene (TMDIBO **B**):*[83]



2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl alcohol (5)[103]



Chemical formula: $C_{10}H_{14}O_3$ **Molecular weight:** 182.22 g.mol^{-1}

To a flame-dried round-bottom flask charged with $LiAlH_4$ (3.9 g, 102 mmol, 2 equiv) was added THF (60 mL). The resulting mixture was cooled to 0 °C, and a solution of 3,4-(dimethoxyphenyl)acetic acid (10 g, 51 mmol, 1 equiv) in THF (60 mL) was added dropwise, over 15 min. The resulting reaction mixture was then stirred at the same temperature for 3 h and refluxed for an additional 3 h. The mixture was eventually cooled to 0 °C and EtOAc (10 mL) was slowly added, followed by the addition of H_2O (20 mL). The resulting mixture was diluted with more ethyl acetate and washed first with a 2N aqueous solution of HCl, then with a saturated solution of brine. The aqueous layer was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure, to give, after flash column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc: 10/0 to 8/2), compound **5** as a white solid. The spectroscopic and physical data of **5** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

R_f: 0.24 (CH_2Cl_2/EtOAc = 9:1)

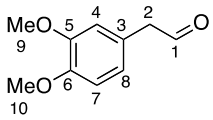
IR: 3240, 2930, 2890, 1590, 1515, 1450, 1420 cm^{-1}.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.77 (m, 1H, H_7), 6.72 (m, 2H, H_4 or H_8), 3.82 (s, 3H, H_9 or H_{10}), 3.81 (s, 3H, H_9 or H_{10}), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H_1), 2.76 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H_2), proton from –OH was not visible on spectrum.

[103] Zhao, Y.; Gu, P.; Zhang, H.; Zhang, Q.; Fan, C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5289-5295.

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 148.9 (s, C_5 or C_6), 147.5 (s, C_5 or C_6), 131.1 (s, C_3), 120.9 (d, C_8), 112.2 (d, C_4 or C_7), 111.3 (d, C_4 or C_7), 63.6 (t, C_1), 55.9 and 55.8 (q, C_9 and C_{10}), 38.6 (t, C_2).

(3,4-Dimethoxyphenyl)acetaldehyde (6)[104]

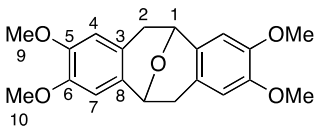


Chemical formula: $C_{10}H_{12}O_3$ **Molecular weight:** 180.20 g.mol^{-1}

Dess-Martin Periodinane (5.0 g, 11.78 mmol, 1.5 equiv) was added to a solution of alcohol **5** (1.4 g, 7.85 mmol, 1 equiv) in dry CH_2Cl_2 (15 mL). The reaction mixture was stirred at rt for 3 h, then 2 mL of a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ and 2 mL of a saturated aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ were added. The resulting mixture was stirred for an additional 30 min. The pale suspension was filtered, and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. After flash column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc: 10/0 à 8/2), the desired compound **6** (1.21 g, 6.71 mmol, 86%) was obtained as a colorless oil. The spectroscopic and physical data of **6** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

R_f: 0.67 (CH_2Cl_2/AcOEt = 9:1)
IR: 2937, 2835, 2724, 1720, 1590, 1513, 1463, 1420, 1257, 1140, 1024 cm^{-1}.
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.72 (t, J = 2.5 Hz, 1H, H_1), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H,H_7), 6.76 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H, H_8), 6.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H_4), 3.87 (s, 6H, H_9 and H_{10}), 3.61 (d, J = 2.5 Hz, 2H, H_2).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 199.6 (d, C_1), 149.4 (s, C_5 or C_6), 148.5 (s, C_5 or C_6), 124.2 (s, C_3), 121.9 (d, C_8), 112.6 (d, C_4), 111.7 (d, C_7), 56.0 and 56.0 (q, C_9 and C_{10}), 50.2 (t, C_2).

2',3',2",3"-Tetramethoxy-2,3:6,7-dibenzo-9-oxabicyclo[3.3.1]nona-2,6-diene (7)[105]



Chemical formula: $C_{20}H_{22}O_5$ **Molecular weight:** 342.39 g.mol^{-1}

[104] Pelphrey, P. M.; Popov, V. M.; Joska, T. M.; Beierlein, J. M.; Bolstad, E. S. D.; Fillingham, Y. A.; Wright, D. L.; Anderson, A. C. *J. Med. Chem*. **2007**, *50*, 940-950.

[105] Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1981**, *103*, 1984-1992.

To a solution of aldehyde **6** (1.2 g, 6.66 mmol, 1 equiv) in CH_2Cl_2 (40 mL) at –78 °C was added slowly, under vigorous stirring, iodotrimethylsilane (966 µL, 6.79 mmol, 1.02 equiv). The resulting solution was stirred for 2 h at –78 °C and then allowed to warm slowly to rt. The reaction was quenched upon reaching rt by addition of 40 mL of a 1M aqueous solution of $Na_2S_2O_3$. After the color of idodine had been discharged, the reaction mixture was extracted with CH_2Cl_2, and combined organic layers were washed with a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$, dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. After recrystallization in MeOH, the expected compound **7** (760 mg, 2.22 mmol, 67%) was obtained as a white solid. The spectroscopic and physical data of **7** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

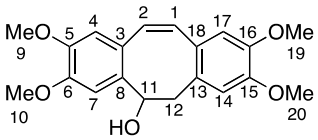
R_f: 0.53 (CH_2Cl_2/EtOAc = 9:1)

IR: 2914, 2834, 1610, 1515, 1463 cm^{-1}.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.56 (s, 2H, H_4 or H_7), 6.48 (s, 2H, H_4 or H_7), 5.20 (d, J = 6.0 Hz, 2H, H_1), 3.85 (s, 6H, H_9 or H_{10}), 3.79 (s, 6H, H_9 or H_{10}), 3.45 (dd, J = 15.9, 6.0 Hz, 2H, H_2), 2.66 (d, J = 15.9 Hz, 2H, H_2).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$**)** δ 148.5 (s, 2C, C_5 or C_6), 147.9 (s, 2C, C_5 or C_6), 129.9 (s, 2C, C_3 or C_8), 123.8 (s, 2C, C_3 or C_8), 111.9 (d, 2C, C_4 or C_7), 108.4 (d, 2C, C_4 or C_7), 69.7 (d, 2C, C_1), 56.4 (q, 2C, C_9 or C_{10}), 56.2 (q, 2C, C_9 or C_{10}), 36.0 (t, 2C, C_2).

3-Hydroxy-2',3',2'',3''-tetramethoxy-1,2:5,6-dibenzocyclocta-1,5,7-triene (8)[83]



Chemical formula: $C_{20}H_{22}O_5$ **Molecular weight:** 342.39 $g.mol^{-1}$

Compound **7** (110 mg, 0.32 mmol, 1 equiv), TBSOTf (75 µL, 0.32 mmol, 1 equiv) and a few crystals of phenanthroline were dissolved in THF (4 mL) à 0 °C. MeLi was added dropwise until the color of the mixture turned to reddish. *n*-BuLi (2.5M in THF, 260 µL, 0.64 mmol, 2 equiv) was slowly added at 0 °C and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 2 h. A few mL of a saturated aqueous solution of NH_4Cl were added to the mixture, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2. The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. Flash column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc: first with CH_2Cl_2 to remove impurities, then with EtOAc) gave compound **8** (104 mg, 0.30 mmol, 95%). The spectroscopic and physical data of **8** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

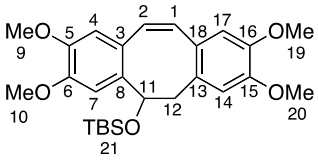
R_f: 0.18 (CH_2Cl_2/EtOAc = 9:1)

IR: 3500, 1600, 1500, 1240 cm^{-1}.

^{1}H NMR (400 MHz, C_6D_6) δ 7.04 (s, 1H, H_7), 6.68 (s, 2H, H_1 and H_2), 6.62 (s, 1H, H_4 or H_{14} or H_{17}), 6.55 (s, 1H, H_4 or H_{14} or H_{17}), 6.52 (s, 1H, H_4 or H_{14} or H_{17}), 5.23 (broad m, 1H, H_{11}), 3.41-3.37 (m, 2H, H_{12}), 3.39 (s, 3H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), 3.35-3.34 (2s, 6H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), 3.32 (s, 3H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), proton from –OH was not visible on spectrum.

^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) δ 149.4 (s, 2C, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 148.6 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 148.2 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}) 134.9 (s, C_8), 130.8 (d, 2C, C_1 and C_2), 129.7 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 129.6 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 127.4 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 113.8 (d, C_4 or C_{14} or C_{17}), 113.8 (d, C_4 or C_{14} or C_{17}), 113.1 (d, C_4 or C_{14} or C_{17}), 112.8 (d, C_7), 74.3 (d, C_{11}), 55.5 (q, 4C, C_9 and C_{10} and C_{19} and C_{20}), 43.0 (t, C_{12}).

3-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-2',3',2",3"-tetramethoxy-1,2:5,6-dibenzocyclocta-1,5,7-triene (9)[83]



Chemical formula: $C_{26}H_{36}O_5Si$ **Molecular weight:** 456.65 $g.mol^{-1}$

To a solution of compound **8** (110 mg, 0.32 mmol, 1 equiv) in DMF (8 mL) at 0 °C, were added TBSCl (97 mg, 0.64 mmol, 2 equiv) and then imidazole (66 mg, 0.96 mmol, 3 equiv). The resulting solution was stirred at rt for 18 h. EtOAc was then added and the mixture was washed 3 times with a large amount of H_2O. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure to give, after flash column chromatography on silica gel (PE/EtOAc = 9:1 then 8:2 then 7:3) compound **9** (94 mg, 0.21 mmol, 64%). The spectroscopic and physical data of **9** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

R_f: 0.76 (CH_2Cl_2/AcOEt = 9:1)

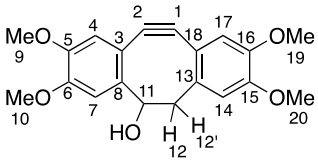
IR: 2930, 1604, 1509 cm^{-1}.

^{1}H NMR (400 MHz, C_6D_6) δ 7.33 (s, 1H, H_7), 6.76 (d, J = 12.1 Hz, 1H, H_1 or H_2), 6.66 (d, J = 12.1 Hz, 1H, H_1 or H_2), 6.54 (s, 1H, H_4 or H_{14} or H_{17}), 6.51 (s, 2H, H_4 or H_{14} or H_{17}), 5.71 (dd, J = 10.3, 5.8 Hz, 1H, H_{11}), 3.62 (dd, J = 15.2, 5.7 Hz, 1H, H_{12}), 3.55 (s, 3H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), 3.40 (dd, J = 15.3, 10.2 Hz, 1H, H_{12}), 3.33 (s, 6H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), 3.30 (s, 3H, H_9 or H_{10} or H_{19} or H_{20}), 1.04 (s, 9H, H_{21}), 0.12 (s, 3H, H_{21}), 0.06 (s, 3H, H_{21}).

^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) δ 149.7 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 149.1 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 148.5 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 147.9 (s, C_5 or C_6 or C_{15} or C_{16}), 136.5 (s, C_8), 133.1 (d, C_1 or C_2), 129.6 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 129.3 (d, C_1 or C_2), 128.8 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 127.4 (s, C_3 or C_{13} or C_{18}), 114.5 (d,

C_{arom}), 114.3 (d, C_{arom}), 112.2 (d, C_{arom}), 110.0 (d, C_7), 72.7 (d, C_{11}), 55.5 (q, 2C, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 55.4 (q, 2C, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 47.5 (t, C_{12}), 26.2 (q, 3C, $C_{21,\ t\text{-Bu}}$), 18.5 (s, $C_{21,\ t\text{-Bu}}$), -4.4 (q, $C_{21,\ Me}$), -4.5 (q, $C_{21,\ Me}$).

3-Hydroxy-2',3',2",3"-tetramethoxy-7,8-didehydro-1,2:5,6-dibenzocyclocta-1,5,7-triene (B)[83]



Chemical formula: $C_{20}H_{20}O_5$ **Molecular weight:** 340.37 g.mol^{-1}

Compound **9** (120 mg, 0.26 mmol, 1 equiv) was dissolved in CH_2Cl_2 (8 mL) and the mixture was cooled to –40 °C. Bromine (14 µL, 0.26 mmol, 1 equiv) was then added dropwise, until the brownish color persisted. The solvent was evaporated in vacuo, and the residue was directly dissolved in THF (8 mL). *N*-Methylpiperazine (432 µL, 3.9 mmol, 15 equiv) was added, and then *t*-BuOK (117 mg, 1.04 mmol, 4 equiv). The resulting suspension was stirred for 18 h before it was poured into ice water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The yellowish crude residue was dissolved in THF (8 mL) at 0 °C and TBAF (1M in THF, 340 µL, 0.34 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise. The resulting mixture was finally allowed to reach rt and was stirred for an additional 45 min. A saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was then added and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The crude residue was washed with methanol to afford compound **2** (53 mg, 0.16 mmol, 60%) as a pale yellowish solid. The spectroscopic and physical data of **2** were consistent with those reported in the literature for the same compound.

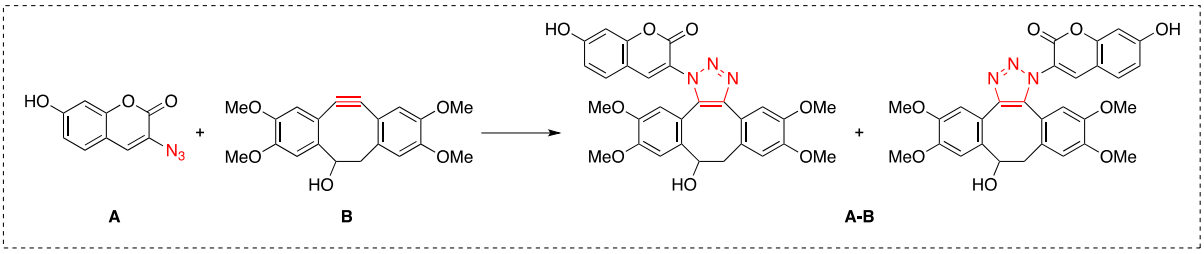
R_f: 0.32 (Hexane/EtOAc = 1:1)

IR: 3507, 3457, 1993, 1937, 1830, 2140, 1600, 1560, 1500, 1463 cm^{-1}.

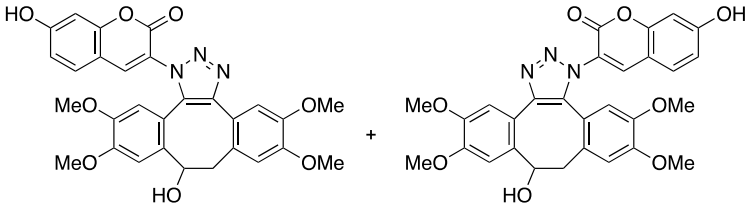
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.32 (s, 1H, H_7), 7.09 (s, 1H, H_{14}), 6.92 (d, J = 2.7 Hz, 2H, H_{17}), 5.77 (d, 1H, J = 4.8 Hz, H_{OH}), 4.24 (broad s, 1H, H_{11}), 3.81 (d, 6H, H_{10} and H_{20}), 3.76 (d, 6H, H_9 and H_{19}), 3.02 (dd, J = 14.1, 1.9 Hz, 1H, H_{12} or $H_{12'}$), 2.59 (dd, J = 14.1, 3.7 Hz, 1H, H_{12} or $H_{12'}$).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 150.6, 148.7, 148.4, 147.3, 147.0, 145.3 (6s, C_5 and C_6 and C_{15} and C_{16} and C_8 and C_{13}), 114.8 (s, C_3 or C_{18} or C_1 or C_2), 114.3 (d, C_{14}), 112.0, 111.8, 110.1 (3s, C_3 or C_{18} or C_1 or C_2), 109.1 (d, C_4 or C_7 or C_{17}), 109.1 (d, C_4 or C_7 or C_{17}), 109.1 (d, C_4 or C_7 or C_{17}), 74.1 (d, C_{11}), 55.8 (q, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 55.8 (q, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 55.7 (q, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 55.5 (q, C_9 or C_{10} or C_{19} or C_{20}), 49.1 (t, C_{12}).

*Model Reaction between **A** and **B**:*



7-hydroxy-3-(9-hydroxy-5,6,11,12-tetramethoxy-8,9-dihydro-1*H*-dibenzo[3,4:7,8] cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-2*H*-chromen-2-one (A-B)



Chemical Formula: $C_{29}H_{25}N_3O_8$ **Molecular weight :** 543.52 g.mol^{-1}

Compound **1** (30 mg, 0.15 mmol, 1 equiv) and compound **2** (50 mg, 0.15 mmol, 1 equiv) were suspended in a EtOH/H_2O mixture (4 mL in total, 1:1) and stirred in the dark for 1 h. EtOH was removed under reduced pressure. H_2O was added and the resulting suspension was cooled in an ice bath, filtered and dried under vacuum to give a brownish solid **3** as a mixture of isomers.

IR: 2937, 1721, 1606, 1224, 1036 cm^{-1}.

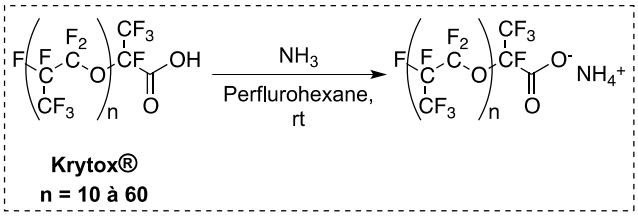
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.77 (m, 1H), 7.69-6.48 (m, 8H), 5.51 (brs, 1H), 5.07-4.92 (m, 1H), 3.82-3.70 (m, 12H, H_{OMe}), 3.18-3.00 (m, 2H)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 163.6 (s), 157.1 (s), 155.5 (s), 149.8 (s), 148.7 (s), 148.5 (s), 147.0 (s), 146.9 (s), 146.1 (s), 143.9 (d), 138.3 (s), 134.4 (s), 131.2 (d), 128.9 (s), 120.8 (s), 118.1 (s), 114.7 (d), 114.6 (d), 113.7 (d), 112.9 (d), 111.4 (d), 109.8 (d), 109.1 (d), 102.5 (d), 102.4 (d), 79.0 (s), 67.3 (d), 55.5 (q, C_{OMe}), 45.6 (t), 23.1 (t), 19.2 (t), 13.5 (d).

We were unable to separate and purify the mixture of isomers obtained, and the NMR spectra were thus almost impossible to attribute (see below for spectra).

HRMS (ESI) m/z: calculated for $C_{29}H_{25}N_3O_8Na$ [M+Na]+: 566.1539, found: 566.1534.

Ammonium salt of Krytox:



Commercial Krytox® 157 FSH by DuPont™ (10 g) was dissolved in perfluorohexane FC-72 oil by 3M™ (100 mL). NH_3 was bubbled under stirring for 1 h at 0 °C. NH_3 bubbling was then replaced by argon to evacuate the residual ammoniac from the medium. The resulting solution of Krytox's ammonium salt was stored at 4 °C.

I.7.3 Fluorescence des composés A et B synthétisés

L'intensité de fluorescence émise par les deux partenaires réactionnels étudiés **A** et **B** a été étudiée, afin de déterminer s'il existait un phénomène d' « auto-quenching », ou désactivation du fluorophore à forte concentration.

Afin d'étudier cette fluorescence, nous avons conçu des systèmes microfluidiques permettant la mesure de l'intensité de fluorescence d'un produit donné et sa normalisation par rapport à une valeur de référence à 1 (dans notre cas, une solution de **A** à 0.5% dans le DMSO constitue cette référence) et à 0 (dans notre cas, du DMSO pur) (Figure SI.1).

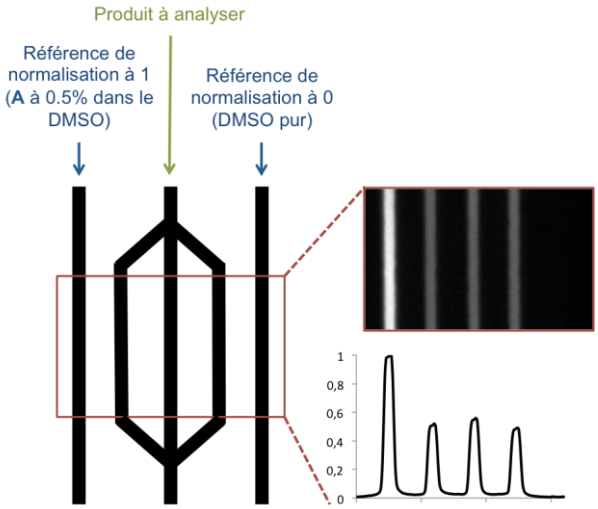


Figure SI.1. Principe du système microfluidique pour la mesure des intensités de fluorescence avec normalisation.

On mesure par cette méthode la fluorescence d'une série de solutions de coumarine **A** à différentes concentrations, et on obtient le résultat présenté sur la Figure SI.2.

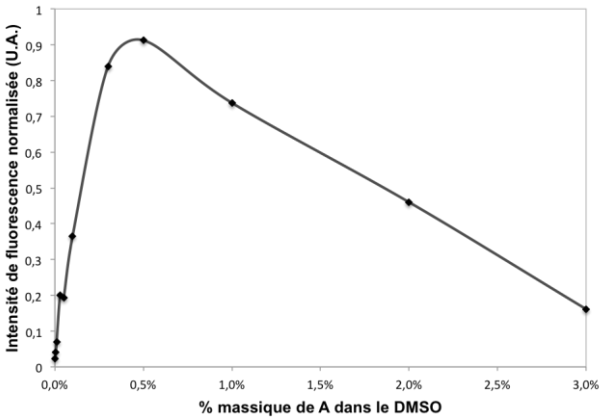


Figure SI.2. Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du pourcentage massique en composé **A** dans le DMSO. Normalisation par rapport à une solution de 0.5% en **A** dans le DMSO.

L'intensité augmente linéairement avec la concentration jusqu'à [**A**]=0.5% environ. L'intensité de fluorescence diminue ensuite avec la concentration, mettant en évidence l'existence d'un phénomène de désactivation du fluorophore.

De manière similaire, on étudie le comportement en fluorescence de solutions à différentes concentrations de l'alcyne **B** en solution dans le DMSO (Figure SI.3) : *a priori*, on ne constate aucun phénomène d' « auto-quenching », l'intensité de fluorescence est relativement faible, et surtout globalement proportionnelle à la quantité de produit dissoute.

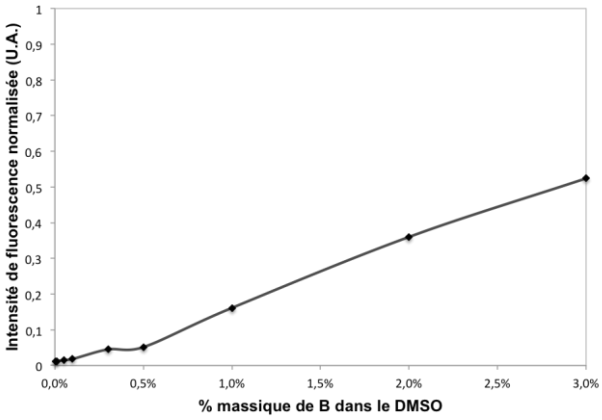


Figure SI.3. Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du pourcentage massique en composé **B** dans le DMSO. Normalisation par rapport à une solution de 0.5% en **A** dans le DMSO.

I.7.4 Système de production de gouttes

Fabrication des systèmes microfluidiques : (pour plus de détails, voir Annexe 1) Les systèmes utilisés sont fabriqués dans du PDMS (Polydiméthylsiloxane), en utilisant des procédés de « soft-lithographie » classiques en deux couches successives. En bref, un moule de silicone est fabriqué à partir de dépôts de résine SU8 (SU8 20XX, MicroChem) sur un wafer de silicone, puis du PDMS (RTV615, Momentive Performance Materials) est coulé sur ce moule puis réticulé à 70 °C pendant environ 15h. Les surfaces à la fois du PDMS et d'une lame en verre utilisée pour fermer les canaux sont traitées sous plasma à oxygène avant d'être scellées avec une excellente adhésion. Ce traitement confère également un caractère hydrophile aux canaux. Ils sont ainsi utilisés immédiatement après l'étape de traitement plasma.

Le système microfluidique fabriqué est ensuite connecté avec une séries de tubes capillaires (Tube PEEK 1541, Idex Health and Science) à un contrôleur de pression (Fluigent, MFCS-100). Les fluides sont visualisés à l'intérieur du microcanal grâce à un microscope inversé (Zeiss ou Leica) équipé d'une caméra rapide Photron (Fastcam SA3) utilisée à environ 3000 à 4000 images/seconde.

Les canaux utilisés lors de notre étude possèdent les dimensions indiquées ci-dessous (Figure SI.4), ainsi que des épaisseurs respectives de 1 µm environ pour la couche la plus fine et 25 µm pour l'autre.

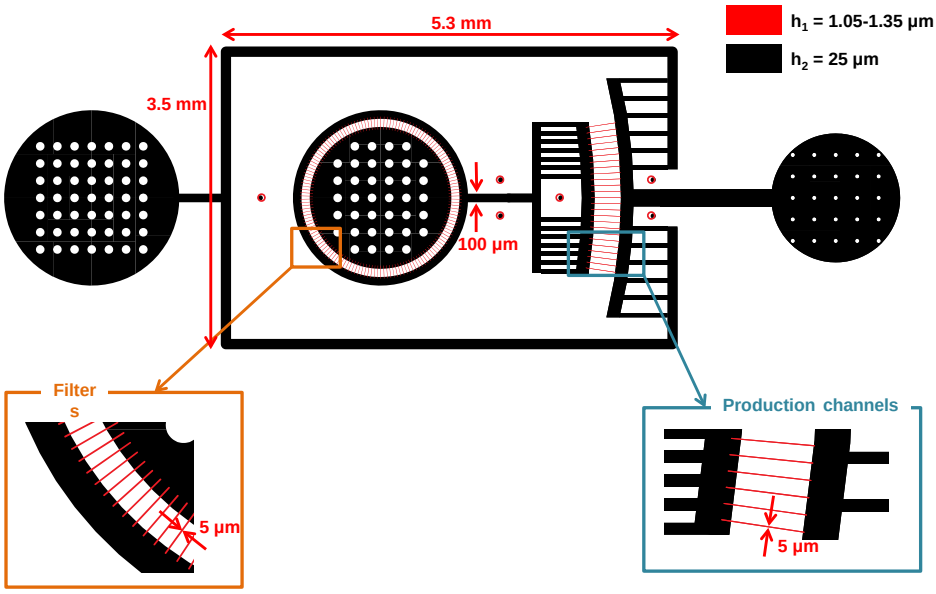


Figure SI.4. Géométrie des systèmes utilisés : le système complet est dessiné à l'échelle, et les caractéristiques géométriques des zones d'intérêt sont également indiquées.

Les gouttes sont collectées puis stockées à 4°C dans un surnageant DMSO+Pluronic 3% w/v avant utilisation.

I.7.5 Largage ultrasonore en microfluidique

Expériences en canal microfluidique : des microgouttes de perfluorocarbone contenant le composé **A** sont suspendues grâce à une agitation magnétique constante dans une solution de **B** dans du DMSO (0.3% w/v) et injectées dans le canal microfluidique en utilisant un contrôleur de pression (Fluigent, MFCS-100). Le canal microfluidique mesure 100 µm de largeur et 40 µm de hauteur. Il est placé à la focale d'un transducteur mono-élément de fréquence centrale 2.25 MHz, qui est lui-même immergé dans un bain d'eau. Un pulse unique de 30 cycles est émis, ce qui déclenche également l'acquisition du signal de fluorescence induit par la réaction par une caméra (Andor iXon, 34 Hz) montée sur un microscope à fluorescence (Leica, 10X or 20X, filtre DAPI).

Expériences en plaque Opticell (« Tour Eiffel ») : des microgouttes de perfluorocarbone contenant le composé **A** sont suspendues grâce à une agitation magnétique constante dans une solution de **B** dans du DMSO (0.15% w/v, dégazée avant l'injection). Cette suspension est injectée dans une plaque Opticell faite de deux membranes de plastique, transparentes à la fois aux ultrasons et à la lumière, séparées de 2 mm.

La membrane inférieure est placée à la focale d'une sonde ultrasonore à 5 MHz, immergée dans un bain d'eau thermostaté à 12 °C. La sonde ultrasonore est alimentée par un scanner d'imagerie clinique (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France), et émet un unique pulse de 2 cycles pour chacun des points de largage. La distance entre deux points de largage est égale au pas du transducteur (0.3 mm). Les points de largage peuvent être déterminés à l'avance n'importe où dans la plaque grâce à une interface logicielle. Les produits libérés par largage sont excités sous lumière UV, et l'observation de la tour Eiffel obtenue est réalisée à travers un filtre UV.

I.7.6 Protocole de culture cellulaire

Protocole de culture cellulaire sur plaques 96-puits avec fond en Mylar : Contrairement aux plaques 96-puits commerciales qui ne requièrent pas de traitement de surface particulier pour l'adhésion des cellules, nos plaques avec fond en Mylar assemblées au laboratoire doivent être quant à elles traitées pour assurée l'adhésion cellulaire. Ainsi, 50 µL de poly-*L*-lysine sont déposés au fond de chaque puits, puis retirés après une période d'incubation à 37 °C de 30 min. Les plaques sont ensuite séchées à température ambiante et sous atmosphère stérile pendant 1 h avant d'être utilisées.

En raison de l'état de surface du fond en Mylar (traces éventuelles de colle, aspérités et rayures sur la surface, etc…), il est nécessaire de déposer au fond de chaque puits environ deux fois plus de cellules que pour une plaque standard. Dans le cas de la lignée KB utilisée pour cette étude, on a déposé en moyenne 4000 cellules par puits afin d'obtenir une densité satisfaisante de cellules adhérentes après 15 h d'incubation.

Chapitre II

Mélange dans des systèmes microfluidiques

II.1. Le mélange en microfluidique : un défi

II.1.1 Introduction

Les deux dernières décennies ont vu se développer un nouveau domaine de recherche aux applications très variées : la microfluidique. En effet, l'étude du contrôle et de la manipulation de fluides confinés dans des espaces de dimensions typiquement submillimétriques ouvre de nombreuses applications : en biologie, dans les biotechnologies, en synthèse chimique, ou encore en optique. Ce succès repose sur trois points forts : des temps d'analyse réduits, des volumes de réactifs ou d'échantillons biologiques faibles, et des techniques de microfabrication peu onéreuses. Enfin, ces systèmes sont généralement simples d'utilisation, et plusieurs étapes d'analyse ou de synthèse peuvent être intégrées sur la même puce. C'est pourquoi ils sont désignés sous le terme de « laboratoires sur puce » (« labs on chips »).[106] Dans ces « laboratoires sur puce », les étapes de mélange sont essentielles. Nous verrons cependant pourquoi le mélange demeure si compliqué en microfluidique, quelles sont les solutions actuellement proposées, et enfin comment nos travaux se situent parmi ces solutions.

[106] (a) Dittrich, P. S.; Manz, A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 210-218; (b) Whitesides, G. M. *Nature* **2006**, *442*, 368-373; (c) Squires, T. M.; Quake, S. R. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977-1026; (d) Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M. R.; Weigl, B. H. *Nature* **2006**, *442*, 412-418.

II.1.2 Forces en jeu

Au sein d'un laboratoire sur puce microfluidique, les étapes de mélange sont loin d'être triviales. En effet, les dimensions typiques et les débits utilisés dans les canaux microfluidiques correspondent en général à de faibles nombres de Reynolds (*Re* << 10).

On rappelle que le nombre de Reynolds est défini comme le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses d'un système, ou encore de façon qualitative, comme le rapport entre le transfert de la quantité de mouvement par convection et le transfert par diffusion. C'est un nombre sans dimension défini de la façon suivante :

$$Re = \frac{V \times a}{\nu}$$

Avec V représentant la vitesse caractéristique du fluide étudié ($m.s^{-1}$), a étant la dimension caractéristique du système (m), et enfin ν la viscosité cinématique du fluide ($m^2.s^{-1}$).

Typiquement, pour de l'eau ($\nu = 1.10^{-6}\ m^2.s^{-1}$) s'écoulant à une vitesse de $1\ mm.s^{-1}$ dans un canal de section rectangulaire $10\ \mu m\ \times\ 100\ \mu m$, on obtient :

$$\mathrm{Re} = \frac{1.10^{-3} \times 10.10^{-6}}{1.10^{-6}} = 10^{-2} \ll 10$$

A de très faibles valeurs de *Re* comme c'est le cas en microfluidique, on se trouve donc dans des situations où les forces visqueuses sont dominantes par rapport aux forces inertielles. Les flux sont alors laminaires et le mélange est très majoritairement assuré par les phénomènes de diffusion, ce qui conduit à des phénomènes de mélange lents. De nombreuses méthodes de mélange ont donc été développées pour surmonter ce problème et s'affranchir de la diffusion.[107,108] Ces mélangeurs microfluidiques peuvent être classés en deux catégories : d'une part, les mélangeurs passifs, d'autre part ceux dits « actifs ».

[107] Elvira, K. S.; Casadevall i Solvas, X.; Wootton, R. C. R.; deMello, A. J. *Nat. Chem*. **2014**, *5*, 905–915.

[108] Meijer, H. E. H.; Singh, M. K.; Kang, T. G.; den Toonder, J. M. J.; Anderson, P. D. *Macromol. Symp*. **2009**, *279*, s201–209.

II.1.3 Mélangeurs passifs

Les mélangeurs passifs reposent sur différentes stratégies parmi lesquelles le partage et la recombinaison des fluides à mélanger (Figure II.1),[109] la multi-stratification des fluides,[110] ou encore l'induction de chaoticité,[111] comme dans le cas du mixeur à chevrons développé par Stroock *et al*.[112] (Figure II.2).

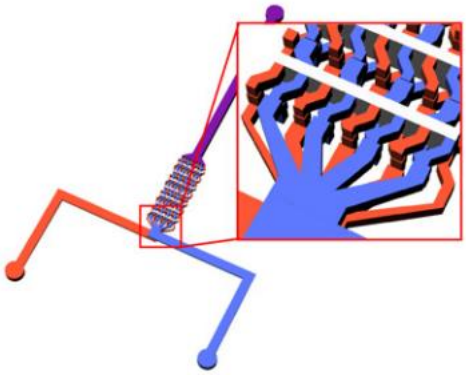


Figure II.1. Schéma du mélangeur décrit par Cha *et al*. (figure extraite de la référence 109), basé sur une forte augmentation des interfaces entre fluides.

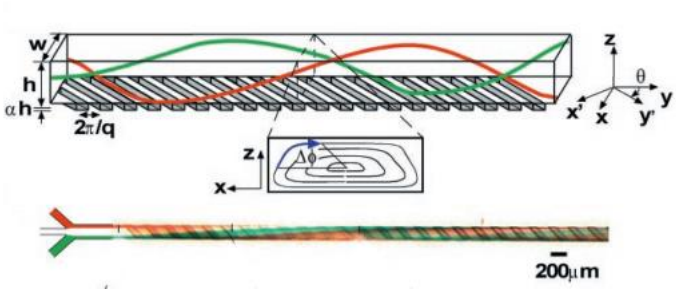


Figure II.2. Schéma du mélangeur à chevrons développé par Stroock *et al*. (figure extraite de la référence 112).

Le principe est toujours d'augmenter la longueur et la tortuosité du canal, et ainsi d'augmenter le temps pendant lequel les fluides restent en contact et où la diffusion peut avoir lieu. Ces mélangeurs ne nécessitent pas de forces extérieures au système pour fonctionner mais seulement une géométrie adaptée. Ils ont donc pour avantage principal d'être faciles à intégrer dans une puce microfluidique.

---

[109] Cha, J.; Kim, J.; Ryu, S.-K.; Park, J.; Jeong, Y.; Park, S.; Park, S.; Kim, H. C.; Chun, K. *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 1778-1782.

[110] Song, H.; Bringer, M. R.; Tice, J. D.; Gerdts, C. J.; Ismagilov, R. F. *App. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664–4666.

[111] (a) Niu, X.; Lee, Y. J. *Micromech. Microeng*. **2003**, *13*, 454–462; (b) Kim, D. S.; Lee, S. W.; Kwon, T. H.; Lee, S. S. J. *Micromech. Microeng*. **2004**, *14*, 798–805.

[112] (a) Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. *Science* **2002**, *295*, 647–651; (b) Lee, C.-Y.; Chang, C.-L.; Wang, Y.-N.; Fu, L.-M. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3263–3287.

Cependant, ils requièrent en général des temps et/ou des longueurs de mélange assez élevés et sont parfois fastidieux à fabriquer en raison de la complexité de leurs structures.

II.1.4 Mélangeurs actifs

Contrairement aux mélangeurs passifs, les mélangeurs dits actifs requièrent un stimulus externe pour induire l'effet de mélange. Cela mène souvent à des procédés de fabrications complexes, une fragilité plus élevée mais également une portabilité assez faible. Néanmoins, en dépit de ces inconvénients, ces systèmes, activés selon les cas par des stimulations magnétiques,[113] thermiques,[114] optiques[115] ou encore acoustiques (Figure II.3)[116,117] se sont révélés très efficaces, souvent significativement plus que les mélangeurs passifs. Ces systèmes bénéficient par ailleurs de la possibilité de contrôler le mélange à distance.

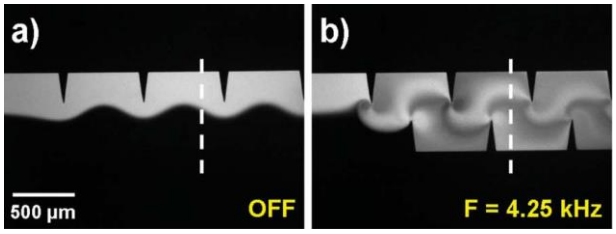


Figure II.3. Exemple de mixeur activé par ultrasons : les pointes de PDMS ajoutées aux parois du canal vibrent sous l'effet des ultrasons et induisent ainsi le mélange des fluides (figure extraite de la référence 117).

Comme nous le verrons plus loin, le micromélangeur le plus proche de notre approche est celui développé récemment par l'équipe de D. Baigl. Dans leur cas, la lumière est utilisée pour stimuler l'activation d'un flux photo-sensible, lui-même situé en position centrale de trois fluides co-injectés.[118] La propriété de photo-sensibilité du flux central est obtenue par la présence en solution d'un composé appelé « AzoTAB », capable de passer d'une conformation *trans* à une conformation *cis* sous l'effet d'une illumination UV (Schéma II.1).

---

[113] Chen, C.-Y.; Chen, C.-Y.; Lin, C.-Y.; Hu, Y.-T. *Lab. Chip.* **2013**, *13*, 2834–2839.

[114] (a) Tsai, J.; Lin, L. *Sens. Actuators, A* **2002**, *97–98*, 665–671; (b) Xu, B.; Wong, T. N.; Nguyen, N. T.; Che, Z.; Chai, J. C. *Biomicrofluidics* **2010**, *4*, 44102.

[115] Hellman, A. N.; Rau, K. R.; You, H. H.; Bae, S.; Palmer, J. F.; Scott Phillips, K.; Allbritton, N. L.; Venugopalan, V. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4484-4492.

[116] (a) Ahmed, D.; Mao, X.; Juluri, B. K.; Huang, T. J. *Microfluid Nanofluid*, **2009**, *7*, 727–731; (b) Ahmed, D.; Mao, X.; Shi, J.; Juluri, B. K.; Huang, T. J. *Lab. Chip.* **2009**, *9*, 2738–2741.

[117] Huang, P.-H.; Xie, Y.; Ahmed, D.; Rufo, J.; Nama, N.; Chen, Y.; Chan, C. Y.; Huang, T. J. *Lab. Chip.* **2013**, *13*, 3847–3852.

[118] Venancio-Marques, A.; Barbaud, F.; Baigl, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3218–3223.

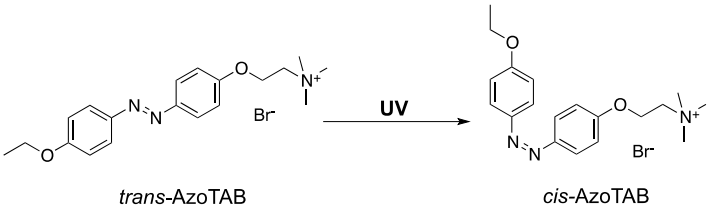


Schéma II.1. Structure et changement de conformation entre le *trans* et le *cis* AzoTAB sous l'effet d'une illumination UV.

En pratique, ce changement de conformation induit un changement du régime d'injection des fluides. Ainsi, en présence de *trans*-AzoTAB, un régime « tube » est observé, tandis qu'en présence de *cis*-AzoTAB, c'est un régime de gouttes qui apparaît (Figure II.4).

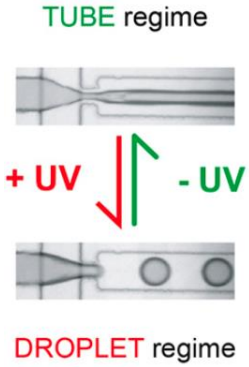


Figure II.4. Transition entre les régimes « tube » et « goutte » sous l'effet du changement de conformation de l'AzoTAB (figure extraite de la référence 118).

Ce régime de gouttes, associé à une géométrie particulière des canaux en losange, entraîne le mélange des fluides co-injectés de part et d'autre de la phase photo-sensible (Figure II.5).

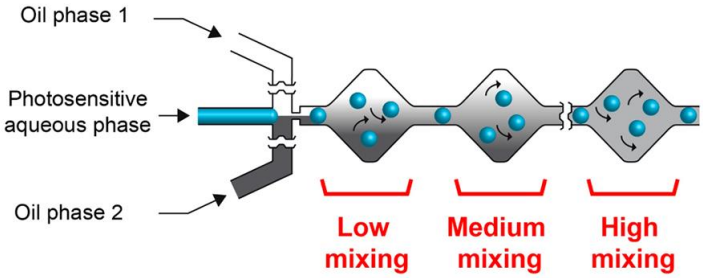


Figure II.5. Principe de fonctionnement du micromélangeur développé par l'équipe de Baigl (figure extraite de la référence 118).

La transition entre les conformations *cis* et *trans* étant réversible, ce mélangeur peut donc être activé ou désactivé selon qu'une illumination UV est appliquée ou non au système. L'avantage principal d'une

telle activation UV tient à ce qu'aucun montage expérimental complexe n'est nécessaire : une simple diode électroluminescente permet d'obtenir l'effet voulu.

II.2. Principe du micromélange acoustique

II.2.1 Stratégie employée

Comme l'équipe de Baigl, nous avons employé une stratégie basée sur trois flux co-injectés, l'un d'entre eux servant exclusivement à générer le mélange des deux autres sous l'effet d'un stimulus externe. Nous avons ainsi conçu un mélangeur microfluidique actif utilisant des ondes acoustiques. Comme nous l'avons vu précédemment, certains perfluorocarbones (PFC) liquides possèdent une double propriété : ils sont immiscibles à la plupart des fluides (eau, huiles), et ils présentent une faible tension de vaporisation. En utilisant une onde acoustique focalisée, il est donc possible de les faire passer brièvement en phase vapeur. Grâce à ces propriétés, nous avons pu concevoir un mélangeur actif capable de fonctionner à la demande.

Pour cela, nous avons fait écouler deux fluides à mélanger séparés d'un film de PFC (Figure II.6, en haut). L'activation des ultrasons provoque instantanément un phénomène de vaporisation et de recondensation rapide du PFC qui génère un mélange local extrêmement efficace. En aval de la zone focale, le PFC va spontanément se séparer des fluides mélangés avec lequel il est immiscible (Figure II.6, en bas). L'arrêt des ultrasons stoppe instantanément le mélange.

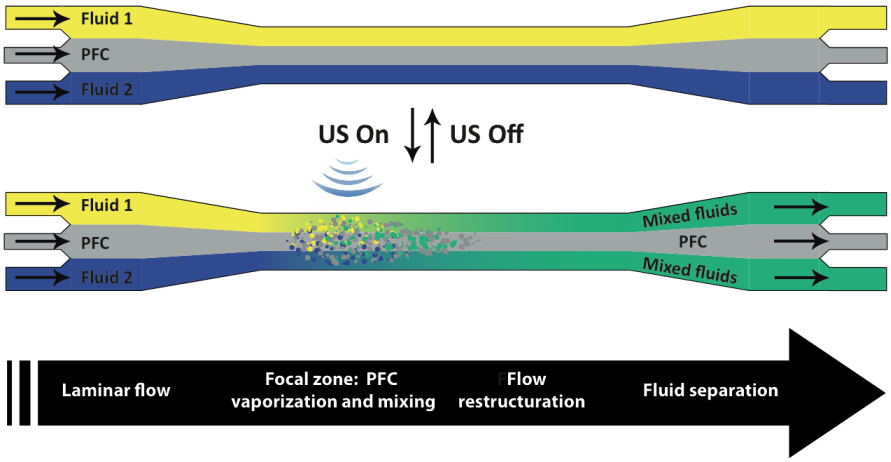


Figure II.6. Principe d'un micromélangeur basé sur la vaporisation d'une phase de perfluorocarbone.

Comme nous allons le voir au cours de cette étude, les points forts de cette approche sont les suivants :

- l'excellente efficacité du mélange
- la vitesse de mélange élevée
- la simplicité de mise en œuvre (pas de géométrie particulière nécessaire, compatibilité avec des systèmes aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes)
- le mélange obtenu à la demande
- l'indépendance vis-à-vis du nombre de Reynolds

II.2.2 Conception du système microfluidique et montage expérimental

En pratique, un système microfluidique à trois entrées a été conçu (Figure II.7). Ce système possède une géométrie des plus simples, à savoir un canal droit replié sous forme de serpentin afin d'augmenter la longueur de canal visible dans la fenêtre d'observation. Le serpentin le plus petit (à droite) permet d'observer le mélange à des temps relativement courts. Le serpentin le plus long (à gauche) permet l'observation des phénomènes de mélange à des temps plus longs. L'entrée et la sortie telles qu'elles sont indiquées sur la Figure II.7 peuvent être inversées pour les besoins de l'expérience, étant symétriques l'une de l'autre. La phase perfluorocarbonée est systématiquement injectée dans l'entrée centrale, les fluides à mélanger étant eux injectés de part et d'autre.

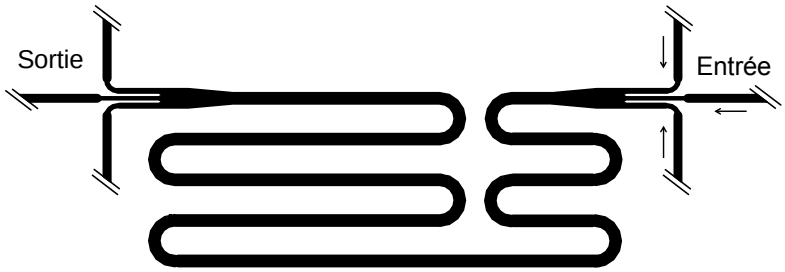


Figure II.7. Schéma du système microfluidique utilisé dans l'étude du mélangeur acoustique.

Le rapport d'aspect entre la hauteur et la largeur du canal microfluidique a été maintenu à 1:10 afin de garder un confinement maximal des fluides et ainsi éviter de se placer dans un régime de production de gouttes de PFC à l'entrée du canal.

Ce système microfluidique est immergé dans un bain d'eau et placé à la focale d'un transducteur ultrasonore mono-élément de fréquence centrale 2.25 MHz (f/d=36 mm, pression acoustique négative variant entre 4 et 10 MPa). Les fluides impliqués sont injectés par un système de trois pousse-seringues. Une caméra montée sur un microscope à fluorescence permet d'observer la zone du canal microfluidique où le transducteur est focalisé et ainsi de suivre l'évolution du mélange (Figure II.8).

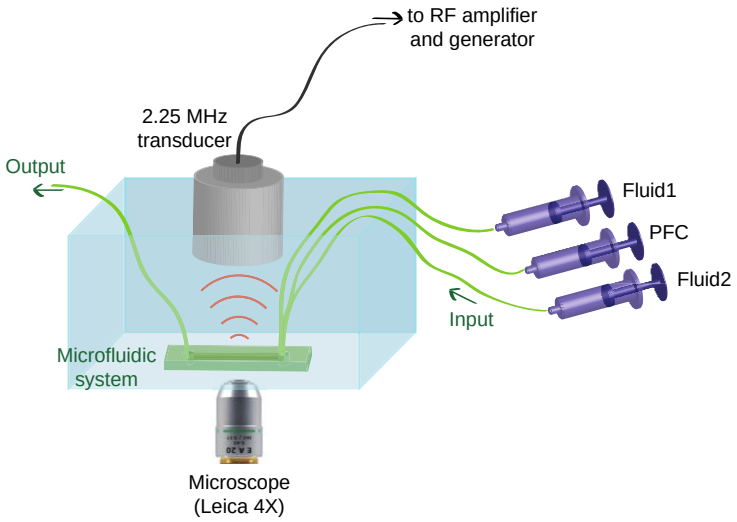


Figure II.8. Schéma du montage expérimental utilisé pour l'étude du mélangeur microfluidique.

Remarque expérimentale : l'utilisation de pousses-seringue permet de rendre la vitesse des fluides indépendante de l'action des ultrasons. En effet, la vaporisation du PFC sous l'effet des ultrasons entraîne des perturbations locales de la pression, ce qui rend compliqué un contrôle en pression des fluides. Un contrôle du débit apparaît donc plus approprié dans notre cas.

II.2.3 Cas expérimentaux

Trois cas expérimentaux ont donc été étudiés pour évaluer les propriétés et l'efficacité de notre méthode de mélange microfluidique. Dans tous les cas, ces méthodes impliquent l'utilisation d'une phase séparatrice centrale de perfluorocarbone, composée d'un mélange 1:1 de perfluorohexane et de perfluoropentane. En effet, le perfluoropentane est très réactif sous l'effet des ultrasons, mais il possède l'inconvénient d'être très volatile ($T°_{eb}$ = 28-30 °C), rendant sa manipulation difficile à température ambiante. En le mélangeant avec du perfluorohexane ($T°_{eb}$ = 50-60 °C), on obtient un fluide facilement vaporisable par ultrasons et manipulable sans trop de pertes à température ambiante.

La nature des phases latérales injectées varie selon la méthode utilisée (Tableau II.1). Les méthodes **I** et **III** impliquent le mélange de deux fluides de même nature, respectivement fluorescents et non-fluorescents. Dans le cadre de la méthode **II**, de l'huile contenant une suspension de billes fluorescentes est mélangée à de l'huile pure.

Tableau II.1. Méthodes utilisées pour l'évaluation des propriétés du micromélangeur.

Méthode	Fluide 1	Fluide 2
I	Huile minérale + Nile Red (600 µM)	Huile minérale pure
II	Huile minérale + billes fluorescentes (polystyrène, diamètre 10µm)	Huile minérale pure
III	Eau + fluorescéine (800 µM)	Eau pure

Enfin, il faut noter que des huiles minérales de différentes natures, et en particulier de différentes viscosités ont été utilisées au cours de l'étude. La nature et la viscosité dynamique des différents fluides ont été rassemblées dans le Tableau II.2 ci-dessous.

Tableau II.2. Fluides utilisés et viscosités cinématiques associées.

Nature du fluide	Viscosité cinématique ($m^2.s^{-1}$)
Huile minérale (« light »)	$\nu_{huile1} = 16x10^{-6}$
Huile minérale	$\nu_{huile2} = 36.10^{-6}$
Huile minérale (« heavy »)	$\nu_{huile3} = 67x10^{-6}$
Huile de calibration	$\nu_{huile4} = 1x10^{-6}$
Eau	$\nu_{eau} = 1x10^{-6}$

II.3. Caractérisation du micromélangeur acoustique

Ayant précisé la stratégie envisagée pour mélanger deux fluides en exploitant la vaporisation de PFC par ultrasons, il s'agit désormais de caractériser les performances de notre micromélangeur. Dans un premier temps, il est essentiel d'évaluer la qualité du mélange obtenu. Nous étudierons également la gamme de nombres de Reynolds compatible avec notre système, ainsi que la capacité de mélange à la demande. Enfin, nous apporterons des éléments de réponse relatives à la cinétique de mélange et aux mécanismes acoustiques.

II.3.1 Evaluation de la qualité du mélange

II.3.1.1 Principe de la mesure et application au cas hydrophobe

Afin de caractériser la qualité du mélange obtenu avec notre système, nous avons analysé les expériences relatives aux méthodes **I** et **III**. Pour ces expériences, la même zone du serpentin a été observée (Figure II.9).

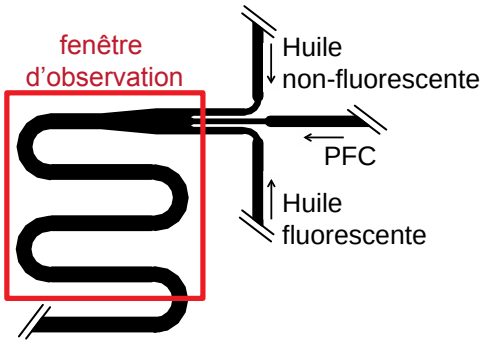


Figure II.9. Schéma de la portion du canal observée pendant l'étude de l'index de mélange.

Lorsque les ultrasons sont activés, nous pouvons observer la présence d'une zone très émulsifiée au niveau de la zone focale (Figure II.10, à gauche, croix rouge) où les différents fluides impliqués ne peuvent plus être distingués. En aval de cette zone d'impact les deux huiles désormais mélangées et la phase de PFC démixent progressivement, le PFC demeurant au centre du canal. Dans le cas où les ultrasons sont désactivés, l'écoulement des fluides est laminaire.

Ces expériences ont été analysées afin d'évaluer la qualité du mélange obtenu. Pour cette évaluation, nous avons réalisé une analyse d'image de chaque vidéo expérimentale. En définissant deux zones de même taille (Figure II.10, en vert et bleu respectivement) dans les régions où se trouvent les fluides d'intérêt, il est possible de calculer la valeur moyenne du niveau de gris de chaque région. Ces zones sont délibérément choisies pour être le plus loin possible de la zone d'impact ultrasonore, afin d'avoir une mesure non perturbée par les ultrasons. Un suivi temporel des valeurs moyennes mesurées nous renseigne alors sur le mélange en cours.

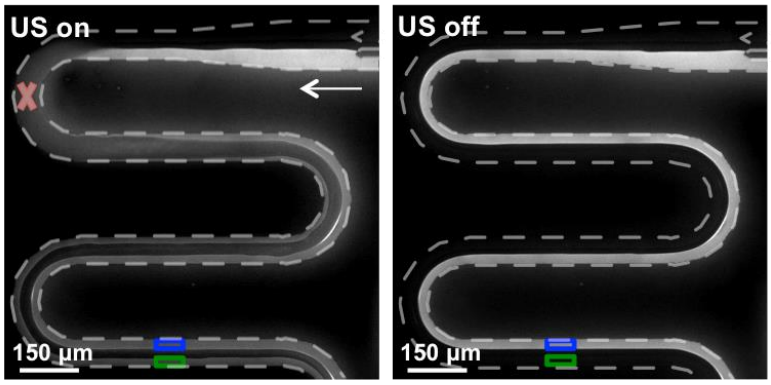


Figure II.10. Images en microscopie de fluorescence du canal en cas de mélange (US on) ou de non-mélange (US off) selon la méthode **I**. Les ultrasons sont focalisés au niveau de la croix rouge, les bords du canal sont indiqués par des pointillés, et les régions d'étude de l'intensité sont représentées par les zones bleue et verte respectivement.

La Figure II.11 représente typiquement les résultats obtenus pour cette analyse d'image. Sous l'effet des ultrasons, les niveaux de gris moyens sont équivalents dans les deux zones bleue et verte sélectionnées. Au contraire, en l'absence d'excitation ultrasonore, les deux phases latérales demeurent séparées par la phase non-miscible de PFC au centre, et les valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne des deux régions étudiées sont très différentes.

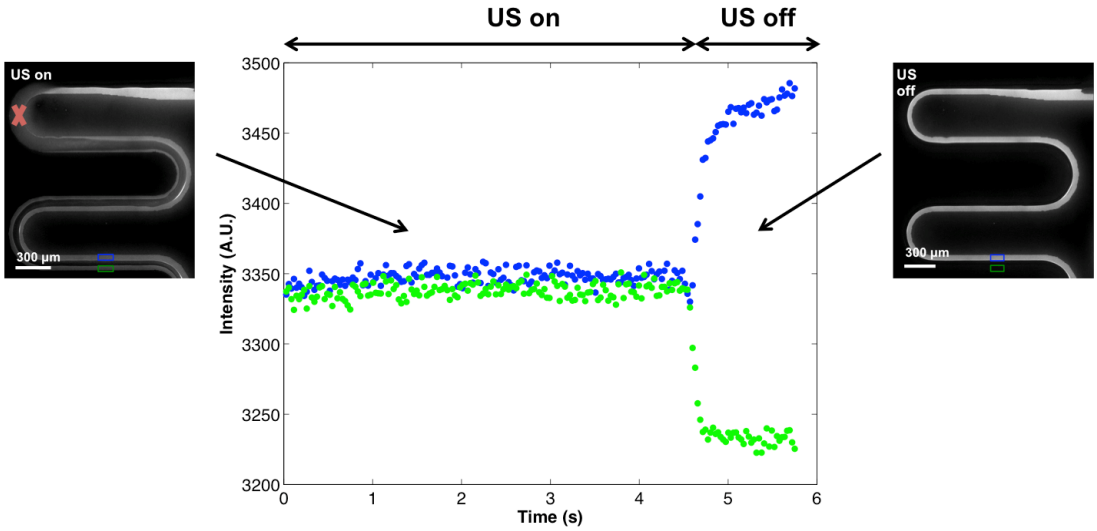


Figure II.11. Evolution de l'intensité moyenne au cours du temps dans les deux zones sélectionnées précédemment (cas d'une expérience avec activation initiale de la source ultrasonore, puis arrêt de cette dernière).

Afin d'évaluer de façon plus quantitative l'efficacité du mélange, nous avons utilisé un indicateur de mélange très répandu dans la littérature, utilisé en particulier par l'équipe de Baigl lors de leur étude[118] : le « mixing index », ou indice de mélange (MI). Sa formule est rappelée ci-dessous, *N* étant le nombre

de pixels impliqués dans les régions de mesure d'intensité, I_i l'intensité du pixel i et et $<I>$ l'intensité moyenne totale.

$$MI = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{1}^{N}\left(\frac{I_i - \langle I \rangle}{\langle I \rangle}\right)^2}$$

De façon simplifiée, il s'agit ici d'évaluer « l'écart à la moyenne » de l'intensité des zones étudiées. Ainsi, dans le cas d'un mélange parfait, l'intensité de chaque pixel devient égale à l'intensité moyenne des deux régions. L'écart à la moyenne est donc nul, et le MI est alors égal à 0. Au contraire, en cas de non-mélange, les pixels du fluide non fluorescent (noir) ou fluorescent (blanc) sont d'intensité très éloignée de la valeur moyenne (gris). L'écart à la moyenne est alors maximal, et le MI vaut donc 1. En résumé, un non-mélange correspond à MI = 1 tandis qu'un mélange parfait correspond à MI = 0.

Nous avons testé différents cas de mélange entre de l'huile minérale pure et de l'huile minérale teintée avec le Nile Red, un composé fluorescent (méthode **I**). Pour un débit total d'injection de 25 µL/min ($Q_{PFC} = 20\mu L/min$, $Q_{huile\,pure} = Q_{huile\,fluo} = 2.5\mu L/min$), on obtient le résultat représenté sur la Figure II.12. Le MI vaut alors en moyenne 0.04 ± 0.02, et on peut observer qu'une transition très rapide s'opère du régime de mélange vers le régime de non-mélange (de l'ordre de 100 ms) lorsqu'on coupe les tirs ultrasonores.

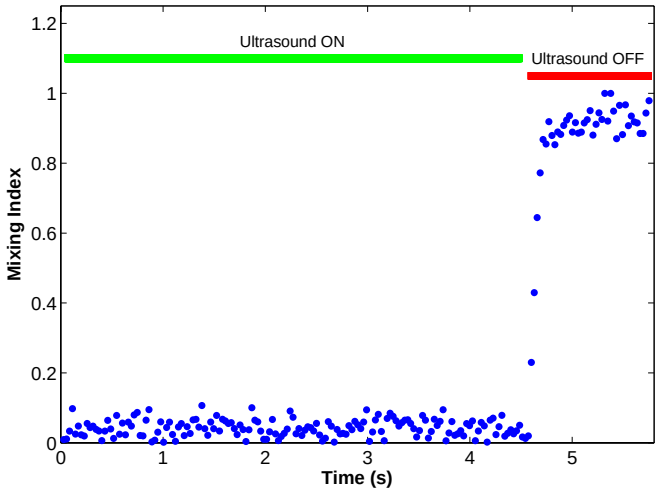


Figure II.12. Evolution de l'indice de mélange au cours du temps selon la méthode **I** (cas hydrophobe, débit total : 25 µL/min, Re = 0.023). Dans ce cas, le MI vaut 0.04 ± 0.02.

II.3.1.2 Cas hydrophile

Afin de démontrer la compatibilité de notre méthode à d'autres types de fluides, nous avons également testé le mélange entre de l'eau pure et de l'eau teintée avec de la fluorescéine à 800 µM (méthode **III**). La même fenêtre d'observation du canal que précédemment a été sélectionnée (Figure II.13).

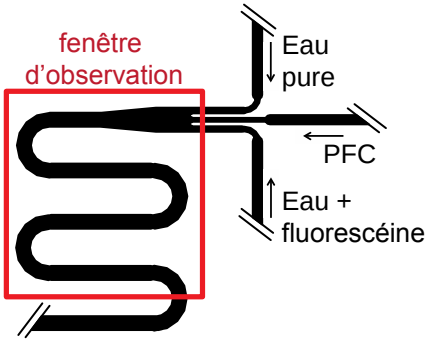


Figure II.13. Schéma de la portion du canal observée pendant l'étude de l'index de mélange.

On retrouve la présence de la même zone de mélange au point d'impact ultrasonore, et la même séparation des fluides en aval soulignée précédemment (Figure II.14). En l'absence d'ultrasons, les fluides restent séparés et circulent de façon laminaire.

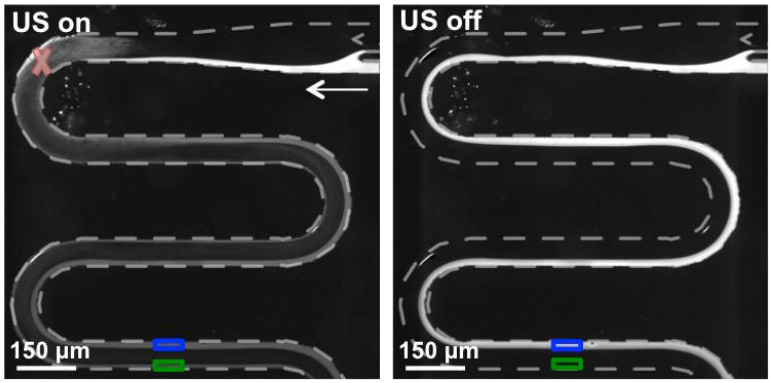


Figure II.14. Images en microscopie de fluorescence du canal en cas de mélange (US on) ou de non-mélange (US off) selon la méthode **III**. Les ultrasons sont focalisés au niveau de la croix rouge, les bords du canal sont indiqués par des pointillés, et les régions d'étude de l'intensité sont représentées par les zones bleue et verte respectivement.

Pour un débit total d'injection valant 18 µL/min ($Q_{PFC} = 8\mu L/min$, $Q_{eau\,pure} = Q_{eau\,fluo} = 5\mu L/min$), on obtient le résultat présenté dans la Figure II.15. En particulier, il faut noter qu'on atteint un MI moyen de 0.06 ± 0.02, avec un temps de transition entre les deux régimes de mélange et de non-mélange également de l'ordre d'une centaine de ms.

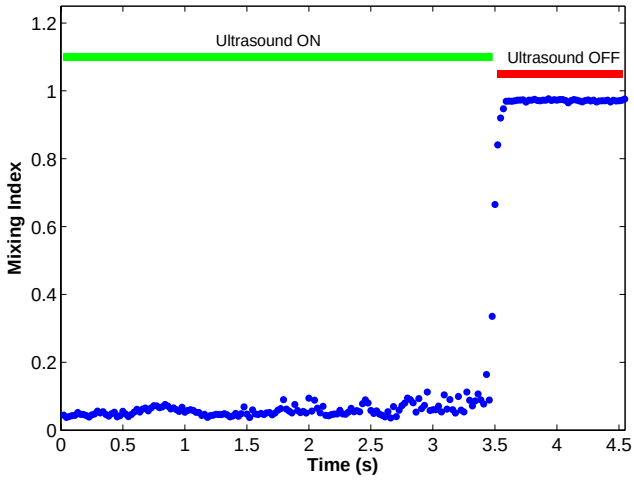


Figure II.15. Evolution de l'indice de mélange au cours du temps selon la méthode **III** (cas hydrophile, débit total : 18 µL/min, Re = 1.7). Dans ce cas, le MI vaut 0.06 ± 0.03.

Finalement, grâce aux propriétés de non-miscibilité du PFC, le mélange de solutions aqueuses aussi bien que le mélange d'huiles s'avère possible. L'efficacité ne dépend pas de la nature des fluides mélangés, et la transition entre les régimes de mélange/non-mélange dépend majoritairement du débit d'injection des fluides.

II.3.2 Etude de la gamme de nombres de Reynolds atteignable

Nous avons également souhaité démontrer l'adaptabilité de notre méthode de mélange à des fluides de viscosités différentes, et ainsi mettre en évidence le comportement de notre mélangeur sur une large gamme de nombres de Reynolds. Nous avons donc reproduit l'expérience décrite précédemment, où l'index de mélange avait été évalué à partir du mélange de deux fluides de même nature, l'un fluorescent, l'autre non, en faisant varier les fluides en jeu (fluides décrits au paragraphe **II.2.1**). Nous avons ainsi été capables de montrer que le MI s'échelonnait entre 0.03 et 0.07 tout au long d'une gamme de nombres de Reynolds couvrant environ quatre décades ($10^{-4} < Re < 2$). Les résultats obtenus lors de cette étude sont rassemblés dans le Tableau II.3.

Tableau II.3. MI obtenus pour différentes natures et débits de fluides et donc pour différents Re.

Nature du fluide	Viscosité cinématique ($m^2.s^{-1}$)	Nombre de Reynolds	MI
Huile	$\nu_{huile3} = 67x10^{-6}$	$1.5.10^{-4}$	0.07 ± 0.02
		5.10^{-4}	0.04 ± 0.03
Huile	$\nu_{huile2} = 36.10^{-6}$	$2.3.10^{-2}$	0.04 ± 0.02
Huile	$\nu_{huile1} = 16x10^{-6}$	$2.1.10^{-3}$	0.04 ± 0.01
		$2.1.10^{-2}$	0.06 ± 0.01
Huile	$\nu_{huile4} = 1x10^{-6}$	2.10^{-1}	0.04 ± 0.03
		$2.7.10^{-1}$	0.03 ± 0.01
		$6.7.10^{-1}$	0.05 ± 0.01
Eau	$\nu_{eau} = 1x10^{-6}$	1.7	0.06 ± 0.02

Pour toutes les valeurs de *Re* testées, le MI correspondant est inférieur à 0.1 (Figure II.16). Or, comme nous l'avons vu précédemment, plus le MI est proche de zéro, plus le mélange est considéré comme proche du cas idéal.

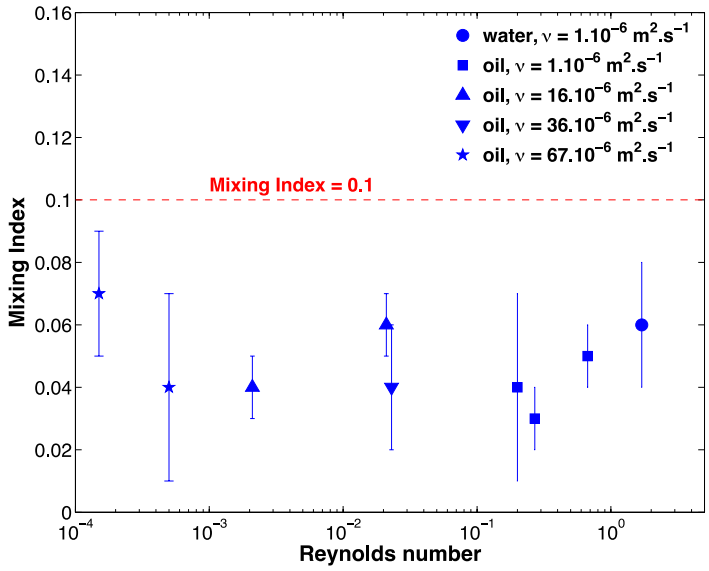


Figure II.16. Indice de mélange en fonction du nombre de Reynolds.

Finalement, dans tous les cas de figures explorés lors de cette étude, des valeurs de MI particulièrement satisfaisantes ont été obtenues.

Il faut souligner que nous n'avons pas trouvé d'autres exemples dans la littérature d'un mélangeur capable de couvrir quatre ordres de grandeur de nombres de Reynolds,[119,120,121] incluant à la fois des valeurs faibles de Re, et des valeurs plus modérées, ou en d'autres termes plus proches des régimes hydrodynamiques visqueux voire inertiels.

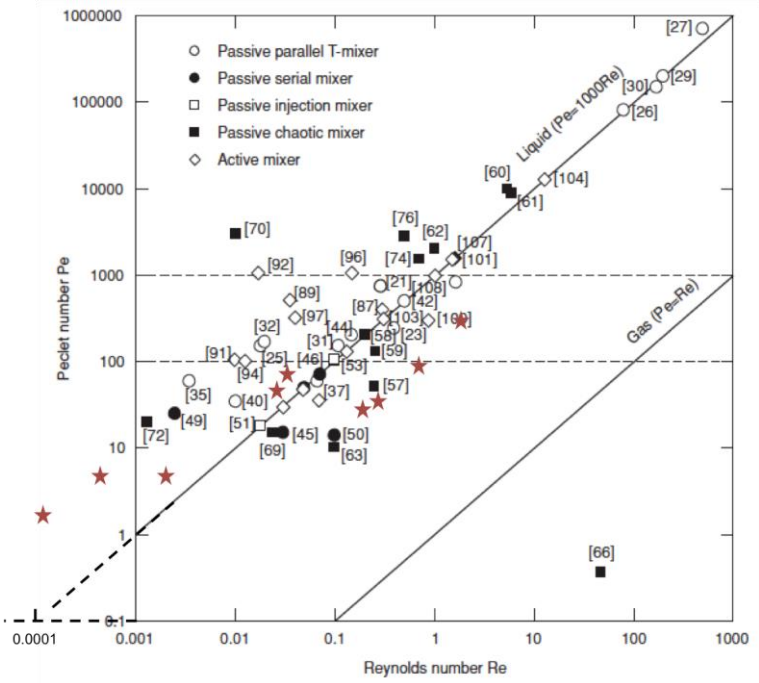


Figure II.17. Domaines de performance des micromélangeurs rapportés dans la littérature par Nguyen *et al*. (figure extraite de la référence 121), et résultats obtenus avec notre micromélangeur (en rouge).

En particulier, il est possible de comparer nos résultats avec ceux rassemblés par Nguyen *et al*. dans leur revue sur les micromélangeurs,[121] citée plus de 1000 fois (Figure II.17). Il apparaît alors que non seulement nous sommes capables de mélanger des fluides dans les domaines microfluidiques les plus explorés par d'autres micromélangeurs (10^{-2} < Re < 10), mais que nous sommes également capables de mélanger dans des gammes de Re beaucoup moins référencées (10^{-4} < Re < 10^{-2}).

Notre système de mélange semble donc particulièrement flexible en termes de nature et de viscosité des fluides. En outre, le mélange conserve une qualité équivalente sur quatre ordres de grandeur de nombres de Reynolds.

[119] Feng, X.; Ren, Y.; Jiang, H. *Biomicrofluidics* **2013**, *7*, 054121.

[120] Shih, T. R.; Chung, C. K. *Microfluid. Nanofluid.* **2008**, *5*, 175-183.

[121] Nguyen, N.-T.; Wu, Z. *J. Micromech. Microeng.* **2005**, *15*, R1-R16.

II.3.3 Capacité de mélange à la demande

Nous avons vu que le mélange n'était initié qu'au niveau de la zone focale du transducteur ultrasonore. En effet, c'est uniquement dans cette zone que peut se produire l'émulsification nécessaire au mélange entre les deux fluides à mélanger, grâce à la vaporisation du PFC. Le mélange peut être contrôlé à condition d'activer ou de désactiver la source ultrasonore. Ainsi, la Figure II.18 montre une séquence d'événements de mélange puis de non-mélange. On peut observer que tant que l'excitation ultrasonore est appliquée au système, le mélange reste stable et l'index de mélange (MI) est optimal (Figure II.18**.a**). Dès que le transducteur est inactivé, un court régime transitoire est observé (Figure II.18**.b**), tandis que les flux laminaires, continuant d'être injectés dans le système remplacent les fluides mélangés (Figure II.18**.c**) pour finalement atteindre un MI maximal correspondant à des fluides parfaitement séparés (Figure II.18**.d**). Lorsque les ultrasons sont à nouveau appliqués au système (Figure II.18**.e**), un nouvel état de transition apparaît (Figure II.18**.f** et Figure II.18**.g**) jusqu'à atteindre à nouveau un régime de mélange stable (Figure II.18**.h**). L'efficacité et le temps nécessaire pour initier les transitions entre des états de mélange ou de non-mélange se sont avérés totalement reproductibles, le MI diminuant instantanément après l'arrêt des tirs ultrasonores (Figure II.19). Signalons que selon le débit d'injection des fluides en entrée du canal, la vitesse de transition entre les états de mélange et de non-mélange peut être modulée. Par exemple, cette transition s'effectue en environ 1s à un débit total de 9.6 µL/min. Il est possible de descendre à 115 ms si les fluides sont injectés à un débit plus élevé de 18 µL/min ou encore à 92 ms à un débit de 25 µL/min. Cette observation expérimentale tend à montrer que le manipulateur pourrait être capable d'ajuster le temps de transition entre le mélange et le non-mélange, simplement en ajustant le débit d'injection des fluides.

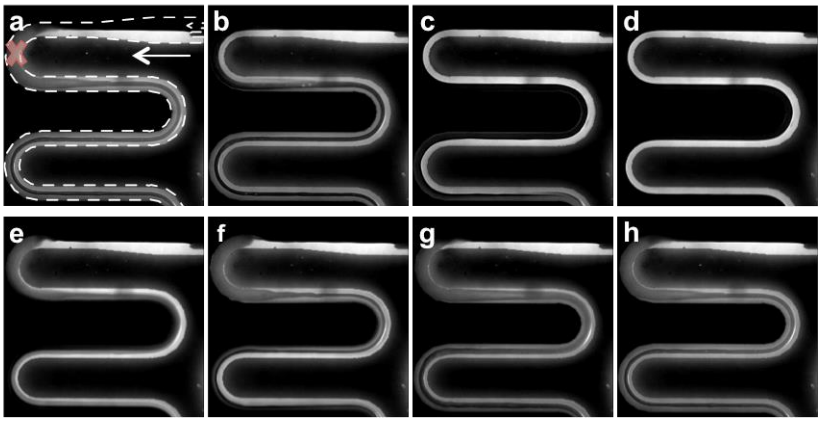


Figure II.18. Images en microscopie de fluorescence du mélange à la demande entre deux phases d'huile minérale selon la méthode **A**. Les ultrasons sont focalisés au niveau de la croix rouge, les bords du canal sont indiqués sur l'image **a** par des pointillés.

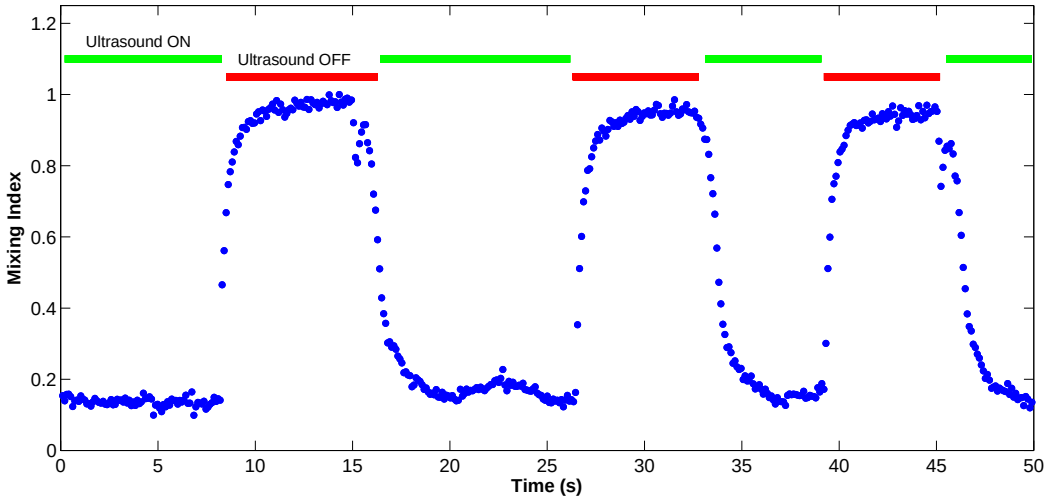


Figure II.19. Indice de mélange associé au mélange à la demande de deux phases d'huile minérale.

II.3.4 Etude du mécanisme de mélange

L'utilisation de solvants perfluorés pour initier un mélange dans un système microfluidique étant un concept nouveau, nous avons cherché à comprendre plus précisément les mécanismes physiques sous-tendant le phénomène d'émulsification du PFC. Pour cela, nous avons conduit une série d'expériences au cours desquelles nous avons fait varier les paramètres ultrasonores tels que l'amplitude des pulses, le nombre de cycles au sein de chaque pulse, ou encore l'intervalle entre deux pulses (Figure II.20).

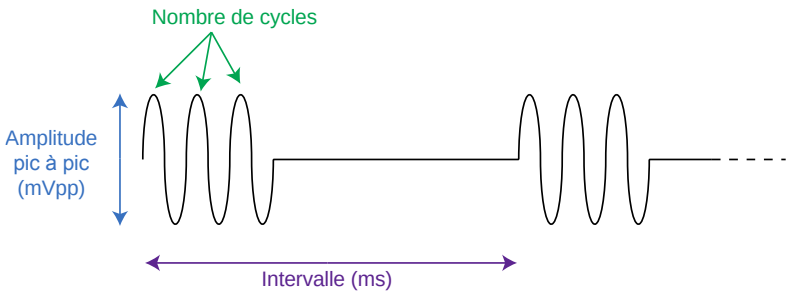


Figure II.20. Représentation schématique d'un pulse ultrasonore et des paramètres associés.

A partir de ces paramètres, nous avons été en mesure de calculer d'une part la pression acoustique négative maximale dite « Peak-Negative Pressure » ou « PNP » (en MPa) et, d'autre part, l'intensité totale de l'onde focalisée (en Watt/cm^2). Les valeurs de PNP sont obtenues à partir des paramètres expérimentaux grâce à l'étalonnage du transducteur ultrasonore préalablement effectué (*cf* partie expérimentale). L'intensité de l'onde focalisée est calculée à l'aide de la formule ci-dessous,[122] avec ρ_0

[122] Cobbold, R. S. C. *Foundations of Biomedical Ultrasound, Oxford University Press* (2006).

étant la densité du liquide (ici, on considère la densité de l'eau), c_0 représentant la vitesse du son dans le liquide (on utilise la vitesse du son dans l'eau), et P étant la moyenne des valeurs absolues des pressions acoustiques positive et négative maximales. Le « $duty\ cycle$ » représente pour sa part le rapport entre la longueur réelle d'un pulse et l'intervalle entre deux pulses.

$$I = \frac{P^2}{2\rho_0 c_0} \times duty\ cycle$$

Dans cette approximation de la valeur d'intensité, on simplifie le milieu traversé en tenant uniquement compte du bain d'eau contenant le système. En particulier, on ne tient pas compte des pertes aux interfaces.

Les deux grandeurs de pression négative maximale et d'intensité peuvent affecter différemment le perfluorocarbone liquide. En effet, les effets à caractère mécaniques tels que la cavitation sont majoritairement corrélés à la « Peak-Negative Pressure » (PNP), tandis que les effets thermiques tels que la vaporisation sont plutôt associés à l'énergie totale absorbée par le milieu (ici, par le PFC). Pour chaque expérience de mélange, nous avons calculé la PNP, ainsi que l'intensité acoustique associées aux paramètres ultrasonores, et nous avons analysé l'évolution de l'intensité moyenne de fluorescence dans les deux régions habituelles décrites au paragraphe **II.2.2.1** (Méthode **I**). Dans le cas où l'application des ultrasons au système microfluidique était corrélée à une intensité moyenne devenant égale dans les deux zones mentionnées ci-dessus, l'expérience était classée comme « permettant le mélange » (Figure II.21, points verts). Lorsque l'intensité tendait à devenir identique dans les deux zones, mais de façon imparfaite (oscillations de la valeur d'intensité au cours du temps, ou encore rapprochement de la valeur dans les deux zones sans atteindre l'égalité des valeurs), l'expérience était classée comme « donnant un mélange instable » (Figure II.21, points bleus). Enfin, dans les cas où l'intensité moyenne dans chaque zone demeurait égale aux valeurs correspondant au non-mélange, l'expérience était classée comme « ne permettant pas le mélange » (Figure II.21, points rouges).

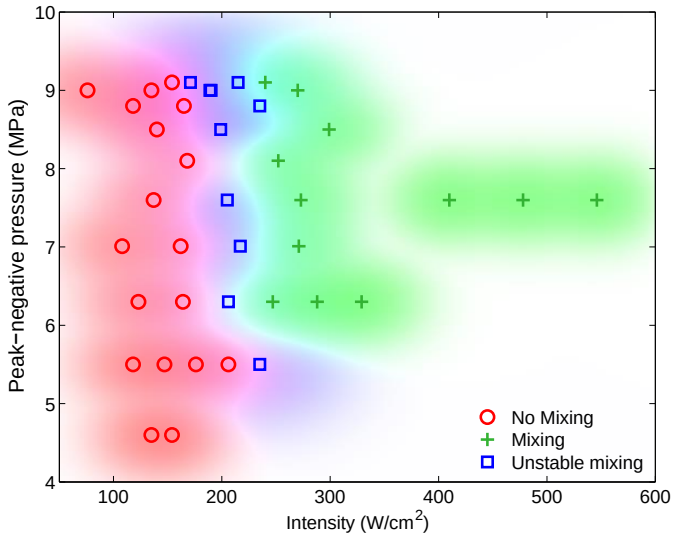


Figure II.21. Evaluation de l'efficacité du mélange en fonction des paramètres ultrasonores appliqués au système.

La Figure II.21 montre une représentation en fonction de la PNP et de l'intensité acoustique de ces différentes expériences. A la vue de ces résultats, on remarque que l'efficacité du mélange dépend majoritairement de l'énergie acoustique absorbée, ce qui, nous l'avons vu précédemment, tend à montrer que l'émulsification du PFC dans la zone focale repose sur un phénomène de vaporisation et non de cavitation. Cependant, il est difficile d'évaluer avec certitude les mécanismes physiques sous-tendant ce mélange, et l'étude décrite ici n'apporte qu'un élément de réponse.

II.3.5 Eléments de la cinétique de mélange

Nous avons vu précédemment qu'on pouvait estimer la cinétique de transition entre les états de mélange et de non-mélange grâce aux expériences impliquant des fluides fluorescents et non-fluorescents. Cependant, dans la zone focale, les différents fluides sont très émulsifiés, et il est alors très compliqué d'obtenir une estimation des temps de mélange à proprement parler. Afin d'accéder à une mesure du temps de mélange, nous avons envisagé de mesurer la longueur de canal nécessaire pour affecter la laminarité des fluides co-injectés. Pour cela nous avons utilisé une méthode expérimentale différente (Méthode **II**). Il s'agit ici de co-injecter trois fluides, la phase centrale étant comme précédemment une phase de PFC, tandis que les phases latérales sont deux phases d'huile, l'une pure, l'autre contenant une suspension de billes de polystyrène fluorescentes de 10 µm de diamètre. Chaque séquence d'images est traitée *via* Matlab avec un effet de seuillage afin d'isoler le signal correspondant aux trajectoires des billes (très fluorescentes) du signal environnant (peu ou non-fluorescent). Les signaux ainsi isolés sont ensuite sommés sur une seule image pour donner une représentation de la somme de toutes les trajectoires des billes (Figure II.22 et Figure II.23).

Ainsi, nous observons qu'en l'absence de perturbation ultrasonore, les trajectoires de toutes les billes restent cantonnées à un seul côté du canal microfluidique, les flux étant laminaires (Figure II.22.**a**). Lorsque les ultrasons sont activés, le PFC se vaporise dans la zone focale et les fluides latéraux sont mélangés. Les billes vont alors se répartir uniformément des deux côtés du canal (Figure II.22.**b** à **d**).

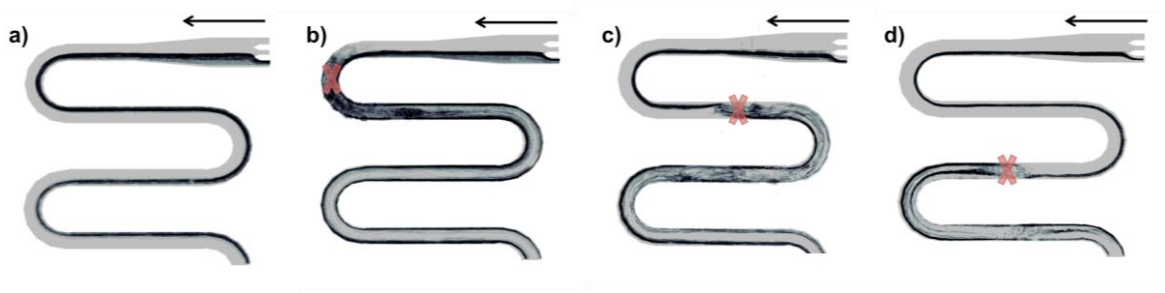


Figure II.22. Mélange de deux phases d'huile selon la Méthode **II** (billes en suspension dans l'huile, ν_{huile} = 36.10^{-6} $m^2.s^{-1}$). Les ultrasons sont focalisés au niveau de la croix rouge en différentes positions (**b**, **c** et **d**) ou désactivés (**a**).

Nous avons également testé cette séparation des billes pour différents débits. La séparation des billes des deux côtés du canal semble, qualitativement, s'opérer de manière similaire pour les différents débits testés (correspondant à des nombres de Reynolds s'échelonnant entre 0.0074 et 0.037) (Figure II.23).

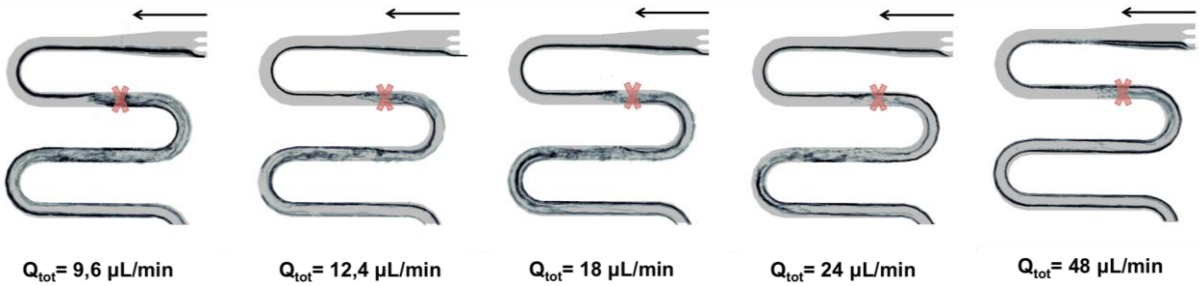


Figure II.23. Mélange de deux phases d'huile (ν_{huile} = 36.10^{-6} $m^2.s^{-1}$) selon la Méthode **II** et pour différents débits d'injection.

Pour chaque valeur de débit testée, nous avons pu définir une zone de travail, dont la taille correspond à celle de la moitié du canal (en rouge sur la Figure II.24), et située à l'opposé du côté d'injection des billes.

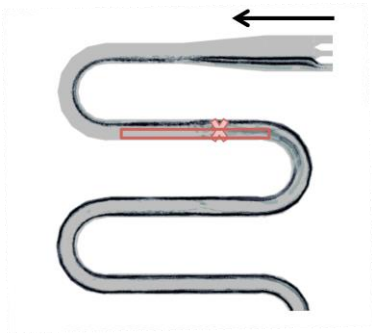


Figure II.24. Définition d'une zone de travail dans le canal microfluidique.

Une fois le seuillage en intensité effectué (Figure II.25.**a)**), toutes les images obtenues au cours du temps ont été sommées (Figure II.25**.b)**). La zone étudiée chevauche la zone impactée par les ultrasons. En amont de cette zone, aucune bille ne parcourt cette portion du canal (régime laminaire, billes cantonnées de l'autre côté du canal). Du signal de fluorescence apparaît au niveau de la zone focale à mesure que les billes commencent à traverser le canal sous l'effet des ultrasons. L'intensité de fluorescence est ensuite sommée selon l'axe y pour obtenir un vecteur (Figure II.25**.c)**)

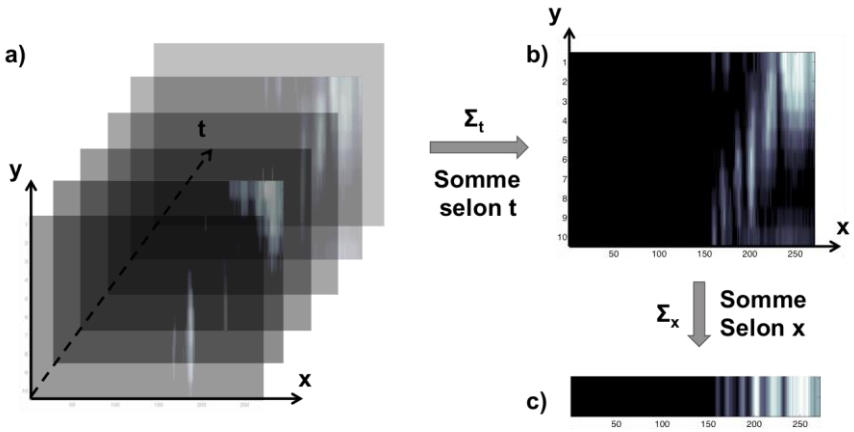


Figure II.25. Somme de l'intensité le long de la largeur de la zone d'étude.

Les valeurs de ce vecteur sont représentées numériquement. Ces points expérimentaux sont modélisés par une fonction dite « sigmoïde » (Figure II.26). On relève ensuite l'abscisse de deux points particuliers, respectivement à 10% et 90% de la valeur de plateau de la sigmoïde.

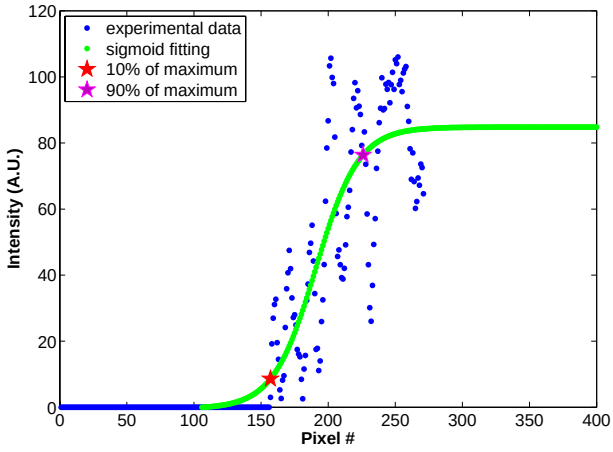


Figure II.26. Exemple de courbe sigmoïde obtenue à partir de notre traitement d'image.

En connaissant le débit total des fluides dans le canal, la distance entre ces deux points nous permet d'évaluer pour chaque valeur du nombre de Reynolds le temps nécessaire pour affecter la laminarité du flux incident. Ce temps est très proche pour toutes les expériences menées, et équivaut en moyenne à 1.2 ± 0.5 ms (Tableau II.4).

Tableau II.4. Temps nécessaire pour perdre la laminarité du système en fonction du nombre de Reynolds.

Débit total	Nombre de Reynolds	Temps de perte de laminarité (ms)
9.6 µL/min	7.4×10^{-3}	0.4
12.4 µL/min	1.1×10^{-2}	1.8
18 µL/min	1.4×10^{-2}	1.2
36 µL/min	2.8×10^{-2}	1.7
48 µL/min	3.7×10^{-2}	0.9

Il faut souligner qu'il est particulièrement intéressant d'observer un temps de mélange indépendant des débits d'injection. En effet, dans le cas des mélangeurs passifs en particulier, l'augmentation des débits conduit en général à des temps et des longueurs de mélange allongés.

II.4. Conception d'un système intégrable

Le PFC a été choisi ici comme étant la phase séparatrice en raison de sa capacité à se vaporiser sous l'effet d'une stimulation ultrasonore. Dans la perspective de devoir séparer le PFC des fluides, il est

possible de tirer parti de sa densité élevée (en particulier, le perfluoropentane et le perfluorohexane utilisés dans notre étude ont une masse volumique de 1.63 g/mL et 1.67 g/mL à 25 °C respectivement), ou encore sa non-miscibilité avec la plupart des fluides usuels, ou ses propriétés de mouillage très particulières. La solution la plus simple pour séparer les fluides est d'exploiter la différence de densité : le PFC étant systématiquement plus lourd que les autres fluides, il peut être assez simple d'imaginer un processus de décantation pour récupérer les fluides mélangés. Cependant, nous avons proposé une méthode plus directe, utilisant la propriété du PFC de se recondenser rapidement au centre du canal et en aval de la zone de mélange.

II.4.1 Etude de la cinétique de démixion du PFC

Afin d'exploiter la démixion spontanée du PFC, il est utile de s'intéresser à sa cinétique. Nous avons pour cela étudié le comportement de trois fluides co-injectés selon la Méthode **I**, au niveau du long serpentin de notre système microfluidique. L'observation du système à ce niveau nous permet d'accéder à des temps plus longs que lors des études précédentes, puisque la distance à parcourir par les fluides est plus longue dans cette portion du canal que dans celle étudiée précédemment.

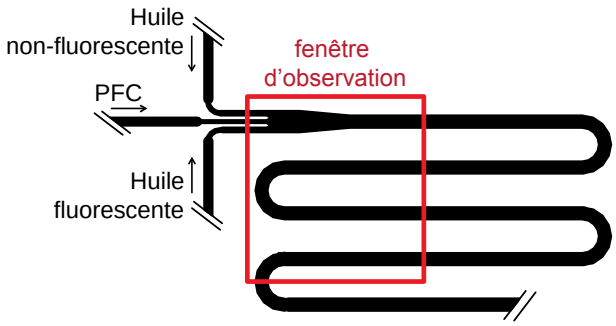


Figure II.27. Représentation schématique du canal microfluidique utilisé.

En présence d'ultrasons focalisés, la phase centrale de PFC se vaporise, entraînant alors le mélange des fluides adjacents *via* une zone de forte émulsification. On définit alors dans le canal quatre zones d'étude *a*, *b*, *c* et *d* : la première zone, située au niveau de la zone de tir ultrasonore, correspond donc au début du mélange. La zone *b* est située à environ 4 mm en aval de la zone de tir, la zone *c* à environ 8 mm en aval et enfin la zone *d* située 12 mm en aval de la zone d'impact ultrasonore.

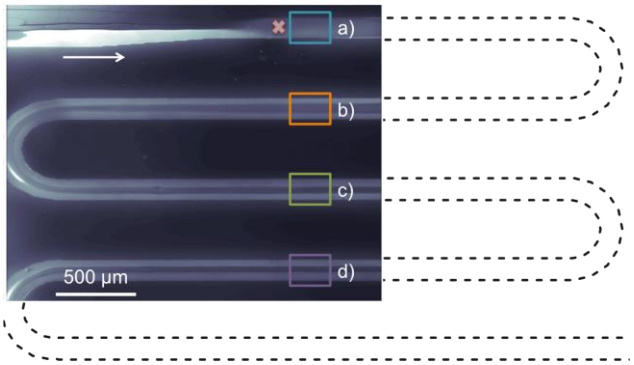


Figure II.28. Image en microscopie de fluorescence du mélange entre deux phases d'huile. Les ultrasons sont focalisés au niveau de la croix rouge, et quatre zones d'intérêt sont définies et représentées sur l'image par des contours colorés (Méthode **A**, débit total : 10.6 µL/min).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la valeur de l'indice de mélange MI dans chaque zone sélectionnée (Figure II.29). Il est intéressant de noter que parmi les quatre zones étudiées, le MI le plus élevé est mesuré au niveau de la zone focale (0.26 en moyenne), mais que dans les zones en aval, sa valeur se stabilise (0.13 en moyenne). Un mélange optimal est donc obtenu rapidement en aval de la zone focale, et le mélange ne s'améliore plus au cours du temps : cela confirme le fait que le mélange est ici un phénomène rapide.

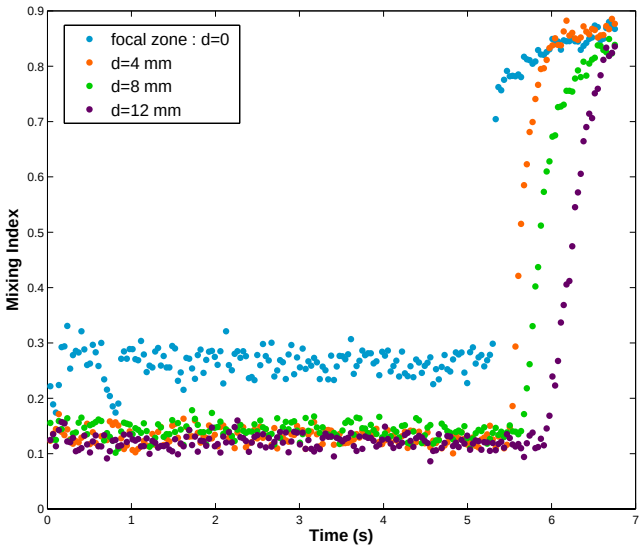


Figure II.29. Evolution de l'indice de mélange MI au cours du temps dans les 4 zones sélectionnées (les ultrasons sont coupés à 5.5 s).

Dans un second temps, il s'agit d'étudier la cinétique de démixion du PFC et des fluides mélangés le long du canal. L'information contenue dans chaque zone sélectionnée au sein de l'image précédente en microscopie de fluorescence est représentée sous forme d'un vecteur, et ce pour chaque image de la

série d'acquisition. Pour cela, comme illustré dans la Figure II.30, à chaque instant *t*, le signal de chaque zone est moyenné selon la direction de l'axe *x*.

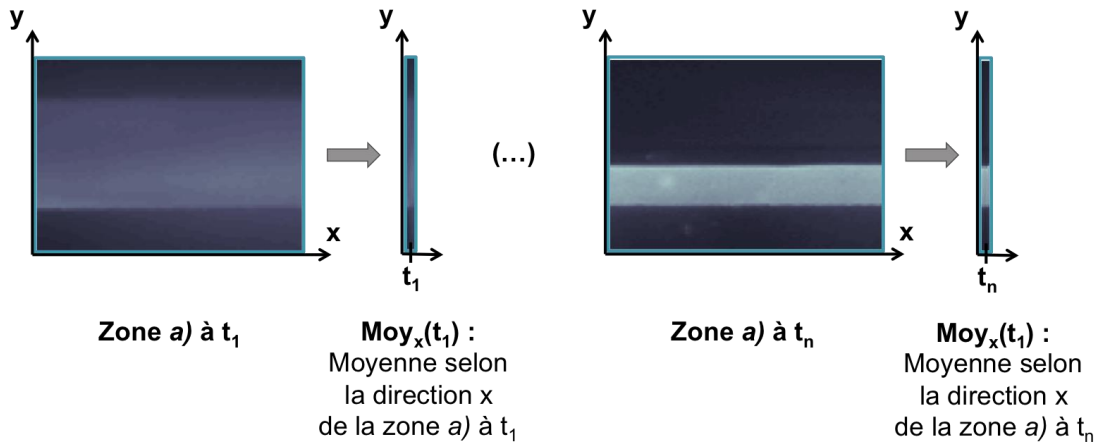


Figure II.30. Principe de la méthode de moyennage de l'intensité de fluorescence selon l'axe x pour chaque image de la durée de l'acquisition.

Tous les vecteurs *x(t)* sont ensuite rassemblés pour former une seule et même image, comme illustré dans la Figure II.31, selon une analyse comparable au mode « M » (« Motion ») en échographie. Ainsi, lorsque l'on progresse de gauche à droite, on observe l'évolution de l'intensité de fluorescence moyenne selon une coupe verticale au cours du temps. En particulier, on peut observer de façon nette la transition qui s'effectue entre le début de la séquence où les ultrasons sont appliqués au système, et la fin de la séquence où les ultrasons sont coupés.

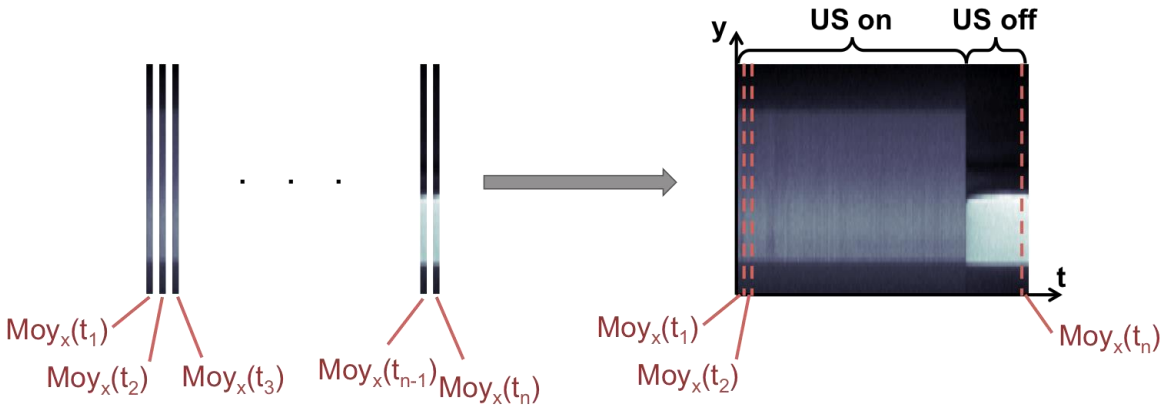


Figure II.31. Résultat obtenu après moyennage : on progresse donc dans le temps de gauche à droite de l'image.

Le même traitement d'image est appliqué aux quatre zones sélectionnées, et on obtient alors les résultats représentés Figure II.32 :

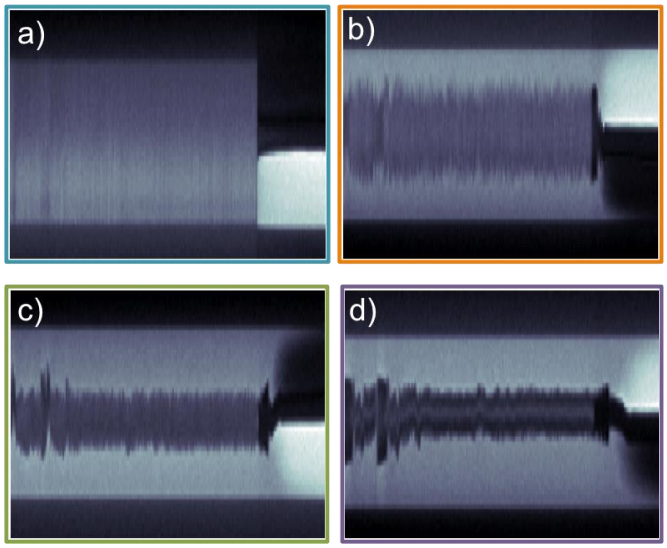


Figure II.32. Représentation de l'intensité moyenne de long des zones d'intérêt en fonction du temps.

Il apparaît, lors de l'analyse des images, que plus on progresse le long du canal microfluidique en aval de la zone de mélange utrasonore (Figure II.32**.a** à Figure II.32**.d**), plus la phase de PFC se recondense au centre du canal. Les fluides latéraux mélangés restent cantonnés de part et d'autre de cette phase centrale de PFC. Il est alors possible de mesurer l'évolution de la largeur de la phase de PFC dans les différentes zones sélectionnées précédemment. Cela nous donne ainsi une idée de la cinétique de démixion du PFC en fonction de la distance parcourue par les fluides (Figure II.33).

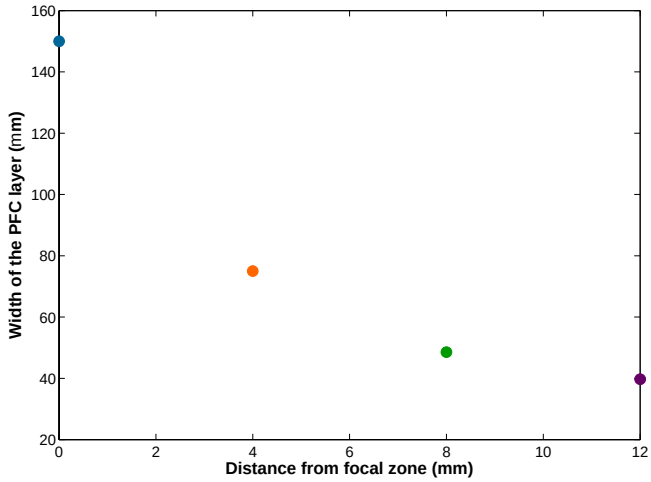


Figure II.33. Largeur du flux de PFC (en µm) en fonction de la distance à la zone focale (en mm).

Si on compare cette cinétique de démixion à l'évolution du MI le long du canal, on constate que si le mélange est bien un phénomène rapide, la démixion, quant à elle, l'est beaucoup moins : dans la perspective de séparer le PFC des fluides mélangés, l'utilisateur a donc tout intérêt à se placer le plus

en aval possible de la zone de mélange. Il faut souligner que cette étude a été menée avec une seule valeur de débit (débit total = 10.6 µL/min). Il serait intéressant d'évaluer la dépendance en débit du phénomène de démixion.

II.4.2 Mise au point d'un système d'extraction du PFC

De façon à exploiter la capacité du PFC à se recondenser rapidement et spécifiquement au centre du canal pour l'extraire du système après le mélange, nous avons conçu en sortie du canal une unité de séparation des fluides symétrique de l'entrée, mais dont le canal central est plus large que les canaux latéraux, afin de permettre une séparation optimale des fluides (Figure II.34).

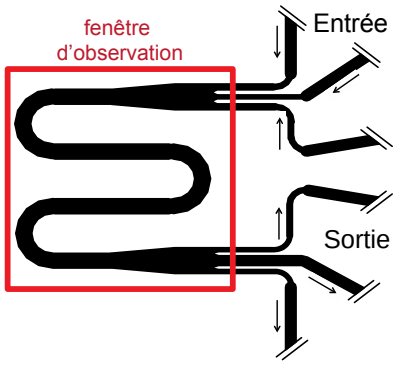


Figure II.34. Représentation schématique du canal microfluidique conçu pour la récupération du PFC en aval de la zone de mélange.

Notre critère principal étant de ne pas contaminer les phases de fluides mélangés avec du perfluorocarbone, ce dernier est récupéré dans la branche centrale du module de sortie, en même temps qu'avec une faible quantité de fluides mélangés.

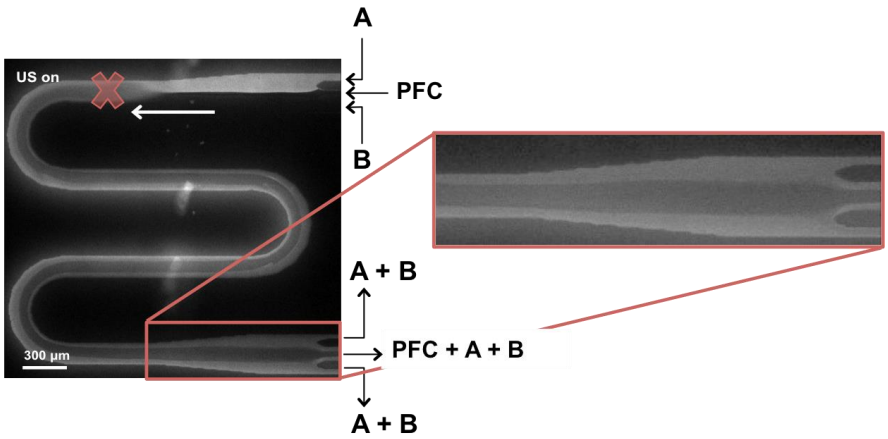


Figure II.35. Images en microscopie de l'extraction de la phase perfluorocarbonée hors du système microfluidique. La zone focale est désignée par la croix rouge, et la direction du flux par la flèche blanche.

Finalement, une telle géométrie assure une double fonction : les étapes de mélange et de séparation sont assurées sur une seule puce. Il s'agit donc d'un système autonome potentiellement intégrable dans un laboratoire sur puce.

II.5. Conclusion

Nous avons conçu un nouveau type de mélangeur microfluidique actif, particulièrement efficace, et basé sur la vaporisation d'un flux central de perfluorocarbone, vaporisation limitée à la zone focale d'un transducteur ultrasonore. Nos résultats montrent que lorsque les ultrasons sont focalisés au sein du canal microfluidique, la laminarité du flux entrant est perturbée en moins de 2 ms, tandis que la transition complète d'un état de mélange à un état de non-mélange, et inversement, a pu être obtenue aussi rapidement qu'en une centaine de microsecondes après l'activation/désactivation de la source ultrasonore. Une efficacité de mélange élevée a été atteinte comme l'illustre le calcul de l'indice de mélange MI toujours inférieur à 0.2 pour les différents fluides testés. Cette efficacité est constante sur au moins quatre ordres de grandeur de nombres de Reynolds, ce qui fait figure d'exception parmi les micromélangeurs recensés dans la littérature. De manière générale, cette méthode est simple à mettre en œuvre et très efficace, elle ne nécessite pas de créer des géométries sur mesure, et surtout, elle permet de mélanger des fluides de différentes natures (composition, viscosité…) dans des systèmes microfluidiques à la fois hydrophiles et hydrophobes. D'autre part, une séparation spontanée des fluides mélangés et du PFC ayant lieu en aval de la zone focale, la phase centrale de PFC peut alors être séparée de manière simple du reste des fluides en sortie du canal.

II.6. Perspectives

Cette méthode de mélange acoustique activée à distance de manière spatialement précise pourrait s'inscrire dans le cadre d'une nouvelle génération de mélangeurs à la demande, très rapides, efficaces, et flexibles, tant au niveau de leur géométrie qu'au niveau des différences de mouillage supportées. De tels mélangeurs pourraient être intégrés au sein de laboratoires sur puce, d'autant plus facilement qu'à terme, le système ultrasonore actuel pourrait par exemple être miniaturisé sous forme de composants piezzoélectriques directement intégrés dans les puces. Un tel système autonome pourrait trouver des applications pour la mesure de cinétiques de réactions chimiques, ou encore pour la synthèse de composés en microfluidique.

II.7. Partie expérimentale

II.7.1 Généralités

Composés commerciaux : Le Nile Red, la fluorescéine et l'huile minérale proviennent de chez Sigma Aldrich. Les billes fluorescentes (10 µm de diamètre) sont acquises sous forme de suspension dans l'eau auprès de Invitrogen. Le perfluorohexane est obtenu auprès de la société 3M (sous le nom commercial FC-72), et le perfluoropentane provient de la société FluoroMed.

Fabrication des systèmes microfluidiques : (pour plus de détails, voir Annexe 1) Les systèmes utilisés sont fabriqués dans du PDMS (Polydiméthylsiloxane), en utilisant des procédés de « soft-lithographie » classiques. Un moule de silicone est fabriqué à partir de dépôts de résine SU8 (SU8 2015, MicroChem) sur un wafer de silicone, puis du PDMS (RTV615, Momentive Performance Materials) est coulé sur ce moule puis réticulé à 70 °C pendant environ 2 h. Les surfaces à la fois du PDMS et d'une lame en verre utilisée pour fermer les canaux sont traitées sous plasma à oxygène avant d'être scellées avec une excellente adhésion. Ce traitement confère également un caractère hydrophile aux canaux. Ils sont ainsi utilisés immédiatement après l'étape de traitement plasma dans le cas de l'injection de fluides hydrophiles (eau/solution aqueuse de fluorescéine). Cependant, lorsqu'on utilise ces systèmes avec d'autres fluides tels que les huiles minérales, on s'assure de restaurer le caractère hydrophobe du PDMS en laissant les puces à 90 °C pendant au minimum 24 h.

Le système microfluidique fabriqué est ensuite connecté avec une séries de tubes capillaires (Tube PEEK 1541, Idex Health and Science) à un pousse-seringue (neMESYS low pressure syringe pump, Cetoni). Les fluides sont visualisés à l'intérieur du microcanal grâce à un microscope inversé (Leica) à fluorescence.

Les canaux utilisés lors de notre étude possèdent les dimensions indiquées ci-dessous (Figure SII.1), ainsi qu'une épaisseur de 14 µm.

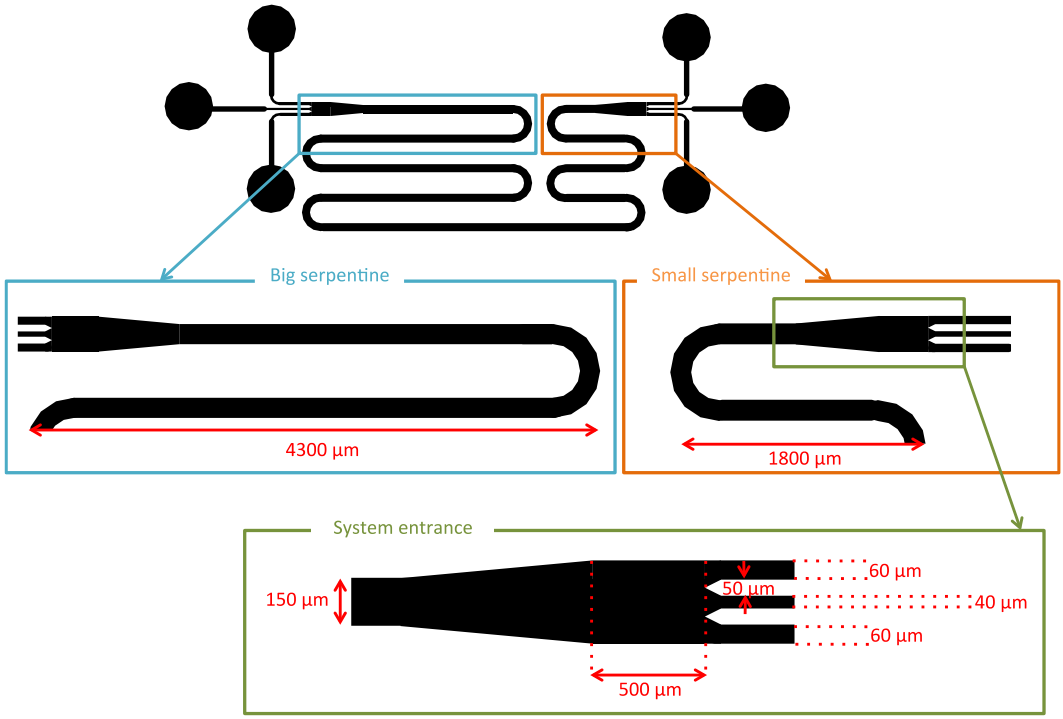


Figure SII.1. Géométrie des systèmes utilisés : le système complet est dessiné à l'échelle, et les caractéristiques géométriques des zones d'intérêt sont également indiquées.

Montage expérimental : Dans toutes les expériences traitées dans ce chapitre, les fluides ont été injectés dans un système de polydiméthylsiloxane (PDMS) scellé avec une lame en verre, dont la hauteur est uniforme et égale à 14 µm. Un transducteur ultrasonore mono-élément, amplifié par un amplificateur radio-fréquence, de fréquence centrale 2.25 MHz (distance focale = 38 mm, f/d = 1) est focalisé dans le canal microfluidique et émet des pulses (1 à 40 cycles, espacés de 100 µs à 1 ms) dont l'amplitude peut être modulée de 4.6 à 9.1 MPa (pression acoustique négative maximale = PNP). Une caméra EM-CCD (Andor, iXon), montée sur un microscope à fluorescence (Leica, 4X avec un filtre Leica 11513880) permet d'enregistrer l'évolution de la fluorescence pendant et entre les événements de mélange.

Au cours de cette étude, trois situations différentes ont été étudiées :

Méthode I : 3 fluides sont injectés, respectivement de l'huile minérale teintée avec un colorant fluorescent, le Nile Red (600 µM), un mélange 1:1 de perfluorohexane/perfluoropentane, et de l'huile minérale pure.

Méthode II : 3 fluides sont injectés, respectivement une suspension de billes fluorescentes de polystyrène (10 µm de diamètre) dans de l'huile minérale, un mélange 1:1 de perfluorohexane et de perfluoropentane, et de l'huile minérale pure.

Méthode III : 3 fluides sont injectés, respectivement une solution aqueuse de fluorescéine (800 µM), un mélange 1:1 de perfluorohexane et de perfluoropentane, et de l'eau pure.

II.7.2 Préparation des fluides étudiés

Etude de la concentration de Nile Red : Dans le but de déterminer la concentration optimale en fluorophore à utiliser dans notre étude, nous avons mesuré la fluorescence de solutions de Nile Red à différentes concentrations (Figure SII.2). Dans la gamme étudiée, nous n'avons pas observé de phénomène d'auto-quenching (désactivation du fluorophore à trop haute concentration) : nous avons donc décidé d'utiliser la plus forte concentration testée (400 µM) en vue d'obtenir le maximum de signal lors de l'enregistrement.

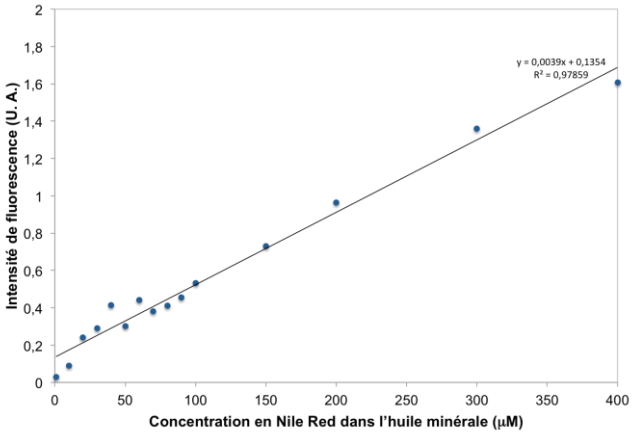


Figure SII.2. Intensité de fluorescence en fonction de la concentration en Nile Red dans l'huile.

Etude de la concentration en fluorescéine : La fluorescence émise par différentes solutions de fluorescéine à différentes concentrations a également été mesurée (Figure SII.3). Au vu de l'effet d'auto-désactivation du fluorophore au delà de 10 mM (« auto-quenching »), nous avons alors examiné plus précisément la zone de concentration qui semble linéaire, à savoir la gamme de 0 à 1 mM.

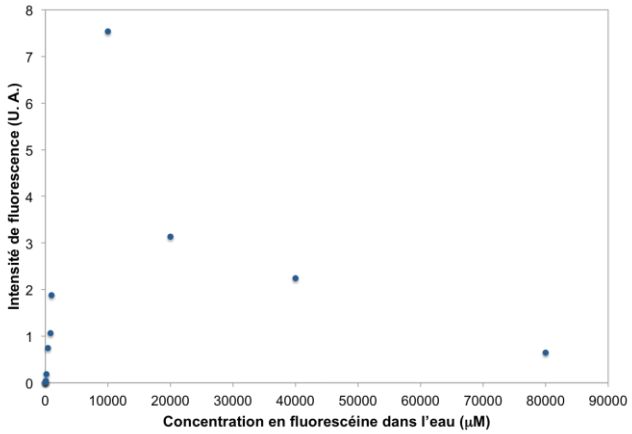


Figure SII.3. Intensité de fluorescence en fonction de la concentration en fluorescéine dans l'eau.

Pour notre part, nous avons opté pour une concentration en fluorescéine dans notre phase aqueuse de 800 µM, valeur appartenant à la partie linéaire de la courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration (Figure SII.4).

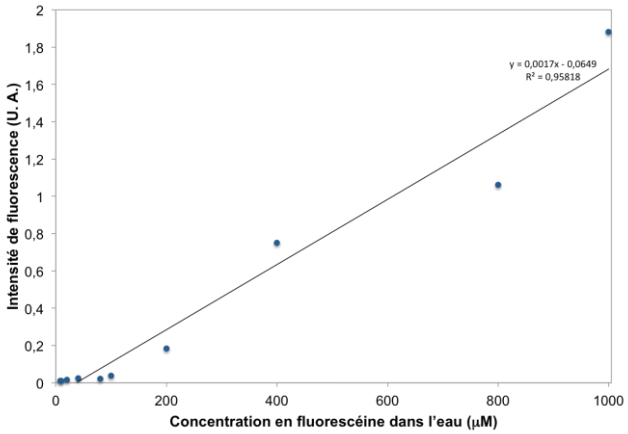


Figure SII.4. Intensité de fluorescence en fonction de la concentration en fluorescéine dans l'eau pour des faibles valeurs de cette dernière.

Préparation des suspensions de billes fluorescentes : Une suspension commerciale de billes de polystyrène de diamètre 10 µm dans de l'eau a été utilisée au cours de cette étude. Les billes présentes dans cette suspension ont été concentrées par centrifugation, et 5 µL d'entre elles ont été transférés dans 10 mL d'huile minérale. Cette nouvelle suspension a été placée dans un bain sonique pendant 60 min avant chaque expérience, puis injectée telle quelle directement dans le canal microfluidique.

Annexe 1 : Fabrication des systèmes microfluidiques

Il existe différentes manières de fabriquer des canaux microfluidiques. Nous avons au cours des études décrites ici utilisé la technique dite de « soft-lithography »,[123] ou lithographie molle, développée par l'équipe du Pr G. Whitesides dans les années 1990. Le canal est dans ce cas moulé dans une couche d'élastomère réticulé, le polydiméthylsiloxane (PDMS). Cette couche est ensuite collée sur un substrat, de verre en général, afin de refermer le canal. Cette technique est très répandue dans la communauté microfluidique : en effet, elle est facile à mettre en œuvre, et permet de concevoir et réaliser de nouveaux systèmes en moins de 24h à moindre coût.

A1.1. Fabrication du moule de silicone

Dans un premier temps, un masque de lithographie est conçu sur le logiciel CleWin4 et imprimé avec une résolution minimale de 3600 dpi, selon les dimensions critiques des motifs conçus. La fabrication du moule de silicone (autrement appelé « wafer ») est réalisée dans la salle blanche de l'ESPCI ParisTech. Une résine photosensible (SU8 20XX, MicroChem) est déposée de façon uniforme par centrifugation (« spin-coating ») sur un wafer de silicone, après quoi une étape de chauffage (de durée déterminée par le fabricant en fonction de la résine utilisée) permet de se débarrasser du solvant.

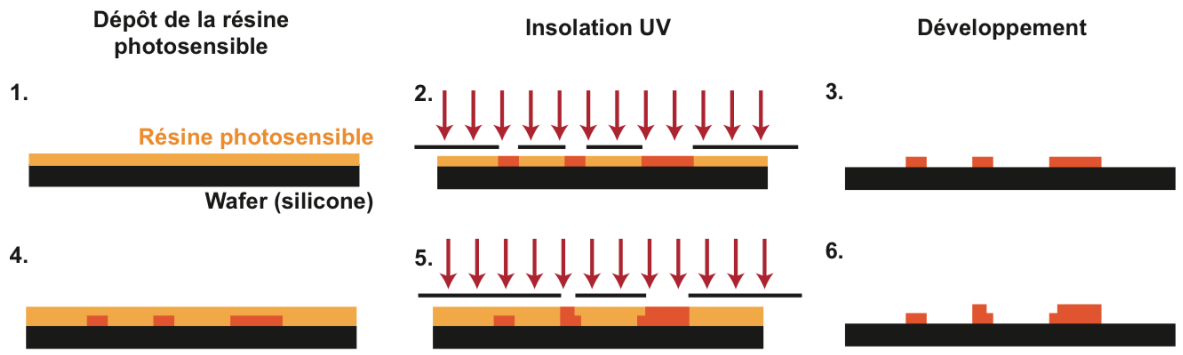


Figure A.1. Principe de fabrication du moule en silicone avec double couche. (1) et (4) dépôt d'une couche d'épaisseur donnée de résine photosensible ; (2) et (5) insolation à travers un masque et réticulation des parties insolées ; (3) et (6) développement des motifs obtenus.

[123] Xia, Y.; Whitesides, G. M. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153-184.

En ajustant la viscosité de la résine sélectionnée, et la vitesse de dépôt par centrifugation, il est possible d'obtenir une couche de résine d'épaisseur donnée. Les microstructures imprimées sur le masque de lithographie sont transférées à la résine photosensible *via* une exposition aux UV à 365 nm. Après exposition, la résine exposée est réticulée grâce à une seconde étape de cuisson, puis les zones non-exposées sont éliminées lors de l'étape de développement à l'aide d'un solvant approprié.

Les dimensions obtenues pour les microstructures en résine sont évaluées en utilisant un profilomètre mécanique (DektaK) ou optique (Vecco wyko NT9100).

L'obtention de moule de silicone multi-couches est basée sur la répétition des étapes décrites précédemment, combinée à un alignement des microstructures de l'étape *n+1* avec celles de l'étape *n*.

A1.2. Fabrication des puces

Les puces en PDMS sont obtenues à partir du moule en silicone en déposant sur ce dernier une couche d'un mélange liquide de monomères de PDMS (Sylgard ou RTV) et de réticulant (10% en masse), avant de placer l'ensemble à 70°C pendant plusieurs heures pour permettre la réticulation du polymère. Le PDMS ainsi solidifié est alors décollé du moule, et taillé aux dimensions adéquates. Les entrées et sorties des futurs canaux sont percés à travers l'épaisseur de polymère, puis ce dernier est assemblé par exposition à un plasma oxygène à une lame en verre afin de sceller les systèmes. Une telle oxydation plasma des surfaces à coller a deux conséquences : la première est que lorsque les surfaces oxydées sont mises en contact, des liaisons irréversibles sont formées entre le PDMS et le verre. Le plasma confère également un caractère hydrophile provisoire à la surface de PDMS, grâce aux liaisons Si-OH créée lors du processus.

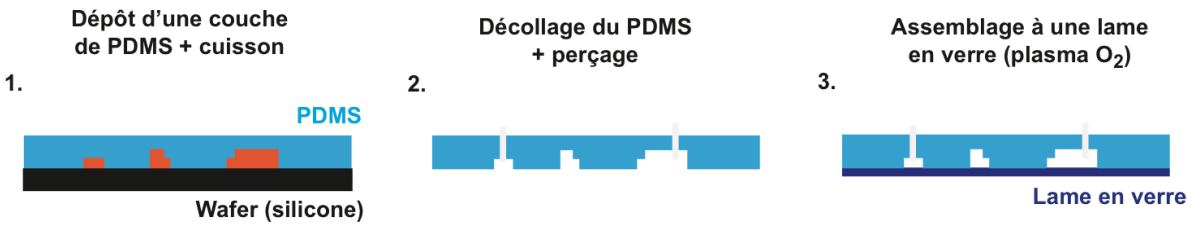


Figure A.2. Principe de fabrication des puces en PDMS. (1) dépôt d'une couche de PDMS + réticulant sur le moule en silicone préalablement préparé puis cuisson ; (2) décollage du timbre en PDMS souple et perçage ; (3) Assemblage par plasma à oxygène du PDMS sur une lame en verre.

Annexe 2 : Etalonnage du transducteur ultrasonore mono-élément et alignement avec le système optique

A2.1. Montage électronique et paramètres en jeu

Le montage électronique typique alimentant notre transducteur mono-élément est composé d'un générateur d'ondes arbitraires dont le signal est amplifié par un amplificateur radiofréquence avant d'être transmis au transducteur (Figure A.3).

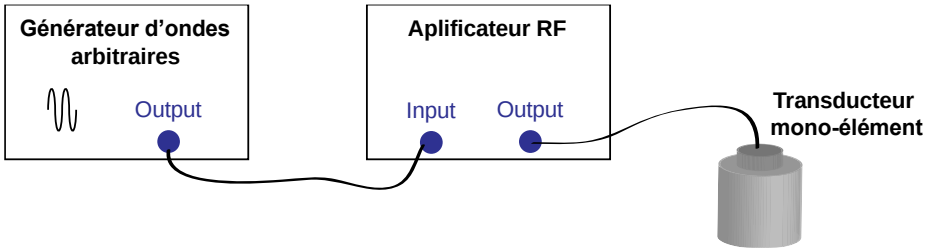


Figure A.3. Montage électronique alimentant le transducteur mono-élément.

Certains des paramètres associés aux pulses sinusoïdaux émis par le générateur d'ondes peuvent être modulés, tels que le nombre de cycles au sein de chaque pulse, l'intervalle entre deux pulses (dans le cas d'une émission continue), ou encore l'amplitude de l'onde émise.

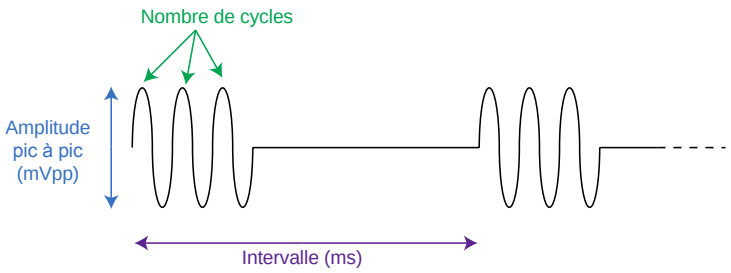


Figure A.4. Représentation schématique d'un pulse ultrasonore et des paramètres associés.

A2.2. Etude de la pression acoustique autour du point focal

Les valeurs de la pression acoustique induite par le transducteur sont mesurées par une méthode d'interférométrie autour du point focal afin d'évaluer la taille et la forme de la zone focale. Pour cette étude, le transducteur est directement relié au générateur d'ondes, sans amplification RF. Pour chaque position du transducteur, un pulse unique de 6 cycles et d'amplitude 10 mVpp à 2.25 MHz est émis, et le signal d'écho est enregistré et analysé. Le transducteur est déplacé mécaniquement afin de couvrir toute une gamme de positions autour du point focal préalablement déterminé (pas axial : 0.5 mm, pas latéral : 0.25 mm, pas en élévation : 0.25 mm). La valeur maximale de l'enveloppe du signal enregistré est calculée et attribuée à la position testée correspondante.

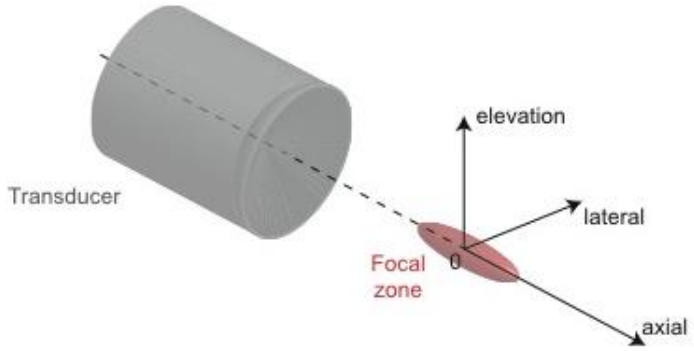


Figure A.5. Représentation schématique de l'axe du transducteur ultrasonore et de la zone focale.

Des sections de cette cartographie de l'espace autour du point focal peuvent être étudiée, comme notamment la section perpendiculaire à l'axe principal du transducteur (Figure A.6). Une telle représentation nous permet d'estimer la largeur de la tâche focale.

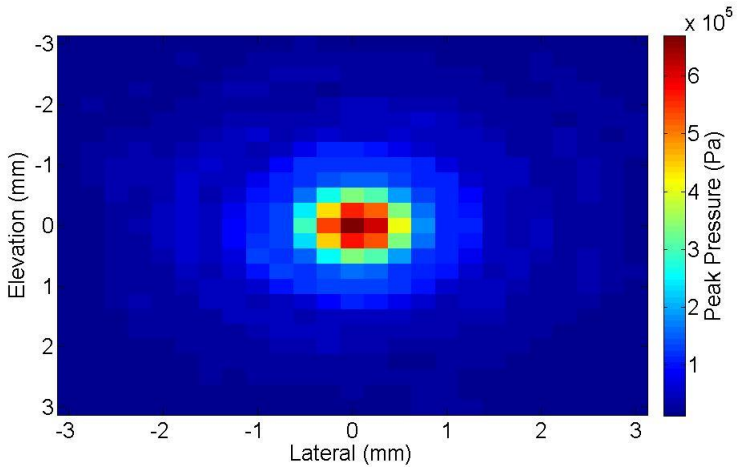


Figure A.6. Cartographie de la pression acoustique selon une coupe perpendiculaire à l'axe du transducteur.

Une autre section intéressante correspond à celle contenant l'axe du transducteur, autrement dit coupant perpendiculairement l'axe en élévation (Figure A.7) : une telle représentation met en évidence le fait que la zone focale de ce transducteur mono-élément n'est pas sphérique, mais plutôt allongée dans l'axe du transducteur.

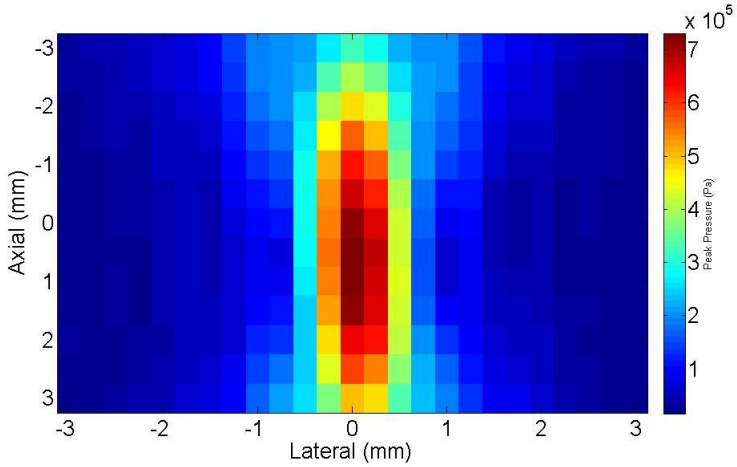


Figure A.7. Cartographie de la pression acoustique selon une coupe perpendiculaire à l'axe en élévation.

A2.3. Variations de la pression acoustique

Nous avons également pu étudier les variations de la valeur de l'énergie acoustique en fonction du nombre de cycles composant chaque pulse, de l'amplitude de ces derniers et de leur fréquence. Au cours de cette étude, le transducteur était alimenté par son système électronique complet, c'est à dire incluant l'amplificateur RF, afin d'enregistrer les valeurs réelles d'énergie acoustique émise.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'évolution de la pression acoustique en fonction du nombre de cycles par pulse (le nombre de cycles variant de 1 à 60). La fréquence et l'amplitude des pulses étaient alors maintenus constants, respectivement égaux à 2.25 MHz et 50 mV pic à pic. La Figure A.8 montre qu'au delà de 3 cycles par pulse, les pressions acoustiques positives et négatives demeurent constantes.

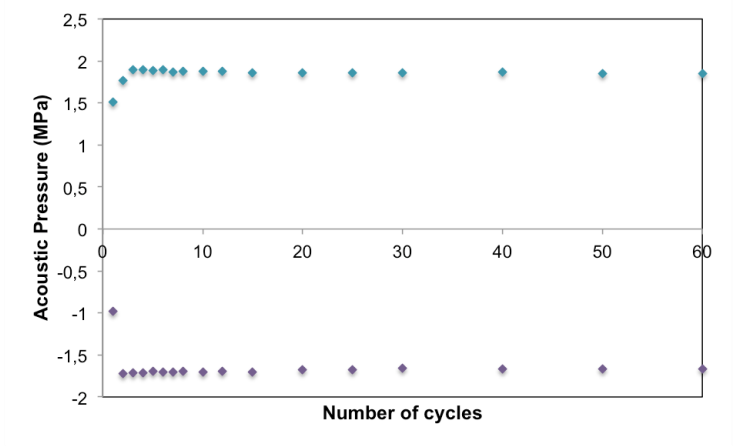


Figure A.8. Variations de la pression acoustique en fonction du nombre de cycles (f=2.25 MHz, A=50 mVpp).

Nous avons également été en mesure de suivre le comportement de la pression acoustique face aux variations de l'amplitude des pulses émis (de 20 mVpp à 500 mVpp). Le nombre de cycles était fixé à 6 et la fréquence fixée à 2.25 MHz respectivement lors de cette étude. La pression acoustique négative mais également positives sont toutes deux linéaires avec l'amplitude, mais il est cependant intéressant de souligner que le pulse devient de plus en plus asymétrique à mesure que l'amplitude augmente, en raison de l'augmentation des effets non-linéaires (Figure A.9).

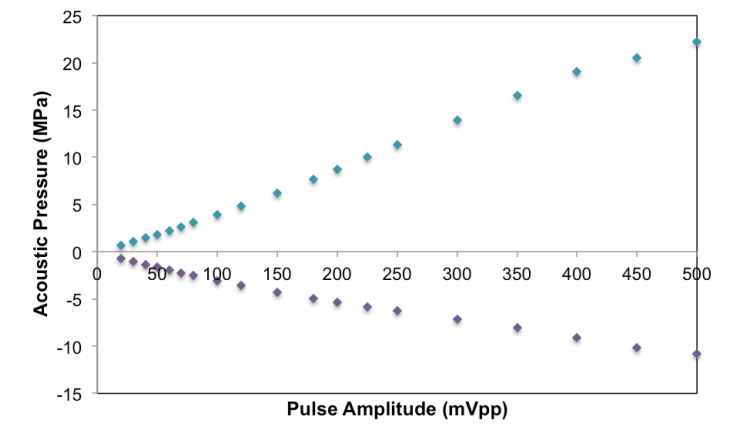


Figure A.9. Variations de la pression acoustique en fonction de l'amplitude du pulse émis (f=2.25 MHz, #Cycles=6).

Finalement, tout en maintenant l'amplitude et le nombre de cycles constants (à 50 mVpp et 6 cycles respectivement), nous avons pu étudier les conséquences de la variation de fréquence sur la pression acoustique. De manière surprenante, la plus haute valeur de pression acoustique obtenue correspond à une fréquence de 2.8 MHz, bien que la fréquence centrale du transducteur affichée par le constructeur soit de 2.25 MHz (Figure A.10).

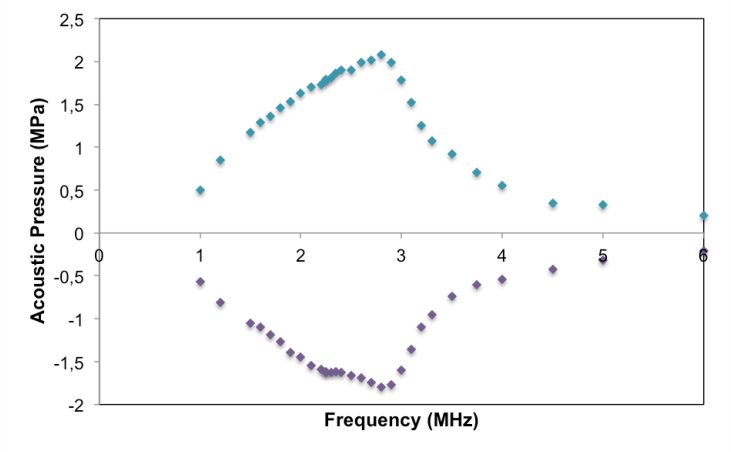


Figure A.10. Variations de la pression acoustique en fonction de la fréquence du pulse émis (#Cycles=6, A=50 mVpp).

A2.4. Alignement du transducteur avec l'axe optique d'un microscope

Au cours des études de chimie *in situ*, mais également de micro-mélange acoustique, il était crucial d'être capables d'aligner l'axe du transducteur avec l'axe optique du système d'imagerie utilisé (en général, microscope), et plus précisément de faire coïncider le point focal ultrasonore avec la zone du canal microfluidique étudiée, de manière à pouvoir observer l'effet des ultrasons sur notre système.

La Figure A.11 ci-dessous résume les étapes nécessaires pour aligner le transducteur avec l'axe optique. Dans un premier temps, on dépose une bille métallique (environ 1 mm de diamètre) à l'endroit où sera ensuite posé le système microfluidique. On aligne la caméra de façon à observer la bille au centre de la fenêtre d'observation (**Etape 1**).

Une fois cette opération réalisée, on ne touche plus ni à la bille, ni à la caméra : seul le transducteur sera déplacé grâce à un système de vis micrométriques dans les trois directions. Une série de pulses ultrasonores composés d'un cycle de 10 Vpp d'amplitude et à 2.25 MHz, répétés toutes les millisecondes sont émis par le transducteur. Il est alors possible d'observer à l'oscilloscope le pulse émis, ainsi que ses diverses réflexions (premier écho, deuxième écho, etc…) sur la surface du support (**Etape 2**).

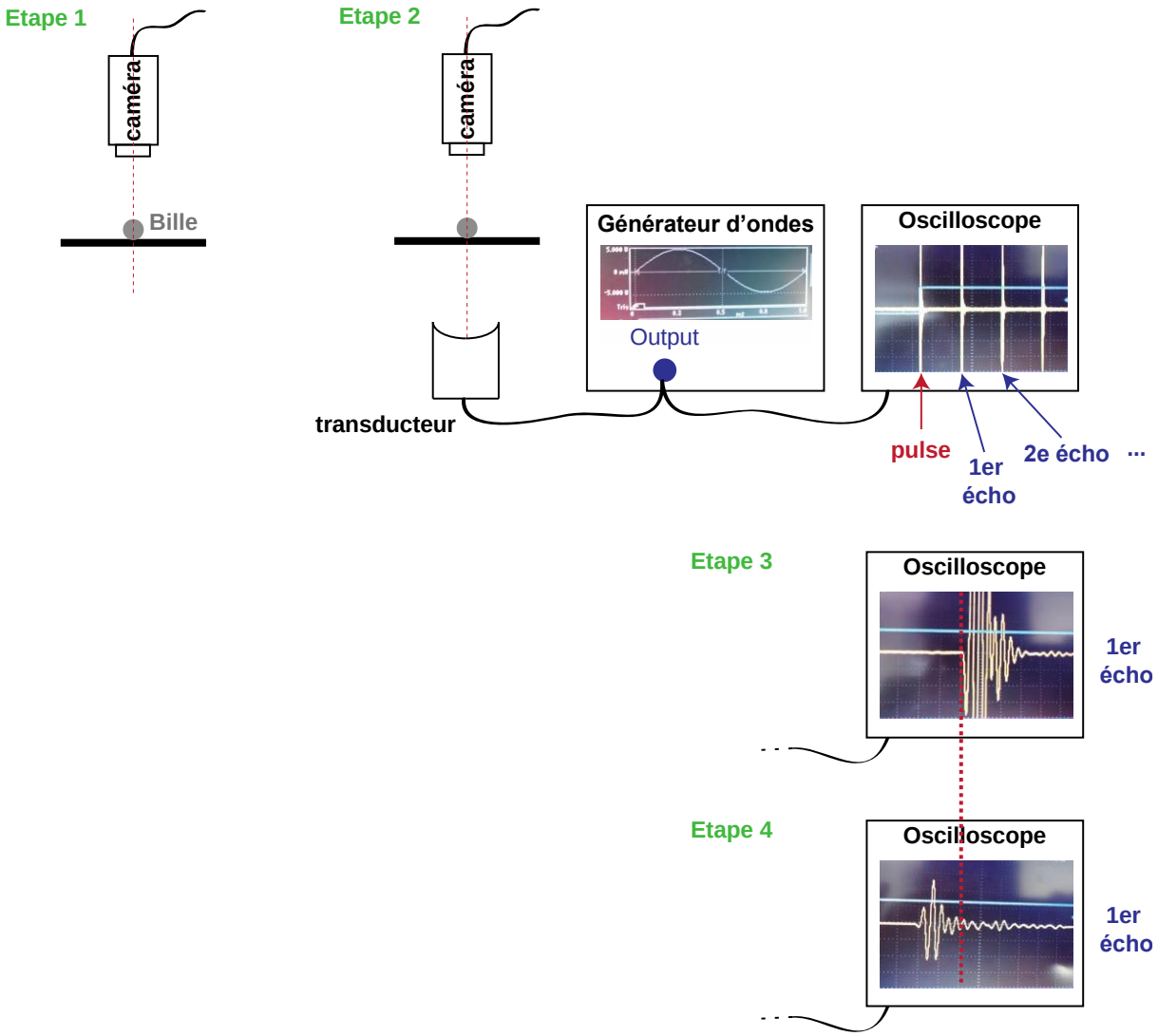


Figure A.11. Etapes de l'alignement du transducteur avec l'axe optique. **Etape 1** : Alignement de la caméra sur une bille métallique. **Etape 2** : tir périodique d'un pulse d'un cycle, observation à l'oscilloscope. **Etape 3** : on zoome sur le 1er écho. **Etape 4** : on déplace le transducteur jusqu'à voir apparaître le signal correspondant à la réflexion du signal sur la bille métallique devant le signal de réflexion sur le support. Le transducteur est alors aligné avec l'axe de la caméra.

On s'intéresse alors plus particulièrement au 1er écho, c'est à dire à la première réflexion (**Etape 3**). A l'aide de la vis micrométrique en élévation contrôlant la position du transducteur, on déplace alors ce dernier jusqu'à maximiser le signal obtenu : le transducteur est alors placé à la distance focale du support. On utilise alors les vis micrométriques latérales pour faire apparaître une autre réflexion devant celle du support : il s'agit de la bille métallique (**Etape 4**). Lorsqu'on a maximisé ce signal de la bille, le transducteur est alors aligné avec la bille, et à la distance focale de celle-ci. La bille étant elle même alignée avec l'axe optique, le transducteur est donc désormais également aligné avec ce dernier.

Annexe 3 : Publications

JACS
JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY
Communication
pubs.acs.org/JACS

High Spatiotemporal Control of Spontaneous Reactions Using Ultrasound-Triggered Composite Droplets

Marine Bezagu,[†] Claudia Errico,[‡] Victor Chaulot-Talmon,[§] Fabrice Monti,[§] Mickael Tanter,[‡] Patrick Tabeling,*[,§] Janine Cossy,*[,†] Stellios Arseniyadis,*[,†] and Olivier Couture[‡]

[†]Laboratoire de Chimie Organique, Institute of Chemistry, Biology and Innovation (CBI), – UMR 8231 – ESPCI ParisTech/CNRS/PSL* Research University, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

[‡]Institut Langevin, ESPCI ParisTech, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), Paris, France

[§]Laboratoire de Microfluidique, MEMS et Nanostructures, ESPCI ParisTech, CNRS (UMR Gulliver 7083), Paris, France

Supporting Information

ABSTRACT: Achieving high spatial and temporal control over a spontaneous reaction is a particularly challenging task with potential breakthroughs in various fields of research including surface patterning and drug delivery. We report here an exceptionally effective method that allows attaining such control. This method relies on a remotely triggered ultrasound-induced release of a reactant encapsulated in a composite microdroplet of liquid perfluorohexane. More specifically, the demonstration was achieved by locally applying a focused 2.25 MHz transducer onto a microfluidic channel in which were injected composite microdroplets containing a solution of an azidocoumarin and an external flow containing a reactive alkyne.

Recent years have witnessed a considerable increase of interest in the development of devices or methods capable of improving both spatial and temporal control in spontaneous chemical reactions. These two criteria are all the more important as they are necessary for a number of synthetic applications including surface patterning,[1] polymer synthesis, and polymer modification[2] or in any situation which requires a controlled sequence of events. This is particularly true for drug delivery, which could greatly benefit from the possibility of generating drugs *in situ via* a controlled chemical reaction.

One way to achieve high spatial and temporal control over a spontaneous reaction is to isolate and remotely trigger the release of the different reactive partners. Gracias and co-workers, for instance, recently reported a chemical encapsulation in metallic containers with a remotely guided chemical release using magnetic fields.[3] However, although they were able to achieve good spatial and temporal control of the release through shape, size, porosity, and magnetic characteristics of their containers, the low penetration depth of radio frequency energy and the need to introduce an electrode to promote the reaction impedes any clinical application.

Bowman and co-workers[4] recently contributed to the field of controlled chemical reactions by attaining high spatial and temporal control in the copper-catalyzed alkyne–azide click cycloaddition (CuAAC)[5] by photochemically reducing *in situ* a Cu(II) catalyst to the corresponding Cu(I) species using standard photolithography techniques. Unfortunately, the presence of the copper catalyst and the photoinitiator as well as the low penetration of coherent light through tissues (few hundred micrometers) hampers potential *in vivo* applications. In order to overcome the toxicity of both the copper catalyst and the photoinitiator and with the same goal of attaining high spatial and temporal control, Anseth and co-workers reported a particularly clever strategy involving sequential metal-free click reactions to build biologically functionalized gels and spatially tune their properties in the presence of cells.[6] Nonetheless, while they were able to overcome the presence of undesirable reactants, their photopatterning method implied the use of UV light which, as stated previously, impedes potential *in vivo* applications due to its low penetration.

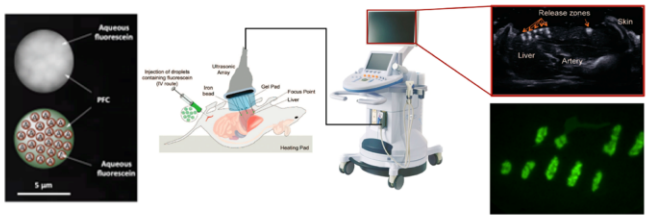


Figure 1. *In vivo* ultrasound-triggered release of composite microdroplets for tissue tattooing (previous work).[7]

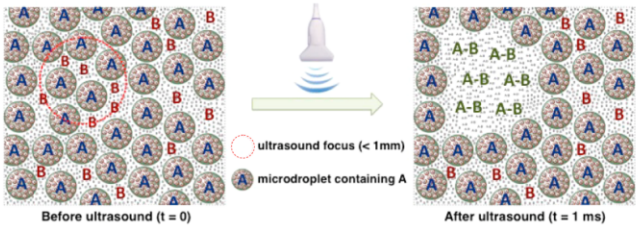


Figure 2. *In situ* ultrasound-triggered release of composite microdroplets for improved spatial and temporal control over a spontaneous reaction (this work).

In contrast to light-based techniques, ultrasound is non-invasive and can penetrate up to 10 cm deep into tissues while preserving a submillimetric resolution using standard scanners

Received: February 24, 2014

 © XXXX American Chemical Society dx.doi.org/10.1021/ja5019354 | J. Am. Chem. Soc. XXXX, XXX, XXX–XXX

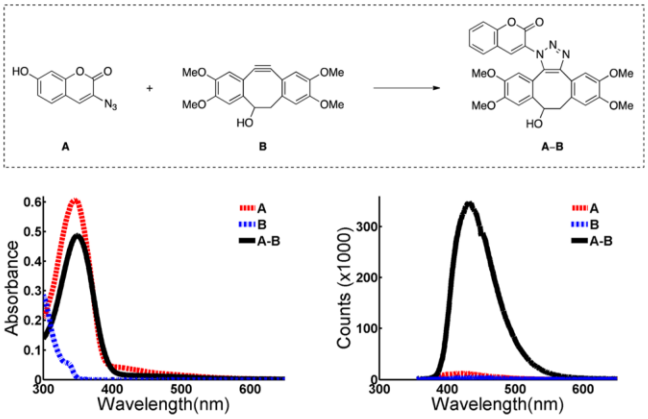


Figure 3. Copper-free click reaction between 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** and TMDIBO **B**, chosen as a model reaction. Absorption (left) and emission (right) spectra of compounds **A** (red), **B** (blue), and **A**−**B** (black). Both compounds show an absorption maximum at 350 nm and an emission maximum at 450 nm, but the reaction product **A**−**B** shows a higher emission intensity than the starting materials **A** and **B**.

which are ubiquitous in hospitals worldwide. Considering these elements, the spatiotemporal control of a spontaneous reaction using acoustic waves could be particularly appropriate for *in vivo* applications.

We previously established that perfluorocarbon (PFC) composite droplets loaded with a desired molecule (in our case fluorescein) could release their content locally in a known process of acoustic vaporization to achieve internal tattooing of tissues for surgical guidance in rats (Figure 1).[7] Various advantages arose from this technology. First, as mentioned previously, ultrasound benefit from their high spatial (millimeter) and temporal (microsecond) resolution as well as their penetration depth (up to 10 cm into tissues). Second, the low ultrasound release threshold of the droplets enables the use of standard clinical scanners with the same resolution as that for imaging (millimetric zone within a microsecond time scale) and with low acoustic pressures, which are both compatible with potential *in vivo* applications. Finally, the liquid perfluorocarbon matrix allows the inner phase to be efficiently isolated from the outer medium prior to the release.

The potential use of composite droplets as ultrasound-induced carriers of chemotherapeutic agents would be particularly appealing, as large doses of cytotoxic drugs could be delivered specifically at the focus of the ultrasound scanner. Unfortunately, even if this approach increases the spatial specificity of the release, the question of unspecific release remains as for all drug-delivery methods reported so far. One way to circumvent this issue, and thus limit any undesired side effects which could occur downstream, would be to generate or annihilate the drug specifically in a zone of interest. In order to attain this goal, we first needed to prove that a biologically relevant reaction could be promoted with a high level of spatial and temporal control after ultrasound release of the composite microdroplet carriers (Figure 2). We present here the results of our endeavor.

In order to demonstrate that we were able to remotely trigger a specific reaction with high spatial and temporal control, we first needed to select a specific spontaneous reaction. The bioorthogonal copper-free click between an azide and a strained alkyne such as cyclooctyne derivatives to form the corresponding triazole appeared to be ideal for this study. Indeed, it has a

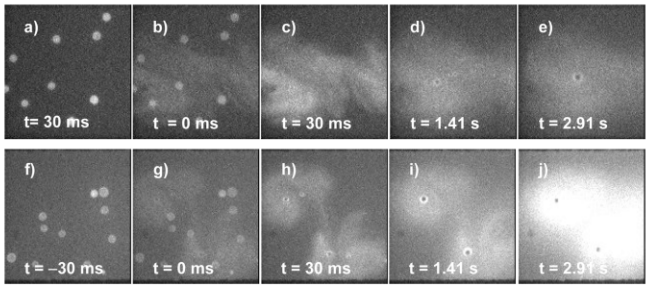


Figure 4. Droplets loaded with 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** in a flow of DMSO (a to e) or DMSO + TMDIBO **B** (f to j). Sequences of images taken at 34 Hz, with ultrasonic pulse occurring at images b and g, respectively. The width of each image is 100 μm.

relatively high reaction rate at low reagent concentration, it is compatible with biological environments (physiological pH, temperature and pressure), and it is inert to abundant biological nucleophiles, electrophiles and redox-active metabolites. As a matter of fact, this strain-promoted azide−alkyne cycloaddition has been extensively applied in many fields including drug discovery,[8] material science,[9] and bioconjugation[10] to probe biomolecules in living systems or to label cells.[11]

We decided to initiate our study using coumarin derivative **A** and the strained-alkyne tetramethoxydibenzocyclooctyne (TMDIBO, **B**) recently developed by Leeper et al. (Figure 3).[12] Indeed, 3-azidocoumarin **A** had previously been proven to be a good fluorogenic compound and could therefore be used to monitor the reaction,[13] while TMDIBO (**B**) appeared to be a good candidate as a strained alkyne due to its relatively direct synthetic access and its inherent stability. Most importantly, the product (**A**−**B**) resulting from the cycloaddition demonstrates a stronger fluorescence than either starting materials (λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 430 nm). Spatiotemporal control of the reaction was achieved by encapsulating a DMSO solution of **A** (3.0% w/v) into composite microdroplets of perfluorohexane following the procedure previously reported.[7] TMDIBO **B** on the other hand was dissolved in the external flow of DMSO (0.3% w/v). They were both mixed together prior to the injection in a microfluidic channel with a width of 100 μm and a depth of 40 μm.[14] A 2.25 MHz transducer was focused (focus = 38 mm, f/d = 1) within the channel (Figure 4). Single bursts of 30 cycles were generated at 2.25 MHz by an arbitrary waveform generator and amplified to 12.3 MPa peak-negative pressure by a radio frequency amplifier.

Prior to and after the ultrasonic pulse transmission, a camera (34 fps) mounted on a fluorescent microscope (Leica, 20× or 10×, DAPI filter) recorded the fluorescence induced during the reaction. Within the microfluidic channel, this single acoustic pulse was able to vaporize several droplets (8 μm in diameter), leading to the release of their content in the surrounding medium. As shown in Figures 4 and 5, a significant difference of fluorescence between the control experiment (only one reactant encapsulated in a flow of pure solvent) and the reaction experiment (one reactant encapsulated in a flow of the other) demonstrated the subsequent formation of the product upon ultrasound release. Indeed, the average intensity in the observation window increased drastically as the released cloud spread by diffusion and the click reaction occurred. At 34 fps, the ultrasound disruption of the droplets appeared instantaneous since the pulse duration was 13 μs. After 5 s, the fluorescence intensity reached a plateau whereas the fluorescence intensity of the control experiment remained

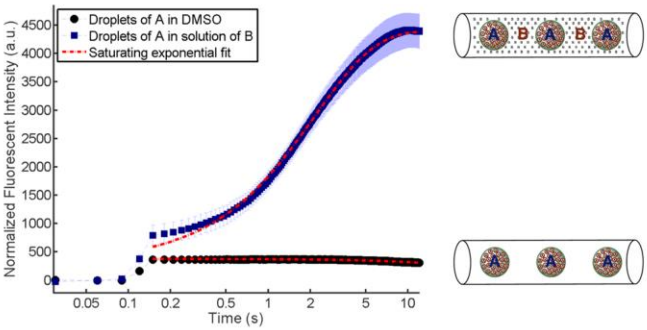


Figure 5. Fluorescence increase after the ultrasound release at t = 100 ms. Comparison between control experiment (droplets of 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** in DMSO, black curve) and reaction (droplets of 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** in a solution of TMDIBO **B** in DMSO, 0.3% w/v, blue curve). The reaction rate is well described by a saturating exponential fit with a time constant of 2.2 s (R^2 = 0.99).

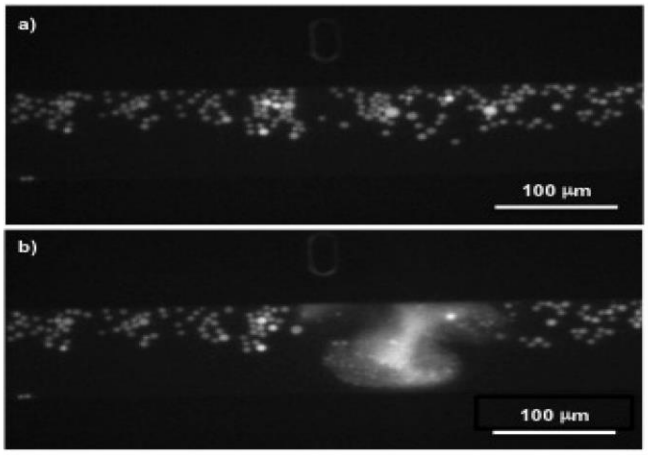


Figure 6. Microfluidic channel containing droplets of 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** in a flow of TMDIBO **B** in DMSO before (a) and after (b) ultrasonic pulse.

stable after a slight increase upon release due to a decrease in the autoquenching phenomenon. Moreover, the intensity of the control experiment remained 10 times lower than the value of the plateau reached by the reaction's fluorescence.

As shown in Figure 6, the reaction remained spatially localized. The average diameter of the releasing cloud is in the same order of magnitude as the size of the focal spot, which is 600 μm (full-width at half-maximum). All droplets within that zone were disrupted, while those outside the focal spot remained undisturbed.

In contrast to the previous setup using a single-focus transducer, an ultrasonic scanner equipped with a multielement transducer can focus over several spots within a plane by using electronic delays. To further demonstrate the high level of spatial control as well as the reproducibility, droplets were injected within a cell-culture plate placed under a 4 MHz, 196-element probe (Vermon, France) connected to a clinical ultrasound scanner (Aixplorer, Supersonic Imagine, France).[15] By scanning remotely the focus zone of the ultrasound clinical system, several spots of release could be generated over each line, initiating the chemical reaction in specific zones of the plate. Thus, a 3 cm high representation of a landmark of Paris could be created point-by-point within 6 s (Figure 7).

In conclusion, a copper-free click reaction was remotely induced with ultrasound by releasing an encapsulated reactant

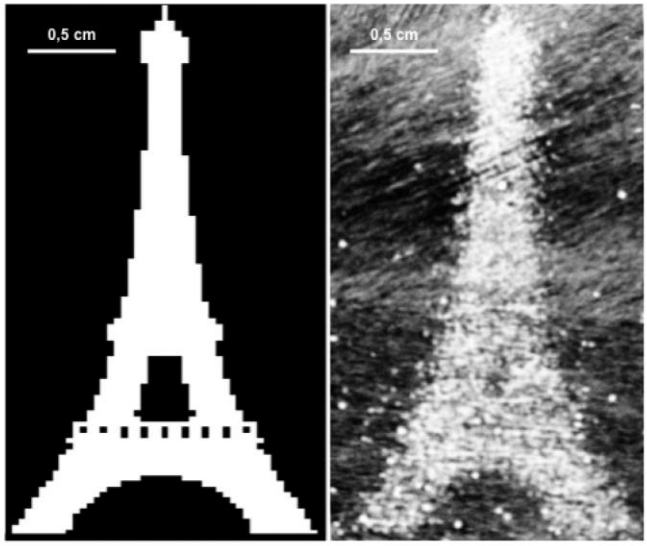


Figure 7. Drawing generated by focusing pulses according to the pattern with an ultrasound scanner within a plate filled with droplets of 3-azido-7-hydroxycoumarin **A** in a medium of TMDIBO **B** (0.15% w/v) in DMSO. Photography made under UV light (histogram equalized) a few seconds after the end of the release.

locally into a flow containing a reactive partner. This reaction was triggered by a single ultrasound pulse specifically within the focus of the transducer (0.6 mm in width) and within a time of less than 3 ms. Since these acoustic pulses could be generated by a clinical ultrasonic scanner, the generation of a chemical reaction deep into the tissue can be envisioned. Considering that a wide range of compounds can be encapsulated using this technology, we expect that such targeted chemistry will lead to the localized release of prodrugs or the localized production of drugs *in vivo* that are either too toxic or too unstable to be injected directly in patients.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental procedures and spectral data are provided. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

patrick.tabeling@espci.fr
janine.cossy@espci.fr
stellios.arseniyadis@espci.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by LABEX WIFI (Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24) within the French Program "Investments for the Future" under reference ANR-10- IDEX-0001-02 PSL*. M.B. and C.E. would like to thank the Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique and the Fondation Pierre-Gilles de Gennes respectively for financial support.

■ REFERENCES

(1) (a) Arnold, R. M.; Locklin, J. *Langmuir* **2013**, *29*, 5920−5926. (b) Pauloehrl, T.; Delaittre, G.; Winkler, V.; Welle, A.; Bruns, M.;

Börner, H. G.; Greiner, A. M.; Bastmeyer, M.; Berner-Kowollik, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071−1074.

(2) Chatani, S.; Sheridan, R. J.; Podgorski, M.; Nair, D. P.; Bowman, C. N. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 3897−3901.

(3) (a) Leong, T.; Gu, Z.; Koh, T.; Gracias, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11336−11337. (b) Ye, H.; Randall, C. L.; Leong, T. G.; Slanac, D. A.; Call, E. K.; Gracias, D. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4991−4994.

(4) Adzima, B. J.; Tao, Y.; Kloxin, C. J.; DeForest, C. A.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 256−259.

(5) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004−2021.

(6) DeForest, C. A.; Polizzotti, B. D.; Anseth, K. S. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 659−664.

(7) Fluorescein was encapsulated and locally released to achieve internal tattooing of tissues for surgical guidance in rats; see: (a) Couture, O.; Pannacci, N.; Babataheri, A.; Servois, V.; Tabeling, P.; Tanter, M. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 1116−1123. (b) Couture, O.; Dransart, E.; Dehay, S.; Nemati, F.; Decaudin, D.; Johannes, L.; Tanter, M. *Mol. Imaging* **2011**, *10*, 135−143. For other examples of localized delivery, see: (c) Fabiilli, M. L.; Haworth, K. J.; Sebastian, I. E.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Ultrasound in Med. & Biol.* **2010**, *36*, 1364−1375. (d) Fabiilli, M. L.; Lee, J. A.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2753−2765.

(8) (a) Srinivasan, R.; Li, J.; Ng, S. L.; Kalesh, K. A.; Yao, S. Q. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2655−2664. (b) Evans, M. J.; Saghatelian, A.; Sorensen, E. J.; Cravatt, B. F. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1303−1307.

(9) (a) Franc, G.; Kakkar, A. *Chem. Commun.* **2008**, 5267−5276. (b) Malkoch, M.; Vestberg, R.; Gupta, N.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Mason, A. F.; Hedrick, J. L.; Liao, Q.; Frank, C. W.; Kingsbury, K.; Hawker, C. J. *Chem. Commun.* **2006**, 2774−2776. (c) Polizzotti, B. D.; Fairbanks, B. D.; Anseth, K. S. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1084−1087.

(10) (a) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249−1262. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057−3064. (c) Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4479−4482.

(11) (a) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *9*, 666−676. (b) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688−3690. (c) Kuzmin, A.; Poloukhtine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076−2085. (d) Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799−11805. (e) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422−9425. (f) Poloukhtine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769−15776. (g) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253−2255. (h) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486−11493. (i) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 16793−16797. (j) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046−15047.

(12) Stockmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932−936.

(13) (a) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A. *Org. Lett.* **2004**, *24*, 4603−4606. (b) Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862−8863.

(14) **Ultrasound-triggered release of composite droplets in a microfluidic channel.** Composite droplets of **A** were suspended by magnetic stirring in a DMSO solution of **B** (0.3% w/v) and injected in the microfluidic channel using a pressure controller (Fluigent, MFCS-100). The microfluidic channel was 100 μm in width and 40 μm in depth. It was placed at the focus of a 2.25 MHz single-element transducer, which was immersed in a water bath. A single pulse of 30 cycles was emitted, which triggered a camera (Andor iXon, 34 Hz) mounted on a fluorescent microscope (Leica, 10× or 20×, DAPI) that recorded the fluorescence induced during the reaction.

(15) **Ultrasound-triggered release of composite droplets in a cell-culture plate.** The composite droplets of **A** were diluted in a DMSO solution of **B** (0.15% w/v, degassed prior to injection) and injected in an OptiCell plate made of two plastic membranes, transparent to both ultrasound and light, separated by 2 mm. The bottom membrane was placed at the focus of a 5 MHz ultrasound probe which was immersed in a water bath maintained at 12 °C. The ultrasonic probe was driven by a clinical ultrasound scanner (Aixplorer, Supersonic Imagine, France), emitting a single pulse of 2 cycles on each spot of the release, where the distance between the several spots of the release is equal to the pitch number of the transducer (0.3 mm). Release spots could be selected anywhere on the plate using a software interface. The chemical cloud was excited with a UV light, while the observation of the Eiffel tower was performed through a UV filter.

Published on 06 March 2015. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 26/03/2015 07:47:44.

Lab on a Chip

PAPER

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c5lc00247h

A fast and switchable microfluidic mixer based on ultrasound-induced vaporization of perfluorocarbon†

Marine Bezagu,[ac] Stellios Arseniyadis,*[a] Janine Cossy,*[a] Olivier Couture,[b] Mickael Tanter,[b] Fabrice Monti[c] and Patrick Tabeling*[c]

Received 3rd March 2015,
Accepted 6th March 2015

DOI: 10.1039/c5lc00247h

www.rsc.org/loc

Mixing two fluids together within a microfluidic device still remains a challenging operation today. In order to achieve this goal, a number of effective micromixers have been developed over the years based on the use of either passive or active systems. Typically, passive mixers require no external energy, are more robust, and are easy to manufacture albeit they are poorly flexible. Active mixers, on the other hand, rely on external disturbance and are thus more difficult to use but are proven to have greater efficacy. Here, we report a particularly effective, remotely induced and switchable microfluidic mixer, which relies on the concomitant use of ultrasound and a perfluorocarbon (PFC) phase, with the latter benefiting from its immiscibility with most fluids and its low boiling point. More specifically, our approach is based on localized vaporization of a PFC phase at the focal zone of a transducer leading to efficient mixing of two adjacent fluids. The results show that mixing occurs ~100 ms following the delivery of the acoustic pulse, while a laminar flow is re-established on roughly the same time scale. Overall, this method is simple and effective, does not require tailored channel geometries, is compatible with both hydrophilic and hydrophobic microfluidic systems, and is applicable to a wide range of Reynolds numbers ($10^{-4} < Re < 2.10^{0}$), and the PFC phase can be easily separated from the mixed phase at the end of the run.

Microfluidics has attracted tremendous attention over the past two decades becoming a particularly exciting field of research with broad applications in various areas including biology, biotechnology, chemical synthesis and optics.[1] This success is mainly due to the fact that microfluidic systems rely on short analysis time, low reagent or biological sample consumption, and cheap microfabrication techniques, and most of all, they are generally simple to operate and they benefit from the possibility that different steps of analysis or synthesis on the same chip may be integrated, which is why these systems are often designated as "labs on chips".[2]

Although mixing two liquids together is a key operation in microfluidic devices, it remains challenging due to the laminar character of the flow. Indeed, microfluidic channels have typical dimensions and flow rates that lead to low Reynolds numbers ($Re \ll 10$). Under these conditions, as viscous forces dominate over inertia, mixing is mainly governed by diffusion which translates into slow mixing. This limitation has spurred researchers to develop mixers that can overcome this drawback.[3] These mixers can be classified as active or passive. Hence, passive mixers[4] rely on techniques such as splitting and recombining fluids,[5] multi-lamination or chaotic strategies,[6] such as the herringbone mixer,[7] to increase channel length and tortuosity, fluid contact time and diffusion. They are easy to integrate in a chip as they require no external forces, but they generally impose longer mixing length and time. Active mixers,[8] on the other hand, require external stimuli to induce the mixing effect which often leads to complex manufacturing processes, increased fragility and reduced portability. Nonetheless, such systems, which involve magnetic-,[9] thermal-,[10] optical-[11] and acoustic-based[12,13] stimulations, were proven to be more effective. They benefit from their non-invasive character as well as their remote activation. In this context, Baigl and co-workers[14] recently reported the use of a three-phase system, where the central phase could be affected by an external light stimulus to induce mixing. In line with this remotely induced mixing approach, we designed a new, extremely effective, switchable and non-geometry dependent ultrasound-triggered mixer

[a] Laboratoire de Chimie Organique, Institute of Chemistry, Biology and Innovation (CBI) – ESPCI ParisTech/CNRS (UMR8231)/PSL* Research University, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France. E-mail: stellios.arseniyadis@espci.fr, janine.cossy@espci.fr

[b] Institut Langevin, ESPCI ParisTech, CNRS (UMR 7587), INSERM (U979), 1 rue Jussieu, 75005 Paris, France

[c] Laboratoire de Microfluidique, MEMS et Nanostructures, ESPCI ParisTech, CNRS (UMR Gulliver 7083), 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France. E-mail: patrick.tabeling@espci.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5lc00247h

Published on 06 March 2015. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 26/03/2015 07:47:44.

based on localized vaporization of a PFC phase at the focal zone of a transducer (Fig. 1).[15] We report here the results of our endeavour.

To allow efficient ultrasound-triggered mixing within a microfluidic device, we imagined a three-layer co-flow composed of two external oil or water phases and a central perfluorocarbon (PFC) phase that prevents mixing to occur in the absence of any ultrasound owing to both its hydro- and lipophobic properties. Indeed, we believe that 1) the PFC layer would be briefly vaporized when submitted to ultrasound stimulation within the focal zone (~600 μm) of the ultrasound transducer, 2) this vaporization phenomenon would induce brief emulsification of the PFC together with the oil or water external phases leading to mixing, 3) spontaneous demixing of the fluids would occur after crossing the focal zone thus allowing separation of the mixed oil or water phase from the perfluorinated phase and 4) our method would require no specific geometry and allow switchable mixing of the external phases provided that the ultrasound source could be alternatively turned on and off.

Three cases were studied in order to demonstrate the power of our microfluidic mixing method which was initially conceived for both hydrophobic and hydrophilic microfluidic systems. Each case involved a central perfluorocarbon (PFC) phase composed of a 1 : 1 mixture of perfluoropentane and perfluorohexane running between two external phases. Methods A and B involved two external oil phases, one of which was stained with a fluorescent dye (Nile Red, 600 μM) and the other a suspension of fluorescent beads (10 μm in diameter), respectively, while method C involved two external water phases, one of which was stained with fluorescein (800 μM).

To quantify the quality of ultrasound-induced mixing along the channel, two regions (green and red boxes) of equal size were defined at the top and bottom parts of the channel and the average fluorescence of these regions was recorded over the sequence of images. As expected, in the absence of ultrasound pulses, the two external phases remained well separated by the immiscible central PFC layer and the average fluorescence of both regions remained unchanged independently of the case studied (Fig. 2 and S9 in the ESI†). Upon ultrasound excitation, however, we observed a highly emulsified region at the focal zone of the transducer, while downstream, the mixed water or oil phase and the PFC demixed progressively, with the PFC remaining in the middle of the channel due to wetting properties. Most importantly, the fluorescence downstream of the focal zone was equally distributed thus confirming ultrasound-induced mixing.

To evaluate the efficacy of the mixing method, we used a mixing indicator which was calculated using the equation shown in Fig. 2,[16] where a mixing index (MI) equal to 1 represents a non-mixing situation while an MI equal to 0 reflects perfect mixing. Hence, in the absence of ultrasound excitation, a MI close to 1 was observed independently of the method used, thus showcasing the lack of mixing. In contrast, after ultrasound irradiation, excellent mixing was observed in both hydrophilic and hydrophobic systems.

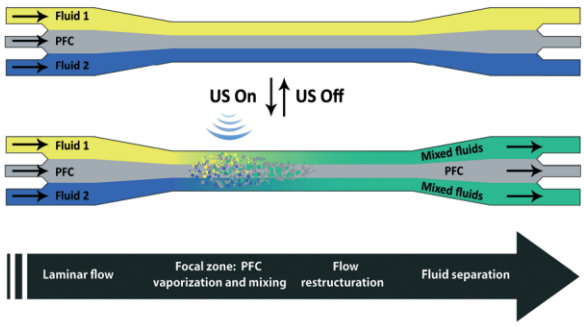


Fig. 1 Ultrasound-induced vaporization of a perfluorocarbon phase for efficient mixing in microfluidic channels.

Indeed, we were able to show that the MI remained unaffected over four decades of Reynolds numbers ($10^{-4} < \mathrm{Re} < 2.10^{0}$) with values ranging from 0.03 to 0.07 (Fig. 2c). Analysis of the results obtained using the fluorescent beads dispersed in oil also confirmed the excellent mixing of the two fluids as the beads were equally distributed on both sides of the channel downstream of the focal zone (method B, Fig. 3). Once again, the splitting of the beads occurred in a similar fashion for all the Reynolds numbers tested (Fig. S10 in the ESI†). Most importantly, the efficiency of mixing compared favourably with all the methods reported so far in the literature.[7b] In particular, to the best of our knowledge, no other micromixer allows one to reach a range of Reynolds numbers that covers four orders of magnitude[17] and, more importantly, that embraces both low and moderate values, *i.e.* compatible with viscous and moderately inertial regimes. We believe that this will have interesting consequences in chemical engineering, where micromixers are often required to operate on a range of different flow regimes.

As the perfluorinated central phase only vaporizes at the focal zone of the ultrasound transducer, the mixing event can be activated on demand by simply turning the latter on or off as illustrated in Fig. 4, which shows a sequence of mixing and non-mixing situations. Hence, as long as ultrasound was applied to the system, mixing appeared optimal and stable in time (Fig. 4a). As soon as the transducer was switched off, a short transient regime was observed (Fig. 4b), while the three incoming laminar flows replaced the mixed fluids in the channel (Fig. 4c) to reach a maximal MI corresponding to two perfectly well separated external fluids (Fig. 4d). When the ultrasound was switched back on (Fig. 4e), another short transient regime occurred until a stable mixing regime was attained again (Fig. 4g). The transition between two series of mixing and non-mixing events appeared highly reproducible in both efficacy and time; the MI decreased instantaneously as soon as the transducer was switched on. In addition, both transitions (mixing to non-mixing and *vice versa*) occurred within a second at a flow rate of 9.6 μL min^{-1}, while these transitions occurred at a significantly higher speed (115 ms and 92 ms) when the flow rates were 18 μL min^{-1} and 25 μL min^{-1}, respectively. This observation tends to show that we are able to adjust the transition time between mixing and non-mixing regimes by simply tuning the injection flow rate.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 06 March 2015. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 26/03/2015 07:47:44.

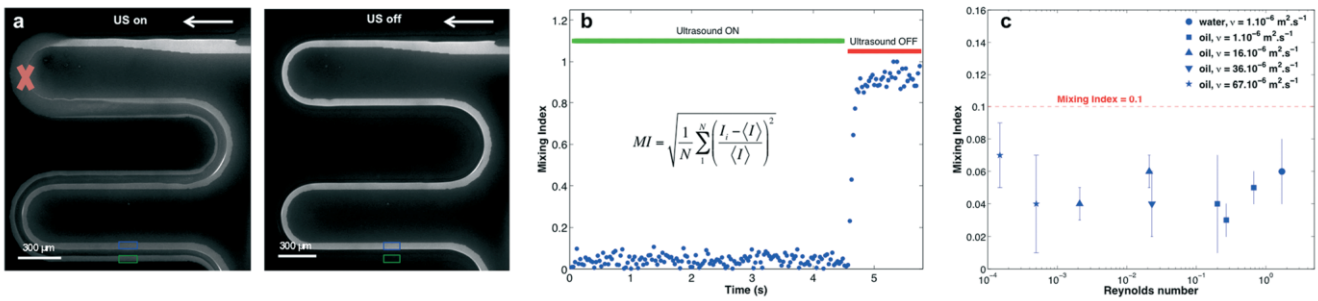


Fig. 2 (a) Representative fluorescence microscopy images corresponding to mixing following method A (with or without ultrasound activation). Ultrasound focus is represented by the red cross. (b) Corresponding mixing index evolution (Q_{tot} = 25 µL min^{-1}, ν_{oil} = 36.10^{-6} m^2 s^{-1}, Re = 0.023). (c) Mixing index as a function of the Reynolds number.

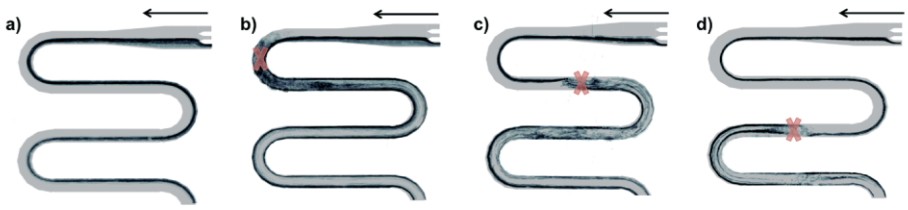


Fig. 3 Mixing of two oil phases according to method B (beads in oil). Ultrasound was focalized in the upper left corner (b), focalized in the central positions (c and d) or turned off (a). $Q_{pure\ oil}$ = $Q_{oil+beads}$ = 0.8 µL min^{-1}, Q_{PFC} = 8 µL min^{-1}.

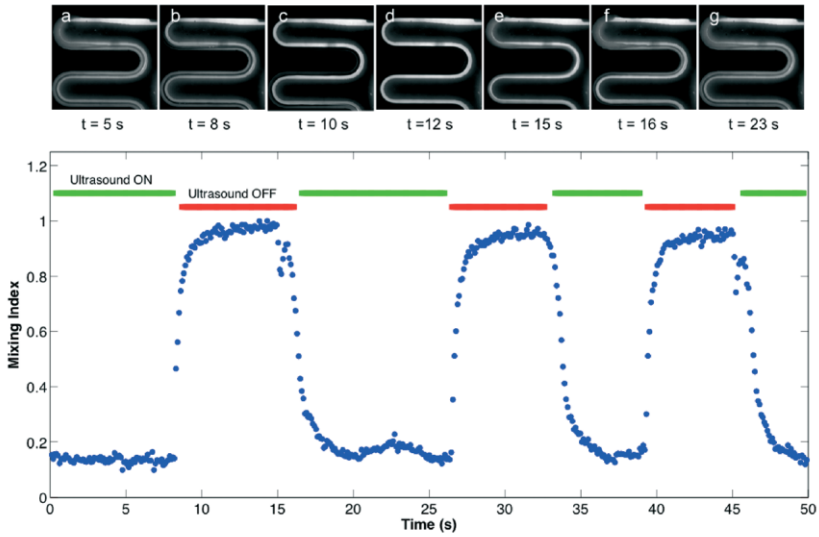


Fig. 4 Reversible mixing of two oil phases (method A, Q_{tot} = 9.6 µL min^{-1}). Representative fluorescence microscopy images corresponding to different steps in the sequence of ultrasound excitation of the system. Corresponding mixing index values as a function of time, calculated from the same two regions (green and red).

Another estimation of the mixing time was achieved by measuring the channel length necessary to affect the laminarity of the co-injected fluids. Indeed, when reaching the focal spot of the transducer, fluids enter a transition zone where the trajectories of the beads statistically cover the entire width of the channel downstream to which the flows separate and the beads are equally split. Considering the distance measured to switch from a laminar to a non-laminar situation, we estimated the time to be around 1.2 ± 0.5 ms, with the latter being independent of the flow rate (see the ESI† for details).

To showcase the simplicity of the method, we deliberately designed a microfluidic device made of a simple serpentine based on a straight, rectangle-sectioned channel which also allowed visualization of the fluids on a long distance (few millimeters) while using the same observation window. The aspect ratio of the channel was chosen to be low to prevent a droplet regime and thus favour a laminar circulation. This was made possible as in contrast to other mixing methods our mixer appeared to require no specific geometry. In addition, we were also able to show that mixing could be induced at various positions of this same serpentine in a reproducible

Published on 06 March 2015. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 26/03/2015 07:47:44.

and effective fashion and with excellent precision. Indeed, as shown in Fig. 3, the trajectories of the beads remained undisturbed in the laminar flow until they reached the focal zone where they split upon local ultrasound stimulation.

Another important feature that was studied concerned the loss of efficacy, which was usually observed with most available mixers, especially passive mixers, when the flow rate was increased. Interestingly, this did not appear to be the case with our mixer. Indeed, we were able to show that the transition between a mixing and a non-mixing situation remained unaffected upon increasing the flow rate with concomitantly no noticeable impact on the efficacy of mixing (see Fig. S10 in the ESI†). Thus, splitting of the beads on both sides of the channel occurred in a similar fashion at flow rates ranging from 9.6 μL min^{-1} to 48 μL min^{-1} which corresponds to Reynolds numbers ranging from 0.0074 to 0.037.

While PFC was specifically chosen for its vaporization properties upon ultrasound stimulation, it was also chosen for its immiscibility with most fluids, its high density (the densities of perfluoropentane and perfluorohexane used here are 1.63 g mL^{-1} and 1.67 g mL^{-1}, respectively, at 25 °C), and its wettability in the perspective of incorporating this mixer in a more complex series of operations on a microfluidic chip where the PFC could be separated from the mixed fluids at the end of the run. In order to attain this goal, we designed and built a separation unit that is a replica of the entrance unit except that the size of the channels was modified to allow the central PFC phase to be removed. As the major requirement was that the PFC should not contaminate the collected mixed fluids, the width of the central exit channel was chosen to be bigger (100 μm) than the ones of the two side exit channels (40 μm). As shown in Fig. 5, we were able to demonstrate that the PFC could be easily separated from the mixed fluids.

The use of perfluorinated solvents to induce mixing in microfluidic channels is a new concept. In order to further understand the mechanisms that lie behind the emulsification of the PFC, a series of experiments were carried out by changing the ultrasound parameters such as the amplitude of the pulses, the number of cycles within each pulse and the interval between two pulses. The peak-negative acoustic pressure (in MPa) and the total intensity of the focused wave

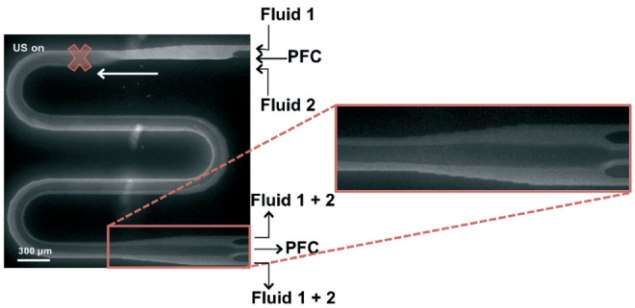


Fig. 5 Microscopy image of perfluorocarbon extraction from the system (method A, Nile Red in oil). The focal zone is represented by the red cross, and flow direction is represented by the white arrow.

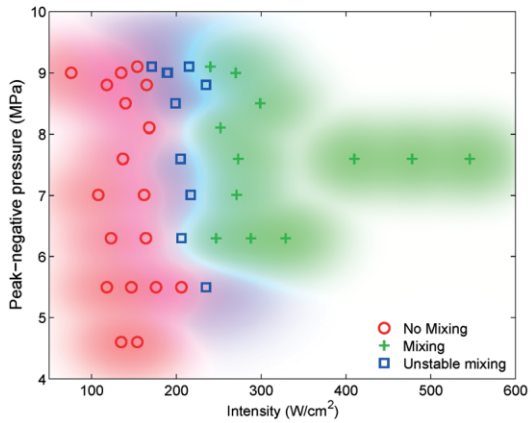


Fig. 6 Evaluation of the mixing efficacy. The interval between the pulses is maintained constant at 100 μs, while the pulse amplitude and the number of cycles were adjusted to obtain an efficient mixing effect (green), an unstable mixing (orange) and no mixing effect (red). These different situations are represented in a phase diagram of the peak-negative pressure (MPa) *vs.* the intensity (W cm^{-2}).

(in W cm^{-2}), which are obtained from these parameters, affect the liquid perfluorocarbon differently. Indeed, mechanical effects such as cavitation are mainly correlated to the peak-negative pressure, while thermal effects such as vaporization are influenced by the total acoustic energy absorbed by the medium (here PFC). As shown in Fig. 6, the mixing efficiency depends mostly on the absorbed acoustical energy and only marginally on the peak-negative pressure, which tends to support a vaporisation-like phenomenon.

In summary, we designed a new and particularly effective active mixer based on localized vaporization of a perfluorocarbon stream at the focal zone of an ultrasound transducer. The results show that when the ultrasound is active within the microfluidic channel, the laminar flow is affected in less than 2 ms, while a total switch from a non-mixing to a mixing situation is observed in roughly 100 ms following the delivery of the acoustic pulse. High mixing efficacy was reached, as illustrated by the low mixing index values (MI $<$ 0.2). Overall, this method is simple to implement and highly effective, does not require tailored channel geometries, is applicable to a wide range of Reynolds numbers ($10^{-4} < Re < 2.10^{0}$) and is compatible with both hydrophilic and hydrophobic microfluidic systems. In addition, as a spontaneous separation of the mixed fluids from the PFC occurs downstream of the focal zone, the PFC phase can be easily separated from the mixed phase at the end of the run. We believe that such ultrasound-triggered mixing using PFC-vaporization properties will lead to a new generation of switchable, extremely fast, and highly versatile mixers that can be easily incorporated in microfluidic chips.

Acknowledgements

This work was supported by LABEX WIFI (Laboratory of Excellence ANR-10-LABX-24) within the French Program "Investments for the Future" under reference ANR-10-IDEX-0001-02

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 06 March 2015. Downloaded by Ecole Sup de Physique et de Chimie Industrie on 26/03/2015 07:47:44.

PSL*. M.B. thanks the Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la microfluidique for a grant.

Notes and references

1 (*a*) C. M. Ho and Y. C. Tai, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 1998, **30**, 579–612; (*b*) *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, ed. D. Li, Springer, New York, 2008; (*c*) H.-P. Chou, C. Spence, A. Scherer and S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 11–13; (*d*) D. A. Dunn and I. Feygin, *Drug Discovery Today*, 2000, **5**, S84–S91; (*e*) M. W. Losey, M. A. Schmidt and K. F. Jensen, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2001, **40**, 2555–2562; (*f*) T. S. Sammarco and M. A. Burns, *AIChE J.*, 1999, **45**, 350–366.

2 (*a*) P. S. Dittrich and A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, **5**, 210–218; (*b*) G. M. Whitesides, *Nature*, 2006, **442**, 368–373; (*c*) T. M. Squires and S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.*, 2005, **77**, 977–1026; (*d*) P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam and B. H. Weigl, *Nature*, 2006, **442**, 412–418.

3 (*a*) K. S. Elvira, X. Casadevall i Solvas, R. C. R. Wootton and A. J. deMello, *Nat. Chem.*, 2014, **5**, 905–915; (*b*) H. E. H. Meijer, M. K. Singh, T. G. Kang, J. M. J. den Toonder and P. D. Anderson, *Macromol. Symp.*, 2009, **279**, 201–209.

4 (*a*) V. Mengeaud, J. Josserand and H. H. Girault, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 4279–4286; (*b*) S. Wong, M. Ward and C. Wharton, *Sens. Actuators, B*, 2004, **100**, 359–379; (*c*) C. Hong, J. Choi and C. H. Ahn, *Lab Chip*, 2004, **4**, 109–113; (*d*) C. Xi, D. L. Marks, D. S. Parikh, L. Raskin and S. A. Boppart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 7516–7521; (*e*) H. Y. Park, S. A. Kim, J. Korlach, E. Rhoades, L. W. Kwok, W. R. Zipfel, M. N. Waxham, W. W. Webb and L. Pollack, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 542–547.

5 H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdts and R. F. Ismagilov, *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **83**, 4664–4666.

6 (*a*) X. Niu and Y. J. Lee, *J. Micromech. Microeng.*, 2003, **13**, 454–462; (*b*) D. S. Kim, S. W. Lee, T. H. Kwon and S. S. J. Lee, *J. Micromech. Microeng.*, 2004, **14**, 798–805.

7 (*a*) A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone and G. M. Whitesides, *Science*, 2002, **295**, 647–651; (*b*) C.-Y. Lee, C.-L. Chang, Y.-N. Wang and L.-M. Fu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**, 3263–3287.

8 (*a*) H. H. Bau, J. Zhong and M. Yi, *Sens. Actuators, B*, 2001, **79**, 207–215; (*b*) Z. Yang, S. Matsumoto, H. Goto, M. Matsumoto and R. Maeda, *Sens. Actuators, A*, 2001, **93**, 266–272.

9 C.-Y. Chen, C.-Y. Chen, C.-Y. Lin and Y.-T. Hu, *Lab Chip*, 2013, **13**, 2834–2839.

10 (*a*) J. Tsai and L. Lin, *Sens. Actuators, A*, 2002, **97–98**, 665–671; (*b*) B. Xu, T. N. Wong, N. T. Nguyen, Z. Che and J. C. Chai, *Biomicrofluidics*, 2010, **4**, 44102.

11 A. N. Hellman, K. R. Rau, H. H. You, S. Bae, J. F. Palmer, K. Scott Phillips, N. L. Allbritton and V. Venugopalan, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4484–4492.

12 (*a*) D. Ahmed, X. Mao, B. K. Juluri and T. J. Huang, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, **7**, 727–731; (*b*) D. Ahmed, X. Mao, J. Shi, B. K. Juluri and T. J. Huang, *Lab Chip*, 2009, **9**, 2738–2741.

13 P.-H. Huang, Y. Xie, D. Ahmed, J. Rufo, N. Nama, Y. Chen, C. Y. Chan and T. J. Huang, *Lab Chip*, 2013, **13**, 3847–3852.

14 A. Venancio-Marques, F. Barbaud and D. Baigl, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 3218–3223.

15 M. Bezagu, C. Errico, V. Chaulot-Talmon, F. Monti, M. Tanter, P. Tabeling, J. Cossy, S. Arseniyadis and O. Couture, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 7205–7208The concomitant use of ultrasound and PFC has recently been shown to allow spatial and temporal control of spontaneous reactions, see: .

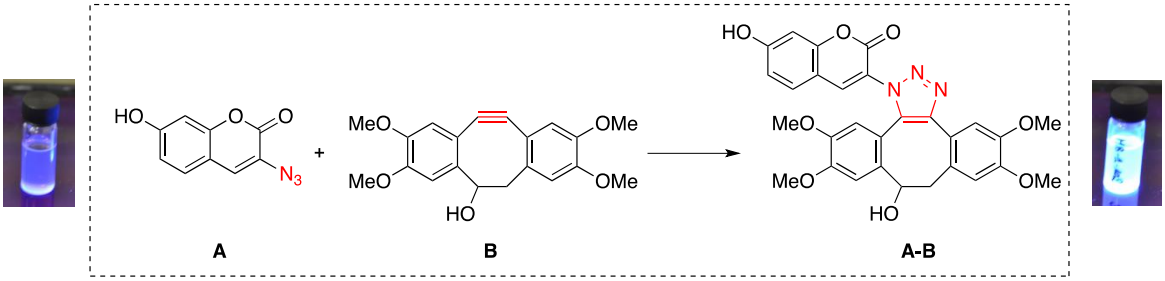
16 X. Mao, B. K. Juluri, M. I. Lapsley, Z. S. Stratton and T. J. Huang, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, **8**, 139–144.

17 (*a*) X. Feng, Y. Ren and H. Jiang, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 054121; (*b*) T. R. Shih and C. K. Chung, *Microfluid. Nanofluid.*, 2008, **5**, 175–183; (*c*) N.-T. Nguyen and Z. Wu, *J. Micromech. Microeng.*, 2005, **15**, R1–R16.

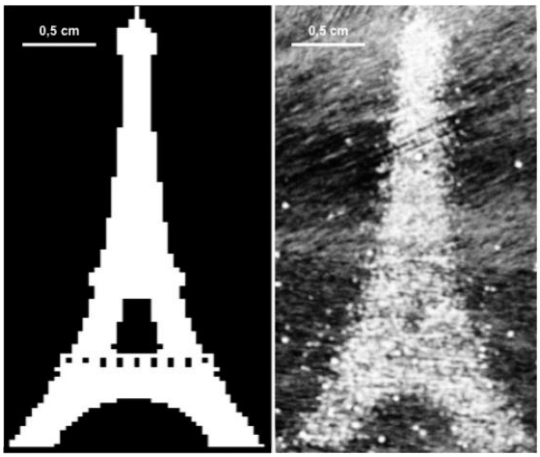
Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons pu explorer plusieurs applications du phénomène de vaporisation de liquides perfluorocarbonés (perfluorohexane et perfluoropentane) sous l'effet de la focalisation d'une onde ultrasonore.

Dans un premier temps, nous avons été en mesure de montrer qu'il était possible d'accéder à un excellent contrôle spatial et temporel d'une réaction chimique spontanée en encapsulant l'un des partenaires réactionnels dans des microgouttes de perfluorocarbone (doubles émulsions). Pour réaliser cette preuve de concept de chimie *in situ*, nous avons sélectionné une réaction modèle de chimie click non catalysée entre un azoture et un alcyne contraint dans un cycle à 8 chaînons avec induction de fluorescence.

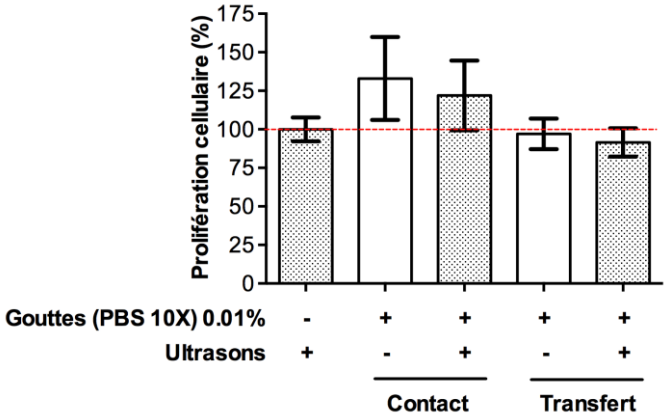


Nous avons pu libérer le contenu **A** des microgouttes en présence d'un partenaire réactionnel **B** à l'aide d'un appareil échographique utilisé en clinique et ainsi réaliser le motif en deux dimensions de la tour Eiffel en quelques secondes, grâce à l'induction de fluorescence consécutive à la formation du produit de cycloaddition **A-B**.

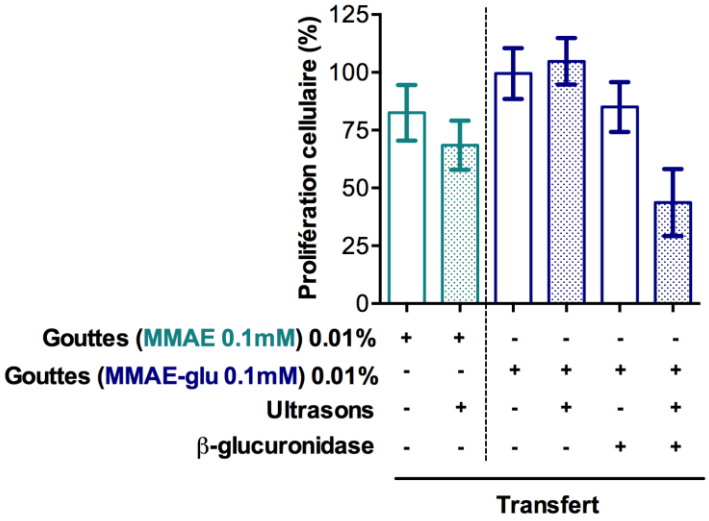


A la suite de cette étude préliminaire de preuve de concept, nous avons appliqué le concept de chimie *in situ* à l'activation spatialement contrôlée de pro-drogues glucuronylées de la doxorubicine et de la

monométhylauristatine E, deux produits anticancéreux connus. Pour cela, nous avons engagé une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses en collaboration avec l'équipe du Professeur S. Papot. Les résultats préliminaires de cette étude montrent d'une part que la composition de nos microgouttes, ainsi que leur vaporisation sous l'effet d'une sollicitation ultrasonore n'induisent pas de toxicité sur les populations cellulaires testées.

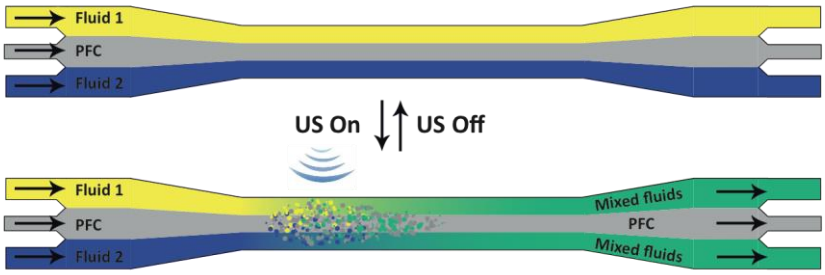


D'autre part, il a été possible d'initier *in vitro* la conversion locale des pro-drogues glucuronylées testées en leur forme active, activation résultant en une toxicité accrue sur les cellules cancéreuses étudiées.



De tels résultats semblent donc prometteurs pour envisager de tester le concept de chimie *in situ* sur le petit animal (souris, rat).

Une seconde application à la vaporisation du perfluorocarbone par des ultrasons cliniques développée lors de cette thèse concerne la conception d'un nouveau type de mélangeur microfluidique, basé sur la déstabilisation au niveau de la zone focale d'un transducteur ultrasonore d'un flux central de PFC.



Ce mélangeur s'est avéré être rapide, efficace, compatible avec tous les types de fluides, sans dépendance géométrique particulière, et activable à la demande. Le PFC utilisé peut également être extrait et recyclé à la sortie de la zone de mélange

La sensibilité aux ultrasons du perfluorohexane et des solvants perfluorés de poids moléculaire inférieur peut donc trouver des applications très diverses, du mélange en microfluidique jusqu'à la délivrance de médicaments et la chimie contrôlée. Ces dernières applications pourraient ouvrir la voie vers une nouvelle opportunité thérapeutique pour les patients atteints de cancers. Nous envisageons ainsi à l'avenir d'aller **fabriquer directement et exclusivement les médicaments dans les tumeurs**, afin de minimiser les effets secondaires.

Références bibliographiques

(1) Muller, P. Y.; Milton, M. N. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11*, 751-761.

(2) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818-1822.

(3) Malam, Y.; Loizidou, M.; Seifalian, A. M. *Trends in Pharm. Sciences* **2009**, *30*, 592-599.

(4) Mitragotri, S. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 255-260.

(5) Ferrara, K. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1097-1102.

(6) Couture, O.; Foley, J.; Kassell, N. F.; Larrat, B.; Aubry, J.-F. *Transl. Cancer Res.* **2014**, *3*, 494-511.

(7) Weinstein, J. N.; Magin, R. L.; Yatvin, M. B.; Zaharko, D. S.; *Science* **1979**, *204*, 188-191.

(8) Schroeder, A.; Kost, J.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *162*, 1-16.

(9) Barenholz, Y. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117-13.

(10) https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00826085

(11) Mackay, J. A.; Chilkoti, A. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 483-500.

(12) Al-Ahmady, Z. S.; Al-Jamal, W. T.; Bossche, J. V.; Bui, T. T.; Drake, A. F.; Mason, A. J.; Kostarelos, K. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9335-9346.

(13) Mannaris, C.; Efthymiou, E.; Meyre, M.-E.; Averkiou, M. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2013**, *39*, 2011-2020.

(14) Lorenzato, C.; Cernicanu, A.; Meyre, M.-E.; Germain, M.; Pottier, A.; Levy, L.; Denis de Senneville, B.; Bos, C.; Moonen, C.; Smirnov, P. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 185-192.

(15) Grüll, H.; Langereis, S. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 317-327.

(16) Pour des exemples d'études *in vivo*, voir : (a) Ranjan, A.; Jacobs, G. C.; Woods, D. L.; Negussie, A. H.; Partanen, A.; Yarmolenko, P. S.; Gacchina, C. E.; Sharma, K. V.; Frenkel, V.; Wood, B. J.; Dreher, M. R. *J. Control. Release* **2012**, *158*, 487-494. ; (b) Kheirolomoom, A.; Lai, C.-Y.; Tam, S. M.; Mahakian, L. M.; Ingham, E. S.; Watson, K. D.; Ferrara, K. W. *J. Control. Release* **2013**, *172*, 266-273. ; (c) de Smet, M.; Heijman, E.; Langereis, S.; Hijnen, N. M.; Grüll, H. *J. Control. Release* **2011**, *150*, 102-110.

(17) https://clinicaltrials.gov/show/NCT02181075

(18) Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2161-2170.

(19) Geers, B.; Dewitte, H.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 248-255.

(20) Geers, B.; Lentacker, I.; Sanders, N. N.; Demeester, J.; Meairs, S.; De Smedt, S. C. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 249-256.

(21) Lentacker, I.; Geers, B.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 101-108.

(22) Escoffre, J.-M.; Mannaris, C.; Geers, B.; Novell, A.; Lentacker, I.; Averkiou, M.; Bouakaz, A. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **2013**, *60*, 78-87.

(23) Tinkov, S.; Coester, C.; Serba, S.; Geis, N. A.; Katus, H. A.; Winter, G.; Bekeredjian, R. *J. Control. Release* **2010**, *148*, 368-372.

(24) Borden, M. A.; Caskey, C. F.; Little, E.; Gillies, R. J.; Ferrara, K. W. *Langmuir* **2007**, *23*, 9401-9408.

(25) Frenkel, P. A.; Chen, S.; Thai, T.; Shohet, R. V.; Grayburn, P. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2002**, *28*, 817-822.

(26) Tartis, M. S.; McCallan, J.; Lum, A. F. H.; LaBell, R.; Stieger, S. M.; Matsunaga, T. O.; Ferrara, K. W. *Ultrasound Med. Biol.* **2006**, *32*, 1771-1780.

(27) Rychak, J. J.; Klibanov, A. L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *72*, 82-93.

(28) De Temmerman, M.-L.; Dewitte, H.; Vanderbroucke, R. E.; Lucas, B.; Libert, C.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I.; Rejman, J. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9128-9235.

(29) Dewitte, H.; Verbeke, R.; Breckpot, K.; Vandenbroucke, R. E.; Libert, C.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I. *J. Control. Release* **2014**, *195*, 138-146.

(30) Cool, S. K.; Geers, B.; Lentacker, I.; De Smedt, S. C.; Sanders, N. N. Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, **2013**, *948*, 195-204.

(31) Suzuki, R.; Takizawa, T.; Negishi, Y.; Hagisawa, K.; Tanaka, K.; Sawamura, K.; Utoguchi, N.; Nishioka, T.; Maruyama, K. *J. Control. Release* **2007,** *117*, 130-136.

(32) Husseini, G. A.; Pitt, W. G. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1137-1152.

(33) Gao, Z.; Fain, H. D.; Rapoport, N. *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 317-330.

(34) Staples, B. J.; Pitt, W. G.; Roeder, B. L.; Husseini, G. A.; Rajeev, D.; Schaalje, G. B. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 3122-3131.

(35) Sheeran, P. S.; Wong, V. P.; Luois, S.; McFarland, R. J.; Ross, W. D.; Feingold, S.; Matsunaga, T. O.; Dayton, P. A. *Ultrasound Med. Biol.* **2011**, *37*, 1518-1530.

(36) Kawabata, K.; Sugita, N.; Yoshikawa, H.; Azuma, T.; Umemura, S. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, 4548-4552.

(37) Shpak, O.; Verweij, M.; Vos, H. J.; de Jong, N.; Lohse, D.; Versluis, M. *PNAS* **2014**, *111*, 1697-1702.

(38) Javadi, M.; Pitt, W. G.; Belnap, D. M.; Tsosie, N. H.; Hartley, J. M. *Langmuir* **2012**, *28*, 14720-14729.

(39) Fabiilli, M. L.; Haworth, K. J.; Sebastian, I. E.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Ultrasound Med. Biol.* **2010**, *36*, 1364-1375.

(40) Fabiilli, M. L.; Lee, J. A.; Kripfgans, O. D.; Carson, P. L.; Fowlkes, J. B. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2753-2765.

(41) Couture, O.; Faivre, M.; Pannacci, N.; Babataheri, A.; Servois, V.; Tabeling, P.; Tanter, M. *Med. Phys.* **2011**, *38*, 1116-1123.

(42) Couture, O.; Urban, A.; Bretagne, A.; Martinez, L.; Tanter, M.; Tabeling, P. *Med. Phys.* **2012**, *39*, 5229-5237.

(43) Fabiilli, M. L.; Piert, M. R.; Koeppe, R. A.; Sherman, P. S.; Quesada, C. A.; Kripfgans, O. D. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 366-374.

(44) Hernot, S.; Klibanov, A. L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1153-1166.

(45) Pour plus d'informations sur l'effet EPR dans le cadre de la délivrance de produits thérapeutiques, voir notamment : (a) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271-284.; (b) Maeda, H. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 138-144.

(46) Göstl, R.; Senf, A.; Hecht, S. Chem. Soc. Rev. 2014, 43, 1982-1996.

(47) Tasdelen, M. A.; Yagci. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5930-5938.

(48) Poloukhtine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15776.

(49) Orski, S. V.; Poloukhtine, A. A.; Arumugam, S.; Mao, L.; Popik, V. V.; Locklin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11024-11026.

(50) Pauloehrl, T.; Delaittre, G.; Winkler, V.; Welle, A.; Bruns, M.; Börner, H. G.; Greiner, A. M.; Bastmeyer, M.; Barner-Kowollik, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071-1074.

(51) Adzima, B. J.; Tao, Y.; Kloxin, C. J.; DeForest, C. A.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Nature Chemistry* **2011**, *3*, 256-259.

(52) Chen, R. T.; Marchesan, S.; Evans, R. A.; Styan, K. E.; Such, G. K.; Postma, A.; McLean, K. M.; Muir, B. W.; Caruso, F. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 889-895.

(53) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 724-744.

(54) DeForest, C. A.; Polizzotti, B. D.; Anseth, K, S. *Nature Materials* **2009**, *8*, 659-664.

(55) Xi, W.; Peng, H.; Aguirre-Soto, A.; Kloxin, C. J.; Stansbury, J. W.; Bowman, C. N. *Macromolecules* **2014**, *47*, 6159-6165.

(56) Liu, Z.; Lin, Q.; Sun, Y.; Liu, T.; Bao, C.; Li, F.; Zhu, L. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3912-3917.

(57) Kalinin, Y. V.; Murali, A.; Gracias, D. H. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 9707-9726.

(58) Leong, T.; Gu, Z.; Koh, T.; Gracias, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11336-11337.

(59) Ye, H.; Randall, C. L.; Leong, T. G.; Slanac, D. A.; Call, E. K.; Gracias, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4991-4994.

(60) Park, J-R.; Slanac, D. A.; Leong, T. G.; Ye, H.; Nelson, D. B.; Gracias, D. H. Journal of Microelectromechanical Systems 2008, 17, 265-271.

(61) Yavuz, M. S.; Cheng, Y.; Chen, J.; Cobley, C. M.; Zhang, Q.; Rycenga, M.; Xie, J.; Kim, C.; Song, K. H.; Schwartz, A. G.; Wang, L. V.; Xia, Y. *Nature Materials* **2009**, *8*, 935-939.

(62) Skrabalak, S. E.; Chen, J.; Sun, Y.; Lu, X.; Au, L.; Cobley, C. M.; Xia, Y. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1587-1595.

(63) Teh, S-Y.; Lin, R.; Hung, L-H.; Lee, A. P. *Lab Chip* **2008**, *8*, 198-220.

(64) Gu, H.; Duits, M. H. G.; Mugele, F. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2572-2597.

(65) Pour des applications en synthèse, voir : Theberge, A. B.; Mayot, E.; El Harrak, A.; Kleinschmidt, F.; Huck, W. T. S.; Griffiths, A. D. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1320-1326.

(66) Tan, W-H.; Takeuchi, S. *Lab Chip* **2006**, *6*, 757-763.

(67) Fabiilli, M. L.; Wilson, C. G.; Padilla, F.; Martin-Saavedra, F. M.; Fowlkes, J. B.; Franceschi, R. T. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9*, 7399-7409.

(68) Travaux de Magalie Faivre, post-doc, 2009-2010.

(69) Baroud, C. N.; Gallaire, F.; Dangla, R. *Lab Chip* **2010**, *10*, 2032-2045.

(70) Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163-4166.

(71) Utada, A. S.; Lorenceau, E.; Link, D. R.; Kaplan, P. D.; Stone, H. A.; Weitz, D. A. *Science* **2005**, *308*, 537-541.

(72) Kobayashi, I.; Wada, Y.; Uemura, K.; Nakajima, M. *Microfluid. Nanofluid.* **2010**, *8*, 255-262.

(73) Li, Z.; Leshansky, A. M.; Pismen, L. M.; Tabeling, P. *Lab Chip* **2015**, *15*, 1023-1031.

(74) Mittal, N.; Cohen, C.; Bibette, J.; Bremond, N. *Phys. Fluids* **2014**, *26*, 082109.

(75) Sugiura,S.; Nakajima, M.; Kumazawa,N.; Iwamoto, S.; Seki, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9405-9409.

(76) Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *PNAS* **2003**, *100*, 18846-18851.

(77) Agard, N J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.

(78) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.

(79) McKay, C. S.; Moran, J.; Pezacki, J. P.; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 931-933.

(80) McKay, C. S.; Blake, J. A.; Cheng, J.; Danielson, D. C.; Pezacki, J. P. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10040-10042.

(81) Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.

(82) Schoenebeck, F.; Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8121-8133.

(83) Stockmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci*. **2011**, *2*, 932-936.

(84) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. A. *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4603−4606.

(85) Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bauerle, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4677-4680.

(86) Jung, M. E.; Mossman, A. B.; Lyster, M. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3698-3701.

(87) Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech J.; Gerken, M.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.

(88) Mürdter, T.; Friedel, G.; Backman, J. T.; McClellan, M.; Schick, M.; Gerken, M.; Bosslet, K.; Fritz, P.; Toomes, H.; Kroemer, H. K.; Sperker, B. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 223-228.

(89) Albin, N.; Massaad, L.; Toussaint, C.; Mathieu, M.-C.; Morizet, J.; Parise, O.; Gouyette, A.; Chabot, G. G. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3541-3546.

(90) Tranoy-Opalinski, I.; Legigan, T.; Barat, R.; Clarhaut, J.; Thomas, M.; Renoux, B.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 302-313.

(91) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Jayle, C.; Alsarraf, J.; Thomas, M.; Papot, S. *Eur J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 75-80.

(92) Doronina, S. O.; Toki, B. E.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cerveny, C. G.; Chace, D. F.; DeBlanc, R. L.; Gearing, R. P.; Bovee, T. D.; Siegall, C. B.; Francisco, J. A.; Wahl, A. F.; Meyer, D. L.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778-784.

(93) Senter, P. D.; Sievers, E. L. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 631-637.

(94) Stachulski, A. V.; Meng, X. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 806-848.

(95) Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516-4520.

(96) Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angilè, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Köster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632-1639.

(97) Fabiilli, M. L.; Piert, M. R.; Koeppe, R. A.; Sherman, P. S.; Quesada, C. A.; Kripfgans, O. D. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 366-374.

(98) van Brakel, R.; Vulders, R. C. M.; Bokdam, R. J.; Grüll, H.; Robillard, M. S. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 714-718.

(99) Versteegen, R. M.; Rossin, R.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; Robillard, M. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112-14116.

(100) Thatcher, N. J.; Edwards, R. J.; Lemoine, N. R.; Doehmer, J.; Davies, D. S. *Cancer Gene Therapy* **2000**, *7*, 521-525.

(101) Denny, W. A. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *1*, 48-70.

(102) Reid, A. B.; Kurten, R. C.; McCullough, S. S.; Brock, R. W.; Hinson, J. A. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2004**, *312*, 509-516.

(103) Zhao, Y.; Gu, P.; Zhang, H.; Zhang, Q.; Fan, C. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5289-5295.

(104) Pelphrey, P. M.; Popov, V. M.; Joska, T. M.; Beierlein, J. M.; Bolstad, E. S. D.; Fillingham, Y. A.; Wright, D. L.; Anderson, A. C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 940-950.

(105) Jung, M. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1984-1992.

(106) (a) Dittrich, P. S.; Manz, A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 210-218; (b) Whitesides, G. M. *Nature* **2006**, *442*, 368-373; (c) Squires, T. M.; Quake, S. R. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977-1026; (d) Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M. R.; Weigl, B. H. *Nature* **2006**, *442*, 412-418.

(107) Elvira, K. S.; Casadevall i Solvas, X.; Wootton, R. C. R.; deMello, A. J. *Nat. Chem.* **2014**, *5*, 905–915.

(108) Meijer, H. E. H.; Singh, M. K.; Kang, T. G.; den Toonder, J. M. J.; Anderson, P. D. *Macromol. Symp.* **2009**, *279*, s201–209.

(109) Cha, J.; Kim, J.; Ryu, S.-K.; Park, J.; Jeong, Y.; Park, S.; Park, S.; Kim, H. C.; Chun, K. *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 1778-1782.

(110) Song, H.; Bringer, M. R.; Tice, J. D.; Gerdts, C. J.; Ismagilov, R. F. *App. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664–4666.

(111) (a) Niu, X.; Lee, Y. J. *Micromech. Microeng*. **2003**, *13*, 454–462; (b) Kim, D. S.; Lee, S. W.; Kwon, T. H.; Lee, S. S. J. *Micromech. Microeng*. **2004**, *14*, 798–805.

(112) (a) Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. *Science* **2002**, *295*, 647–651; (b) Lee, C.-Y.; Chang, C.-L.; Wang, Y.-N.; Fu, L.-M. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3263–3287.

(113) Chen, C.-Y.; Chen, C.-Y.; Lin, C.-Y.; Hu, Y.-T. *Lab. Chip.* **2013**, *13*, 2834–2839.

(114) (a) Tsai, J.; Lin, L. *Sens. Actuators, A* **2002**, *97–98*, 665–671; (b) Xu, B.; Wong, T. N.; Nguyen, N. T.; Che, Z.; Chai, J. C. *Biomicrofluidics* **2010**, *4*, 44102.

(115) Hellman, A. N.; Rau, K. R.; You, H. H.; Bae, S.; Palmer, J. F.; Scott Phillips, K.; Allbritton, N. L.; Venugopalan, V. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4484-4492.

(116) (a) Ahmed, D.; Mao, X.; Juluri, B. K.; Huang, T. J. *Microfluid Nanofluid*, **2009**, *7*, 727–731; (b) Ahmed, D.; Mao, X.; Shi, J.; Juluri, B. K.; Huang, T. J. *Lab. Chip.* **2009**, *9*, 2738–2741.

(117) Huang, P.-H.; Xie, Y.; Ahmed, D.; Rufo, J.; Nama, N.; Chen, Y.; Chan, C. Y.; Huang, T. J. *Lab. Chip.* **2013**, *13*, 3847–3852.

(118) Venancio-Marques, A.; Barbaud, F.; Baigl, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3218–3223.

(119) Feng, X.; Ren, Y.; Jiang, H. *Biomicrofluidics* **2013**, *7*, 054121.

(120) Shih, T. R.; Chung, C. K. *Microfluid. Nanofluid.* **2008**, *5*, 175-183.

(121) Nguyen, N.-T.; Wu, Z. *J. Micromech. Microeng.* **2005**, *15*, R1-R16.

(122) Cobbold, R. S. C. *Foundations of Biomedical Ultrasound, Oxford University Press* (2006).

(123) Xia, Y.; Whitesides, G. M. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153-184.

Marine BEZAGU

Réactions chimiques et mélanges locaux induits par ultrasons : vers une chimiothérapie ciblée

Le développement de méthodes de délivrance de médicaments ciblées est devenu un objectif primordial dans le cadre des thérapies anticancéreuses. Dans ce contexte, il est possible de combiner l'utilisation de microgouttes de perfluorocarbone (PFC) avec des ultrasons afin de déclencher à distance et de façon spatialement contrôlée la vaporisation du PFC, et donc l'ouverture de ces microgouttes et la libération de leur contenu. Nous avons ainsi pu démontrer la possibilité d'utiliser ces microgouttes de PFC afin de contrôler spatialement mais également temporellement une réaction chimique spontanée comme la cycloaddition non catalysée entre un azoture et un alcyne. Nous avons ensuite montré que cette stratégie de chimie *in situ* pouvait être appliquée avec succès à l'activation locale *in vitro* de pro-drogues de la doxorubicine et de la monométhylauristatine E par la β-glucuronidase, ouvrant ainsi la voie à la fabrication de médicaments directement dans les tumeurs.

Une stratégie de mélange microfluidique a également été étudiée. Le caractère laminaire des écoulements de fluides en microfluidique rendant le mélange entre fluides particulièrement lent, il est donc nécessaire de concevoir des méthodes de mélange efficaces dans l'optique de créer de véritables « laboratoires sur puce ». Nous avons ainsi pu montrer qu'une généralisation du concept de vaporisation du PFC par ultrasons pouvait permettre d'accéder à une méthode de mélange microfluidique rapide et efficace.

Mots-clés : chimie *in* situ, délivrance de médicaments, perfluorocarbone, ultrasons, mélange microfluidique.

Development of targeted drug-delivery methods has become an increasingly important research field in cancer therapy. In this context, perfluorocarbon (PFC) microdroplets can be combined with ultrasound. The latter can remotely trigger the vaporization of the PFC phase, thus opening the microdroplets and releasing their content in a spatially controlled manner. In this work, we were able to establish that these PFC droplets could be used to control both temporally and spatially a spontaneous chemical reaction such as the non-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. This « *in situ* chemistry » strategy was also successfully applied to the *in vitro* localized release of either a doxorubicin or a monomethylauristatin E prodrug and their subsequent activation by a specific enzyme, the β-glucuronidase. We believe that such strategy could lead to drug synthesis directly into the tumors.

A new microfluidic mixing method was also developed. Flows are typically laminar in microfluidic systems, which impedes an efficient and fast mixing between fluids. In order to design fully functionnal « labs on chips », mixing methods need to be implemented. In this context, we showed that the vaporization of a PFC phase under the focus of an ultrasound transducer could be used to achieve fast and efficient mixing in a microfluidic channel.

Key-words: *in situ* chemistry, drug-delivery, perfluorocarbon, ultrasound, microfluidic mixing.