



**HAL**  
open science

**Dépôt par impression jet d'encre de microplots de silice  
mésoporeuse à l'extrémité de fibres optiques et  
fonctionnalisation par des biorécepteurs et des  
photosensibilisateurs pour le diagnostic et le traitement  
local de tumeurs précoces**

Romain Trihan

► **To cite this version:**

Romain Trihan. Dépôt par impression jet d'encre de microplots de silice mésoporeuse à l'extrémité de fibres optiques et fonctionnalisation par des biorécepteurs et des photosensibilisateurs pour le diagnostic et le traitement local de tumeurs précoces. Matériaux. Université de Limoges, 2019. Français. NNT: 2019LIMO0038 . tel-04546128

**HAL Id: tel-04546128**

**<https://theses.hal.science/tel-04546128v1>**

Submitted on 15 Apr 2024

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

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

**Université de Limoges**

**ED 609 - Sciences et Ingénierie des Matériaux, Mécanique,  
Énergétique (SIMME)**

**Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER)**

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Procédés Céramiques

Présentée et soutenue le 29 mars 2019 par  
**Romain Trihan**

**Dépôt par impression jet d'encre de microplots de silice  
mésoporeuse à l'extrémité de fibres optiques et fonctionnalisation  
par des biorécepteurs et des photosensibilisateurs pour le  
diagnostic et le traitement local de tumeurs précoces**

Thèse dirigée par Martine Lejeune, Fabrice Rossignol, Fabrice Lalloué

**JURY :**

**Président du jury**

M. Vincent SOL, Professeur, LCSN, Université de Limoges

**Rapporteurs**

M. Jérôme CHEVALIER, Professeur, MATEIS, CNRS – INSA Lyon – Université Lyon 1

M. Thierry GACOIN, Professeur, PMC, CNRS – Ecole Polytechnique

**Examineurs**

M. Pascal ANDREAZZA, MCF., ICMN, CNRS – Université d'Orléans

M. Xavier CATTOEN, CR., Institut Néel, CNRS – Université de Grenoble-Alpes

M. Fabrice LALLOUE, Professeur, CAPTuR, Université de Limoges

Mme. Martine LEJEUNE, Professeure, IRCER, CNRS – Université de Limoges

M. Fabrice ROSSIGNOL, Directeur de Recherche, IRCER, CNRS – Université de Limoges

**Invités**

Mme. Maggy COLAS, Chargée de Recherche, IRCER, CNRS – Université de Limoges

M. Jérôme DESROCHES, Société Kamax Innovative System

M. Cédric ENGUEHARD, Société Dyameo



*Exige beaucoup de toi-même et attends peu des autres. Ainsi beaucoup d'ennuis te seront épargnés.*

**Confucius (551 av JC – 479 av JC)**

*La victoire sur soi est la plus grande des victoires.*

**Platon (428 av JC – 348 av JC)**

*Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas.*

**Léonard de Vinci (1452 – 1519)**

*Le travail éloigne de nous trois grands maux : l'ennui, le vice et le besoin*

**Voltaire (1694 – 1778)**

*Seuls ceux qui sont assez fous pour penser qu'ils peuvent changer le monde y parviennent !*

**Henri Dunant (1828 – 1910)**

*Ne cherchez pas en dehors de vous : cherchez en vous-mêmes ou vous ne trouverez jamais*

**Bertha von Suttner (1843 – 1914)**

*Rien n'est particulièrement difficile si on le subdivise en petites tâches.*

*A celui qui voit loin, il n'est rien d'impossible.*

**Henry Ford (1863 – 1947)**

*Je choisis une personne paresseuse pour un travail difficile, car une personne paresseuse va trouver un moyen facile de le faire.*

*La patience est un élément clé de la réussite.*

**Bill Gates (1955 – ...)**

*Ayez le courage de suivre votre cœur et votre intuition. L'un et l'autre savent ce que vous voulez réellement devenir. Le reste est secondaire.*

*L'innovation, c'est une situation qu'on choisit parce qu'on a une passion brûlante pour quelque chose.*

**Steve Jobs (1955 – 2011)**



## Remerciements

---

### **A M. Vincent SOL,**

*Professeur, Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN),  
Université de Limoges*

Merci d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse : ce fut un véritable honneur et un plaisir. Je tiens aussi à te remercier pour tes conseils nombreux sur la partie thérapie. Je n'étais pas familier des porphyrines et des moyens de caractérisations avec l'oxygène singulet, j'ai néanmoins pu profiter de tes lumières pour mener à bien cette étude, qui s'est avérée complexe et pas si facile à mettre en place. Je n'imagine pas le mal que je me serais donné si tu n'avais pas été là... Tu es accessible et sympathique, c'était un plaisir à chaque fois que je venais au LCSN ! Merci pour tout.

### **A M. Jérôme CHEVALIER,**

*Professeur, Directeur du Laboratoire MATEIS de Lyon, INSA Lyon*

Je suis honoré que vous ayez pu assister à ma soutenance de thèse et merci également d'avoir accepté d'être rapporteur de mon manuscrit. J'avais fait votre connaissance lors d'un séminaire du GFC en 2015, où vous aviez donné une présentation sur des implants médicaux. Un exposé inspirant, qui a suscité chez moi une motivation d'autant plus forte de poursuivre dans le domaine des céramiques pour la santé. Cela s'est concrétisé lors de mes travaux de thèse et vous étiez là pour l'aboutissement de tout ceci. Merci à vous.

### **A M. Thierry GACOIN,**

*Professeur au Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (PMC), Ecole  
Polytechnique*

Un très grand merci d'avoir accepté d'être rapporteur de mon manuscrit. Votre expérience dans le domaine des matériaux sol-gel et des mésoporeux a permis de mettre en lumière des enjeux importants au niveau de ces matériaux, notamment de part vos questions et remarques pertinentes et très ciblées, lors de ma soutenance. Merci aussi pour votre retour concernant mon manuscrit, c'est toujours un plaisir que d'être reconnu pour son travail.

### **A M. Pascal ANDREAZZA,**

*Maître de Conférences au Laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures  
(ICMN), Université d'Orléans*

J'ai un peu forcé le destin pour provoquer notre rencontre. Après avoir discuté avec Caroline à propos des caractérisations GISAXS lors d'un séminaire à Limoges en mars 2017, c'est cette fois-ci lors d'un séminaire à Orléans en janvier 2018 que nous avons pu nous rencontrer à l'ICMN. Votre accueil a été des plus chaleureux, de même quant à la possibilité de pouvoir travailler ensemble, en réalisant des caractérisations GISAXS. Ce côté chaleureux, je l'ai ressenti également lors de ma seconde visite. Une semaine intense de manipulations, qui a donné de très bons résultats. J'ai été honoré que vous puissiez assister à ma soutenance en tant que membre du jury, pour voir l'aboutissement de tout ce travail. Merci encore pour votre aide et vos conseils.

### **A M. Xavier CATTOËN,**

*Chargé de Recherche à l'Institut Néel, Université de Grenoble-Alpes*

Xavier, je tiens à t'adresser mes plus sincères remerciements pour ton aide tout au long de l'étude. La partie click a été une étape essentielle pour fonctionnaliser ces matériaux.

Tu as contribué grandement par les nombreuses synthèses que tu as effectuées, notamment celles du pentynoate de NHS. Je ne te remercierai peut-être pas assez d'avoir été présent à chaque fois que j'en avais besoin. Merci également pour tes nombreux conseils quant à la catalyse de la réaction click, toutes les manip effectuées ont fini par payer ! Je souhaite également te remercier de l'honneur et du plaisir que tu m'as fait, de bien vouloir participer à mon jury de thèse. C'était l'ultime occasion pour se voir, après avoir échangé pendant plus de trois ans sans jamais vraiment avoir l'opportunité de se rencontrer !

**A M. Fabrice LALLOUE,**

*Professeur, Laboratoire Contrôle de l'Activation cellulaire Progression Tumorale et Résistance thérapeutique (CAPTuR), Faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges*

Fabrice, je tiens à te remercier tout particulièrement, d'avoir accepté de faire partie de mon encadrement et d'avoir assuré le suivi sur la partie biofonctionnalisation, sans quoi ma thèse n'aurait pas eu autant d'impact, j'en suis certain. Nos échanges étaient très intéressants et sur des sujets variés, notamment du fait de la pluridisciplinarité des travaux. Tu as su être à l'écoute des besoins que j'exprimais et cela a été très profitable pour l'étude, ainsi que pour ma curiosité scientifique personnelle. Merci pour cela !

**A M. Fabrice ROSSIGNOL,**

*Directeur de Recherche, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Fabrice, un très grand merci pour tes conseils éclairés, pour la pertinence de tes questions et de tes remarques, qui m'ont fait avancer et m'ont toujours fait découvrir de nouvelles choses. Nos échanges ont toujours été très agréables et tu as su être disponible quand j'en avais le plus besoin, surtout vers la fin ! J'ai aussi particulièrement apprécié que tu mettes en avant les doctorants au cours des nombreuses visites ou congrès qui ont eu lieu. Merci également de m'avoir donné les moyens nécessaires à ce projet de recherche.

**A Mme Martine LEJEUNE,**

*Professeure, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci pour tout. J'ai eu la chance d'avoir une directrice de thèse avec qui les relations humaines sont simples et chaleureuses. C'était un réel plaisir d'échanger avec toi et de se côtoyer autant, ce qui est facile avec un bureau à 10 mètres... Je garde en mémoire de très bonnes choses durant ces années de thèse. Merci de ton encadrement particulier, de ta gentillesse, de ta bonne humeur, de ton tact. Merci aussi des nombreuses choses partagées, des histoires drôles, des goûters improvisés, ainsi que de ce mémorable séminaire au Japon !

**A Mme Maggy COLAS,**

*Chargée de Recherche, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Maggy, un énorme merci pour toute l'aide que tu m'as apportée durant la thèse. Cette aide ne concernait pas que les manipulations Raman : c'est aussi toi qui m'a conseillé de contacter Alain Gibaud pour du GISAXS, et qui m'a un peu poussé à aller parler aux gens lors de certains congrès (MATV2L, GFSV, ...). Sans toi, certaines collaborations n'auraient pas eu lieu et ma thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui ! Merci pour ta patience et ta pédagogie concernant les analyses de spectroscopie. N'ayant pas eu de cours dessus, on peut vraiment dire que je partais de zéro... ce n'est plus le cas et c'est en grosse partie grâce à la bonne rigueur scientifique et à tes conseils. Merci !!!

**A M. Jérôme DESROCHES,**  
*Société Kamax Innovative System*

Jérôme, merci pour ton aide dans le cadre des projets Theranostic 2 et Diamed. Les nombreuses discussions que nous avons eues ont été riches et intéressantes. Je souhaite un bel avenir à la société Kamax.

**A M. Cédric ENGUEHARD,**  
*Société Dyameo*

Cédric, je suis content d'avoir fait ta connaissance. Tu as fait preuve de persévérance dans la gestion administrative et parfois scientifique du projet Diamed, malgré les problèmes rencontrés. Je ne doute pas de tes qualités et de l'importance de cette thématique, comme l'ont montré les récompenses des différents concours remportés par Dyameo. J'espère de tout cœur que tout cela servira et aboutira. Après m'être autant investi sur ce sujet pendant la thèse, cela me ferait bien sûr très plaisir. Je souhaite un bel avenir et succès à Dyameo...

**A M. Tigran MANSURYAN,**  
*Société Kamax Innovative System*

Merci Tigran pour ton aide et ton travail, d'une précision d'horloger, pour la préparation des fibres, pour le polissage, pour les différentes acquisitions qui ont été faites avec toi. En plus d'être d'une efficacité redoutable, tu es quelqu'un de très sympathique et c'est fort appréciable.

**A M. Philippe THOMAS,**  
*Directeur de Recherche, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein du laboratoire, un environnement des plus confortables, pour des travaux à fort potentiel. Je suis persuadé qu'un tel environnement est propice à l'épanouissement de chacun. Le labo me manquait un peu... alors j'ai décidé de revenir en postdoc ! Merci d'avoir contribué à faire du laboratoire ce qu'il est aujourd'hui !

**A M. Arnaud VIDECOQ,**  
*Directeur de Recherche, Axe1, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Je tiens à vous remercier de m'avoir donné l'occasion de représenter le laboratoire dans certains congrès, ainsi que de m'avoir permis de faire certaines caractérisations, nécessaires à la bonne réalisation de ma thèse (notamment la semaine de GISAXS à Orléans). Encore merci.

**A M. Virgile BARRET-VIVIN**  
*Post-doctorant, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Virgile, je ne te remercierai probablement jamais assez pour ton soutien durant cette période toute particulière qu'est la rédaction de thèse, et tous les doutes qui vont avec... Nos discussions, à la fois profondes au niveau scientifique, mais aussi sur le plan philosophique, m'ont certainement beaucoup apporté. Tu as su me donner beaucoup de recul, et indirectement une sorte d'assurance dans mes décisions. C'était également un plaisir d'avoir travaillé avec toi ! Merci pour tout !



**A M. Nicolas VEDRENNE,**

*Post-doctorant, Laboratoire Contrôle de l'Activation cellulaire Progression Tumorale et Résistance thérapeutique (CAPTuR), Faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges*

Nicolas, un très grand merci pour ton investissement au niveau des expériences, pour ta sympathie au quotidien. C'est appréciable de travailler avec des personnes exigeantes au niveau du travail et qui ont à cœur de faire les choses bien. Nos discussions m'ont apporté énormément sur le plan des connaissances en biologie et m'ont permis d'aborder la thèse avec davantage de maîtrise du sujet, et mieux comprendre les tenants et les aboutissants. Je te remercie chaleureusement pour tout ce que tu as rendu possible au niveau du projet et également par rapport aux expériences qui ont été utiles à la bonne réalisation de ma thèse.

**A M. Achraf NOUREDDINE**

*Post-doctorant, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Achraf, nous avons travaillé ensemble pendant un an où j'ai appris à te connaître. J'ai été également honoré d'être témoin pour ton mariage à Limoges. Je tiens à te remercier du fond du cœur pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec toi, pour les petits conseils, pour les franches rigolades, pour ta générosité, et aussi pour le fait que tu aies conforté mon choix par rapport à la thèse, qui s'est effectivement avérée intense et très formatrice. Merci pour tout mon ami.

**A M. Julien GRAFFION**

*Post-doctorant, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Julien, je tiens à te remercier de m'avoir un peu encadré lors de mes travaux de master. Le peu que tu m'as montré, même parfois juste par curiosité ou pour diversifier un peu les connaissances, m'a été profitable pour l'étude sur la partie thérapie. J'ai récupéré ton bureau après ton départ... peut-être que ça m'a donné du courage par rapport à tout le travail qu'il y avait à faire... ? Merci à toi !

**A M. Marc SINGLARD**

*Post-doctorant, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Marc, je tiens à te remercier pour ta sympathie, mais aussi pour les conseils que tu as pu me donner à propos de la technique jet d'encre de façon générale, pour ta disponibilité lorsque j'ai eu besoin d'information ou d'un petit coup de main. C'était un plaisir d'être dans le même bureau et de te côtoyer, et même encore maintenant au laboratoire ! A bientôt !

**A Mmes Olivia DE LOS COBOS et Marion MOUGENOT, A M. Bruno FOUSSERET,**

*Anciens doctorants de l'équipe jet d'encre, Laboratoire SPCTS, Université de Limoges*

Un énorme merci pour vos travaux de thèse, prémices de l'étude que j'ai menée et qui ont assurément permis de commencer ma thèse dans de très bonnes conditions.

**A Mmes Marion PONCELET et Chrystelle DOSSOU-YOVO, à MM. Eloi BEAUDROUET, Nicolas BERNARDIN, Matthias BICHAUD et Cédric COQUET,**

*Société CERADROP, MGI Group*

J'ai eu un très grand plaisir à travailler et à échanger avec vous, vous avez été d'un grand secours par rapport aux petits soucis qui arrivent parfois avec l'équipement du laboratoire, qui n'est plus tout jeune ! Merci aussi pour votre écoute concernant les différentes problématiques, techniques et industrielles, quand je voulais par exemple tester de nouvelles options. Un très grand merci !

**A Mmes Carole BAROU et Marie DARCHEVILLE, à M. Florent GAUTIER,**  
*Stagiaires de recherche, Ecole Nationale Supérieure de Céramique Industrielle (ENSCI),  
Limoges*

Je tiens à vous remercier très chaleureusement, de m'avoir fait confiance pour encadrer vos travaux de stage. Chaque année nous allons un peu plus loin dans la recherche, nous franchissons de nouvelles étapes. Des tempéraments différents, mais une même motivation. J'ai moi-même appris beaucoup à votre contact et pour cela je vous en remercie grandement !

**A Mmes Anne AIMABLE et Marguerite BIENIA,**  
*Maître de conférences, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de  
Limoges*

Merci à vous, vous avez contribué à la bonne ambiance à notre étage, parfois en rendant aussi des petits coups de main. C'était sympathique de pouvoir vous côtoyer au quotidien. Un merci spécial à Anne, qui a su me dire très simplement d'arrêter de vouloir corriger de minimes fautes du manuscrit, alors qu'il était temps de l'envoyer ! Au plaisir de se revoir à l'occasion.

**A M. André LECONTE,**  
*Ingénieur de Recherche, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de  
Limoges*

Dédé, je tenais à te remercier également, pour ta sympathie au quotidien. Un vrai personnage que j'ai appris à côtoyer, toujours là pour remonter le moral des troupes avec des blagues recherchées (ou pas...). Sur l'aspect scientifique, j'ai pris plaisir à échanger avec toi sur la thématique GISAXS, et cela m'a procuré du recul et un esprit plus critique par rapport à mes manipulations. De très bon conseil sur l'aspect humain également. Merci à toi !

**A Mme Julie CORNETTE,**  
*Ingénieure de Recherche, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de  
Limoges*

Julie, je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi, l'air de rien, une grande écoute et de petits conseils par-ci par-là qui simplifient grandement la vie ! Tu m'as aussi poussé à plusieurs reprises à participer à des congrès ou des écoles d'été et tu as vraiment bien fait ! Merci pour tous ces encouragements, pour ta gentillesse, pour ton écoute, merci pour TOUT !

**A M. Jean-René DUCLERE,**  
*Professeur, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci à toi Jean-René pour tes conseils, en spectroscopie UV, et merci pour ta sympathie !

**A M. François RIBOT,**  
*Responsable des caractérisations RMN liquides, Laboratoire de Chimie de la Matière  
Condensée de Paris (LCMCP), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Collège de France*

Un très grand merci d'avoir bien voulu mener plusieurs campagnes de caractérisations RMN sur mes encres. Cette étude a été très importante concernant l'étude du vieillissement et pour comprendre le comportement sol-gel avant dépôt. Merci aussi pour les nombreux conseils !

**A MM. Mohamed SELMANE et Cédric BOISSIERE,**

*Responsables des caractérisations GISAXS, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Collège de France*

Merci à vous d'avoir procédé aux premières caractérisations GISAXS qui ont eu lieu au début de cette étude. J'ai pu en bénéficier et je vous remercie chaleureusement du temps que vous avez passé à acquérir les données et pour les échanges que nous avons eus.

**A M. Alain GIBAUD,**

*Professeur, Responsable des caractérisations GISAXS, Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM), Le Mans Université*

Cher Alain, j'ai pu bénéficier de votre aide précieuse lorsque nous n'avions plus d'alternative pour caractériser les échantillons par GISAXS. J'ai découvert quelqu'un de très pédagogue, à l'esprit vif, et je garderai en mémoire nos échanges, très stimulants et enrichissants. Merci pour tout.

**A MM. Guillaume AMIARD et Ludovic THILLY,**

*Responsables des équipements FIB, Institut Pprime (P') de Poitiers, Université de Poitiers*

Il y avait certaines zones d'ombre concernant les comportements des matériaux que je cherchais à caractériser. Les préparations et caractérisations FIB mises en place par votre intermédiaire ont permis, alors que le laboratoire n'était pas encore muni de tels équipements, de mieux comprendre ces comportements des matériaux. Merci de m'avoir permis de réaliser ces tests.

**A M. Thierry BUFFETEAU,**

*Directeur de Recherche, Institut des Sciences Moléculaires, Université Bordeaux 1*

Un très grand merci pour votre aide concernant certaines données, lors de notre rencontre à l'école d'été du GFSV à Porquerolles. Les petites astuces à propos de l'orientation du porte-échantillon m'ont permis d'acquérir des spectres infrarouge beaucoup plus propres. Merci également d'avoir bien voulu tester ce que donneraient les analyses PM-IRRAS avec mes échantillons.

**A Mmes Valérie COUDERT et Elsa THUNE,**

*Responsables AFM, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci à vous pour votre aide concernant les caractérisations AFM, grâce aux multiples équipements à notre disposition au laboratoire. Deux approches en apparence différentes et pourtant complémentaires, qui m'ont permis d'être à l'aise et autonome au niveau de la mise en place de la pointe, des réglages à opérer, ainsi que des acquisitions réalisées. Merci donc pour la formation que vous m'avez dispensée. Les résultats de cette technique se sont avérés fort intéressants et c'est aussi en partie grâce à votre participation.

**A M. Sylvain VEDRAINE,**

*Maître de Conférences, Laboratoire Xlim, Université de Limoges*

Ce fut très aimable de nous permettre de procéder à des caractérisations sur un autre appareil AFM à une période cruciale de l'encadrement des stagiaires de recherche. Cela a permis de confirmer les résultats attendus et d'obtenir des images exploitables, avec un contraste intéressant.

**A Mme Amandine MAGNAUDEIX,**

*Maître de Conférences, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Amandine, tu as toute ma gratitude pour tout ce que tu m'as apporté tout au long de la thèse. De très bon conseil, je gardais souvent tes suggestions dans un coin de la tête, jusqu'au moment opportun pour les tester. Je te remercie aussi infiniment pour la formation accélérée que tu as dispensée par rapport au maniement des cellules, pour me montrer les protocoles de comptage de viabilité etc. Merci pour ce temps que tu as investi, et sois assurée, de nouveau, de toute ma gratitude pour ton aide et tes conseils.

**A Mme Claire CARRION,**

*Responsable de la plateforme de microscopie confocale et microscopie de fluorescence, Centre de Recherche Hospitalo-Universitaire (CBRS), Faculté de Médecine et de Pharmacie de Limoges*

Claire, merci pour toute l'aide que tu as apportée tout au long de la thèse. D'une gentillesse incroyable, tu es aussi très pédagogue et patiente. Nos échanges m'ont permis d'aborder de multiples choses au cours de ces années, et ont aussi amené leur lot de questions, que je n'hésitais pas à te poser. Merci donc pour tout ce que tu m'as apporté et merci pour ta gentillesse !

**A Mme Eloïse HYVERNAUD, à MM. Pierre CARLES, Patrice DUPORT et Yann LAUNAY,**

*Responsables du pôle de microscopie électronique, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Je tiens à vous remercier pour l'aide que vous m'avez tour à tour apportée avec les différentes plateformes de microscopie. Cela a permis d'être efficace par rapport aux différentes images ou aux différentes informations à tirer des échantillons. Merci pour votre aide !

**A M. Nicolas TESSIER-DOYEN,**

*Maître de Conférences, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Nicolas, merci de m'avoir initié à la technique de mesures interférométriques. Merci également pour ton écoute et tes conseils chaleureux au moment de la rédaction, qui m'ont redonné du courage quand j'en avais besoin !

**A Mmes Emeline RENAUDIE, Marina SOUSTRE, Marion VANDENHENDE, à M. Etienne LABORDE,**

*Plateforme CARMALIM, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci à vous tous pour l'aide apportée au cours de ces années, que ce soit pour le matériel, pour l'installation de bouteilles d'argon, pour les nombreuses commandes de produits chimiques. Merci également pour les différentes caractérisations que j'ai pu essayer avec vous, que ce soient les caractérisations sur poudres avec Marina ou aussi les caractérisations XPS avec Etienne. Merci pour votre sympathie et votre disponibilité !

**A Mme Sandra BLANCHET et M. Mickaël LACROIX,**

*Responsables de la plateforme caractérisations chimiques, Ecole Nationale Supérieure de Céramique Industrielle (ENSCI)*

Merci à vous pour vos conseils concernant les différences analyses et de m'avoir orienté vers les bonnes personnes ou vers des techniques plus appropriées et sensibles, quand j'en ai eu besoin.

**A Mmes Hélène MEMY, Nadine TCHEFRANOFF, Virginie LAVAUZELLE, Béatrice DERORY,**

*Service financier, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Je tiens à vous remercier pour les différentes missions ou congrès pour lesquels je vous ai sollicité, et que vous avez géré avec une efficacité redoutable, même parfois dans des délais très courts. Un remerciement plus particulier pour Hélène que j'ai le plus côtoyée, merci pour tout.

**A Mme Pamela BATHIAS,**

*Secrétaire Administratif, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Merci Pamela pour ton efficacité au quotidien : j'aimerais avoir ta faculté à gérer autant de choses dans une journée ! Merci aussi pour ton soutien vers la fin de la thèse, c'était très appréciable.

**A MM. Vincent CHALEIX et Jérémy GODARD,**

*Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), Université de Limoges*

J'ai pu faire un « stage » d'une semaine au sein du laboratoire LCSN, avec un environnement convivial. J'y ai découvert une autre approche de la chimie et ce fut très instructif et fortement enrichissant, dans une période charnière. Egalement un immense merci de vous être chargés des synthèses des deux photosensibilisateurs utilisés pour la partie photothérapie dynamique. Je n'aurais assurément rien pu faire sur cette thématique sans votre aide et sans ces synthèses !

**A M. Yves CHAMPAVIER,**

*Responsable des caractérisations RMN solides, plateforme Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement (BISCEM), Laboratoire PEREINE, Université de Limoges*

Merci à vous d'avoir bien voulu procéder aux caractérisations RMN qui ont permis de déterminer la pureté de certains précurseurs, étape impérative avant son utilisation.

**A Mmes Magali GARY-BOBO, Dina AGGAD et Laure LICHON,**

*Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier*

Un très grand merci pour votre aide, pour votre expertise dans le domaine des manipulations biologiques sur cellules et sur du vivant. Heureusement, nous avons pu nous voir à plusieurs reprises avec Magali, car les échanges longue distance emmènent parfois leur lot de complexité, sur des sujets déjà très riches. Cela a pourtant permis de bien aborder toutes les questions qui se posaient sur la thématique des expériences réalisées et sur la pertinence de certains tests par rapport à d'autres. Un très grand merci à vous pour votre participation dans cette collaboration très enrichissante !

**A MM. Nicolas LORY, Sébastien FAURE, Gilles DESVERGNE,**

*Atelier Céramique, Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER), Université de Limoges*

Un très grand merci, pour votre disponibilité à chaque fois que l'on vient avec un besoin à l'atelier céramique. Très souvent, c'est en discutant qu'on trouve des façons simples de créer des outils pour notre recherche ou des moyens d'amélioration d'outils existants. Merci pour tout.

**A MM. Jean-Michel REIGUE et Patrick BOYER,**

Merci à vous deux de m'avoir parfois libéré lorsque j'étais bloqué dans le bâtiment, ou lorsque les grilles du parking étaient fermées ! Merci également pour votre sympathie, plus qu'appréciable.

**Aux collègues du département Génie Mécanique et Productique de l'IUT du Limousin,**

A toute l'équipe, un grand merci de m'avoir aussi bien intégré au sein du département. Ce fut une expérience très enrichissante que d'essayer l'enseignement, avec son lot d'anecdotes, tellement les étudiants regorgent d'ingéniosité pour faire des petites blagues. Et quel plaisir que de recroiser d'anciens étudiants optimistes, qui n'hésitent pas à venir discuter et donner quelques nouvelles !

**A mes amis doctorants, qui savent ce qu'une thèse implique,**

Nous connaissons tous tellement ce qu'une thèse implique ! Les sujets sont différents mais l'investissement personnel est sûrement le même pour tous. Je tiens à remercier bien sûr les amis doctorants qui m'ont permis d'avoir davantage de recul de façon générale, pour nos discussions enrichissantes, pour les moments de détente et les pauses café, ô combien indispensables pour être efficace sur la durée. Ces moments qui ont été importants pour moi surtout au moment de la rédaction, qui m'ont permis en quelque sorte de sortir de ma grotte... Tous mes encouragements vont également à ceux qui n'ont pas encore soutenu : les efforts finissent toujours par payer, courage !

**A mes amis, qui m'ont soutenu pendant ces années de thèse, à ceux qui ont été présents pour moi,**

Vous avez su m'apporter tant sur le plan personnel ! Pour certains, en se revoyant comme si l'on ne s'était jamais quitté. Pour d'autres, par le plaisir éprouvé de se retrouver régulièrement, avec des soirées et distractions ô combien indispensables pour ne pas saturer. Vous avez en quelque sorte pris soin de moi quand j'en avais besoin, et sans pour autant vous l'exprimer. J'espère vous le rendre de façon analogue et je chéris le fait d'avoir pu faire votre connaissance un jour. Avec toute mon amitié.

**A ma famille, pour son soutien inconditionnel,**

Je ne serais assurément pas là sans vous. Vous m'avez laissé choisir ma voie et cela n'a pas si mal marché ! Même si je l'exprime très peu, j'espère que vous savez toute la gratitude que j'ai, pour votre soutien inconditionnel en toute situation. Merci pour tout et plus encore ! Avec toute ma tendresse.



## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>







## Introduction

---

Face à l'augmentation du nombre de cas de cancers d'année en année, il est devenu impératif de trouver des méthodes de diagnostic de plus en plus rapides et fiables. En effet, un cancer diagnostiqué et traité à un stade précoce voit l'efficacité du traitement accrue et les chances de survie des patients n'en sont que meilleures. Les cancers à des stades précoces sont trop petits pour être détectables par des techniques standards (radiographie X, scanners, IRM, etc.). Cependant, lorsqu'ils sont accessibles par les voies naturelles, comme c'est le cas des cancers de la gorge, de l'estomac, du colon ou encore de la vessie, leur détection peut se faire par endoscopie, qui consiste à observer des zones à risque à l'intérieur du patient.

Lors d'une endoscopie, le caractère cancéreux des tissus biologiques est laissé à l'appréciation du praticien. Des prélèvements (biopsies) sont fréquemment réalisés, mais cela présente un risque invasif de la tumeur. De plus, un temps non négligeable (parfois plusieurs jours) est nécessaire aux spécialistes afin de les traiter et rendre leur verdict, ce qui laisse le temps à la tumeur de se développer. Si la présence d'un cancer est avérée, le patient doit alors subir un traitement thérapeutique. Or, les techniques existantes, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie, sont non-spécifiques et mutilantes, autant sur le plan physique que psychologique. Quant à d'autres techniques comme l'ablation, c'est-à-dire le retrait de l'entière ou d'une partie d'un organe, souvent employée pour des cancers à des stades avancés, elle présente des risques invasifs ou des complications post-opératoires.

**Les travaux présentés dans ce document concernent le développement d'un dispositif endoscopique innovant, dont le but est de réaliser un diagnostic précoce, rapide et hautement sélectif de tissus cancéreux, associé à une thérapie ciblée et non-invasive qui réduirait les risques opératoires et post-opératoires.** Ce dispositif est un biocapteur optique, constitué de fibres optiques sur lesquelles sont déposés des microplots de silice mésoporeuse par un procédé d'impression jet d'encre. Dans le cadre du **diagnostic**, ces microplots sont ensuite fonctionnalisés spécifiquement pour permettre l'accroche de biomolécules qui assurent la détection spécifique des récepteurs surexprimés sur les cellules tumorales. **Ces biomolécules sont préalablement marquées en fluorescence, de telle sorte que l'interaction avec les marqueurs cancéreux induit une modification de la signature en fluorescence des sondes, permettant ainsi de discriminer des tissus cancéreux par rapport à des tissus sains.** Dans le cadre de la **thérapie**, les microplots sont fonctionnalisés avec des photosensibilisateurs. **L'excitation des photosensibilisateurs par une source lumineuse adaptée induit la production d'oxygène singulet, conduisant à la mort cellulaire locale de la zone traitée**, de façon non-spécifique mais non-invasive, et qui cible principalement les cellules cancéreuses, qui ont un métabolisme très actif.



Cette sonde a été développée dans le cadre de plusieurs travaux menés à l'Institut de Recherche sur les Céramiques (IRCER, anciennement SPCTS) depuis 2001. Les premiers travaux portaient **sur le développement du procédé d'impression jet d'encre dédié à la réalisation de composants céramiques 3D**, dans le cadre de la thèse de Rémi Noguera. Ces travaux ont donné lieu à un dépôt de brevet en 2003 et à la création de la société Ceradrop en 2006. L'année suivante, la thèse de Marion Mougenot-Poncelet, soutenue en 2007, a démontré la **faisabilité de réseaux de silice mésoporeuse fonctionnalisée**, réalisés par couplage de l'impression jet d'encre et du mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation (*EISA*). Par la suite, les travaux de thèses de Brunot Fousseret, soutenus en 2010, ont porté sur la **fonctionnalisation one-pot des microplots**, consistant à incorporer des fonctions réactives directement dans le sol à imprimer. Cette étude était destinée à la capture de métaux lourds et a montré la **potentialité du procédé d'impression jet d'encre pour la réalisation de sondes de détection**. Ceci a finalement été concrétisé lors des travaux de thèse d'Olivia De Los Cobos, soutenus en 2013, et qui portaient sur la réalisation de **microplots fonctionnalisés pour du diagnostic de cancers**. Un projet régional intitulé « Theranostic » a permis de **démontrer le concept de diagnostic sur des substrats de type lamelles de verre lors de tests *in vitro***, en partenariat avec la société Dioptik, ainsi que le laboratoire Contrôle de l'Activation cellulaire, Progression Tumorale et Résistance thérapeutique (CAPTuR, anciennement HCP) de la Faculté de Pharmacie de Limoges. Les différents savoir-faire mis en jeu durant ce projet, à savoir la contribution en sciences des matériaux de la part de l'IRCER, la contribution en biologie pour le laboratoire CAPTuR et le savoir-faire dans le domaine de l'optique apporté par la société Dioptik, ont notamment abouti à un dépôt de brevet en 2013.

**Les travaux sur le diagnostic présentés dans ce document visent à fiabiliser et optimiser la détection d'un dispositif préindustriel, ainsi qu'à montrer la preuve de concept pour des sondes de type fibres optiques fonctionnalisées, lors de tests *in situ in vivo* sur modèles animaux.** Deux autres projets financés par la Région Limousin puis par la Région Nouvelle-Aquitaine ont permis de poursuivre l'étude lors d'une collaboration avec le laboratoire CAPTuR et la société Kamax Innovative System, qui a remplacé la société Dioptik :

- Le projet « **Theranostic 2** », entre décembre 2014 et décembre 2015, qui concerne la phase de transfert sur fibres optiques et la preuve de concept sur un modèle *in situ*, à savoir une membrane vascularisée d'embryon de poulet, sur laquelle une tumeur précancéreuse a été préalablement greffée.
- Le projet « **Diamed** », entre février 2017 et février 2019, qui porte quant à lui sur la preuve de concept sur modèle petit animal (souris), ainsi que sur la phase de pré-industrialisation des fibres sous forme de consommables plus faciles d'utilisation.



**L'étude sur la thérapie** a quant à elle été réalisée dans le cadre d'un projet « **ANR NanoptPDT** » entre mars 2013 et août 2016, en partenariat avec la société Kamax Innovative System, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges et l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier. Le LCSN possède effectivement une expertise dans la synthèse de plusieurs types de photosensibilisateurs, tandis que l'IBMM est capable de mener différents tests biologiques. **Les travaux sur la thérapie présentés dans ce document portent sur deux voies de fonctionnalisation des sondes, et visent à comparer leur efficacité, puis de sélectionner la meilleure afin de conduire la démonstration de concept, c'est-à-dire la validation d'une mort cellulaire *in situ* en utilisant des fibres optiques fonctionnalisées avec des photosensibilisateurs.**

Ce manuscrit sera articulé comme suit :

**La première partie présentera un état de l'art sur le cancer**, pour illustrer les différents types de cancers concernés par le dispositif développé, notamment par rapport aux divers marqueurs d'expression permettant la détection de ces cancers. Seront aussi développées quelques techniques de diagnostic et de thérapie de cancers déjà existantes ou à l'état expérimental, pour illustrer la pertinence du dispositif développé.

**La deuxième partie portera sur l'étude de la structuration des réseaux de microplots mésoporeux réalisés par impression jet d'encre.** En effet, la structure de la porosité de ces matériaux sera étudiée, car elle conditionne l'accessibilité des fonctions chimiques servant par la suite au greffage des biomolécules. L'influence de différents paramètres relatifs au procédé d'impression jet d'encre sur la structuration de la porosité sera étudiée, afin de déterminer des conditions d'impression donnant lieu à une structure de porosité contrôlée et qui maximise la fonctionnalisation ultérieure des biomolécules.

**La troisième partie portera sur l'optimisation de la fonctionnalisation des dépôts.** Plusieurs étapes sont nécessaires à la fonctionnalisation des sondes (lavage de la porosité, chimie *click*, greffage de biomolécules, marquage en fluorescence, etc.). Chacune de ces étapes sera étudiée au moyen de nombreux tests expérimentaux, en vue d'une optimisation globale conduisant à maximiser la sensibilité de détection du dispositif.

**La dernière partie portera sur l'étude des tests réalisés dans le cadre de la thérapie**, portant sur la fonctionnalisation de sondes par des photosensibilisateurs, pour permettre un traitement anti-cancéreux local de la tumeur préalablement diagnostiquée par le dispositif. Deux voies de préparation des sondes seront étudiées et comparées, en vue de sélectionner celle qui donne les meilleures performances en termes de mort cellulaire.









## Chapitre I. Contexte de l'étude : état de l'art sur les méthodes de diagnostic et de thérapie de cancers

Le cancer est une maladie qui se caractérise au niveau de l'organisme par un dysfonctionnement cellulaire. C'est un processus long et multifactoriel, durant lequel une cellule saine subit de nombreuses transformations (mutations, translocations, délétions) conduisant à une accumulation d'anomalies génétiques responsables de la transformation de la cellule normale en une cellule cancéreuse. Au cours de ce processus, cette cellule va acquérir différentes propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses, notamment une capacité de prolifération accrue lui permettant de se diviser activement et créer une lésion pré-néoplasique dite précancéreuse. Cette lésion correspond à une masse tumorale, détectable à partir d'un volume de 1 cm<sup>3</sup>, soit environ un milliard de cellules. A ce stade, la lésion est susceptible d'être accessible au dépistage et à un traitement purement local. En l'absence de traitement, les cellules cancéreuses peuvent à terme envahir des organes adjacents (invasion) ou bien coloniser progressivement des organes à distance, par l'intermédiaire des voies sanguines ou lymphatiques (dissémination). Les facteurs de risques pouvant être à l'origine de cancers sont multiples (Tableau 1).

Tableau 1 – Facteurs de risques à l'origine de cancers  
\* Adapté du programme de cancérologie des iECN en 2016 [1]

Facteurs de risques	Description
Généraux	Age, sexe, origine ethnique
Génétiques	Antécédents familiaux, syndromes prédisposants Exemples : syndrome HNPCC ( <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> ), PAF (Polypose adénomateuse familiale), anomalies génétiques (mutation gène BRCA1)
Environnementaux	Alcoolisme, tabagisme, facteurs physico-chimiques
Professionnels	Exposition à l'amiante, aux métaux lourds, aux nanoparticules, aux poussières de bois, aux produits chimiques nocifs, aux hydrocarbures, etc.
Infectieux	Virus (ex : HPV ou <i>Human Papillomavirus</i> , virus de l'hépatite C), bactéries (ex : <i>helicobacter pylori</i> et cancer de l'estomac), parasites (bilharziose et cancer de la vessie)
Médicaux	Pathologie prédisposante Exemples : RGO (Reflux gastro-œsophagien), MICI (maladies inflammatoires cryptogéniques de l'intestin)
Iatrogènes	Facteurs physico-chimiques (ex : radiations ionisantes, immunosuppresseurs)





En 2000, les cancers des voies aéro-digestives et du poumon étaient placés à la 9<sup>ème</sup> place des causes de mortalité dans le monde, et ont progressé à la 6<sup>ème</sup> place en 2016 [2]. Des données enregistrées sur l'année 2012 dans le monde, ainsi que les années 2012 et 2017 pour la France, confirment cette tendance à l'augmentation du nombre de cas de cancers et de décès par cette maladie (Tableau 2). Des prévisions pour les années 2030 font état au niveau mondial d'une augmentation des nouveaux cas de cancers de 23,6 millions par année, soit une augmentation de 68% par rapport à l'année 2012 [3], [4].

Tableau 2 – Quelques statistiques sur les nouveaux cas de cancers et décès enregistrés

	Année 2012 Dans le monde [5]	Année 2012 En France [6]	Année 2017 En France [7]
Population (Source : INSEE)	7 milliards	63,7 millions (France métropolitaine)	65 millions (France métropolitaine)
Incidence (nouveaux cas de cancers)	14,1 millions (2 ‰ de la population)	355 000 (5,6 ‰ de la population)	400 000 (6,1 ‰ de la population)
Décès enregistrés par cancer	8,2 millions (1,2 ‰ de la population)	148 000 (2,3 ‰ de la population)	153 000 (2,4 ‰ de la population)
Ratio Décès / Incidence	58 %	42 %	38 %

**Le cancer est ainsi plus présent dans les populations avec une plus forte espérance de vie [5].** La mortalité due aux cancers est néanmoins plus forte dans les populations « pauvres », du fait d'une absence ou d'une impossibilité de prise en charge des patients. Cependant, dans les populations « riches », et malgré une prise en charge de cette maladie, les chances de guérison restent cependant trop faibles (décès d'environ 40% des personnes ayant contracté un cancer).

Néanmoins, bien que le cancer touche en majorité des personnes d'un âge avancé, il arrive également que des sujets jeunes développent aussi des cancers, sous forme de tumeurs cérébrales, ou sous forme de neuroblastome [8], tumeur maligne solide extra-cérébrale la plus fréquente chez l'enfant. Il arrive que ce genre de tumeur connaisse une régression spontanée sans traitement, mais elle peut aussi connaître une progression rapide fatale [9].

**Il est alors impératif d'améliorer le diagnostic de cancer en le détectant le plus précocement possible afin d'appliquer la meilleure stratégie thérapeutique. Ceci commence par une bonne évaluation du type et du stade d'évolution de ce cancer.**



## I.1. Généralités concernant le(s) cancer(s)

Le cancer se caractérise par plusieurs stades, en fonction de son degré d'évolution, mais aussi par plusieurs types, en fonction des organes qui sont touchés. Cette multitude de formes et de comportements peut s'expliquer par de nombreux marqueurs biologiques qui jouent un rôle lors du développement du cancer, et qui vont amener la tumeur à développer des capacités que n'ont pas les cellules saines, favorisant le développement, le maintien et la prolifération des cellules cancéreuses dans l'organisme des patients.

### I.1.1. Le cancer : plusieurs stades et plusieurs types

Un cancer est caractérisé en plusieurs stades, suivant son degré d'évolution [1] :

- **Stade 1** : la tumeur est unique et de petite taille.
- **Stade 2** : la tumeur est plus volumineuse.
- **Stade 3** : la tumeur envahit les ganglions lymphatiques ou les tissus avoisinants.
- **Stade 4** : présence de métastases dans d'autres organes à distance de la tumeur d'origine.

Les cancers peuvent aussi **se décliner en plusieurs types** (Tableau 3), **et se retrouver sur un très grand nombre d'organes** (Figure 1).

Tableau 3 – Les différents types de cancers

Types de cancer	Appellations médicales	Organes et tissus touchés
<b>Cancers « Solides »</b>	<b>Carcinomes</b>	Peau, muqueuses, glandes : sein, poumons, prostate, intestin, etc.
	<b>Sarcomes</b>	Tissus conjonctifs ou de soutien : os, cartilages
<b>Cancers « Liquides »</b>	<b>Leucémies</b>	Sang et moelle osseuse
	<b>Lymphomes</b> ou cancers du système lymphatique	Ganglions, rate, foie et affectant les lymphocytes
<b>Cancers « Métastatiques » ou disséminés</b> : cancers qui ont migré par voie sanguine ou lymphatique. La nature de la tumeur est conditionnée par le point d'origine.		Os, foie, cerveau, poumons
<b>Cancers secondaires</b> : cancers consécutifs à un traitement anti-cancéreux ayant occasionné l'apparition de nouvelles cellules cancéreuses.		Variable



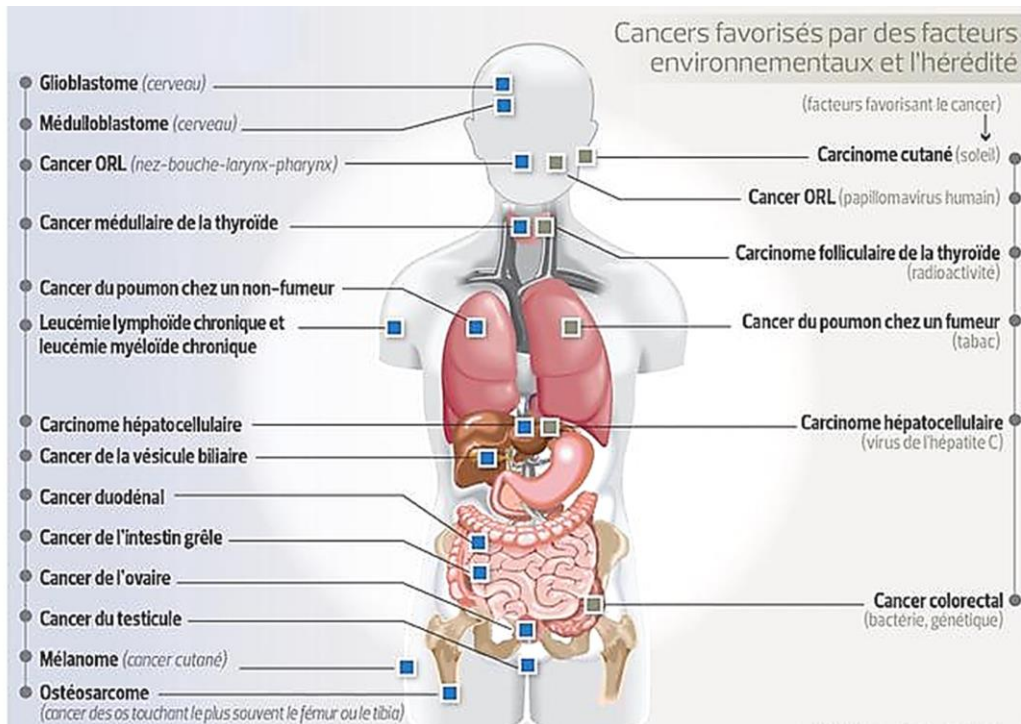
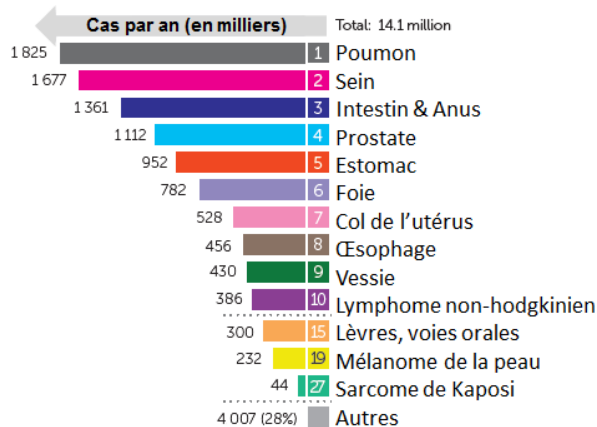


Figure 1 – Localisations des principaux types de cancers chez la femme et l'homme [10]

La multitude de facteurs de risques explique alors que certains cancers sont beaucoup plus fréquents que d'autres (Figure 2-a). Cependant, des cancers moins répandus peuvent être plus virulents et mortels, comme le cancer du pancréas (Figure 2-b).

#### a) Principaux cancers dans le monde



#### b) Principales causes de décès par cancer

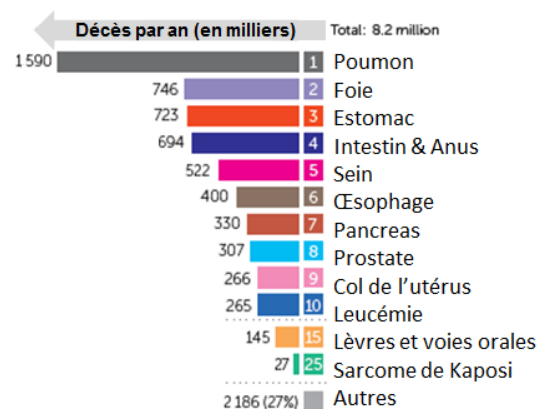


Figure 2 – Classement des principaux cancers par nombre de nouveaux cas (a) ou de décès (b) [5]

Le cancer affecte donc les fonctions biologiques d'un organisme. De nombreuses altérations génétiques sont induites au cours du processus tumorigénique. Elles portent principalement sur des récepteurs impliqués dans la signalisation tumorale. Ces récepteurs oncogéniques représentent des biomarqueurs spécifiques du cancer qui peuvent faciliter la détection des cellules tumorales.



### I.1.2. Causes biologiques : comportement cellulaire et marqueurs incriminés

Le cancer dépend d'une transformation oncogénique de certaines cellules de l'organisme qui acquièrent **des propriétés tumorigéniques spécifiques** (Figure 3) [11], [12]. Cette transformation dépend de l'acquisition d'anomalies génétiques responsables de la dérégulation des mécanismes de prolifération et de mort cellulaire qui favorisent une croissance cellulaire accrue et une résistance à l'ensemble des signaux de mort. Les changements ne touchent pas uniquement les cellules cancéreuses mais également les cellules saines, dans leur microenvironnement proche. Ainsi, ces dernières sont amenées à coopérer avec ces cellules cancéreuses, créant ainsi un « microenvironnement tumoral », en totale interaction avec la tumeur.

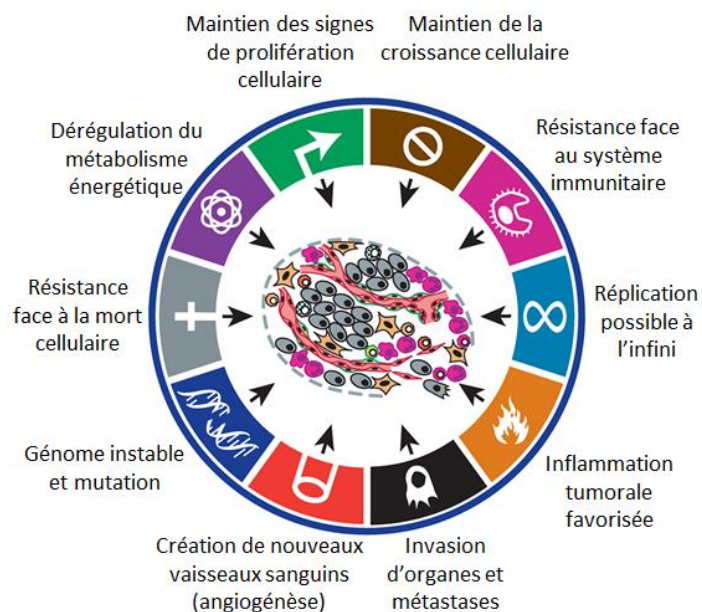


Figure 3 – Capacités cellulaires mises en jeu dans le développement d'un cancer [12]

**De nombreux mécanismes et marqueurs (gènes, protéines, récepteurs) sont impliqués dans l'apparition et le développement de tumeurs** (Annexe 1) : des mutations interviennent au niveau de l'ADN des cellules, grâce notamment à la télomérase, enzyme qui permet d'allonger l'extrémité des chromosomes et ainsi d'augmenter la vie des cellules, leur conférant des propriétés d'immortalité et de réplication à l'infini. D'autre part, l'environnement de la tumeur est approvisionné en molécules favorables à son développement : des facteurs de croissance qui favorisent la prolifération cellulaire et la croissance tumorale, des facteurs de survie qui limitent la mort cellulaire, des facteurs favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse tumorale) permettant d'alimenter la tumeur, des enzymes capables de modifier la paroi et la matrice extracellulaires, favorisant les mécanismes d'invasion et la formation de métastases qui propagent la tumeur aux autres tissus.



Tous ces facteurs et ces récepteurs représentent des marqueurs potentiels des tumeurs. Le tableau en annexe 1 dresse une liste non exhaustive des principaux marqueurs rencontrés dans les tumeurs, en y associant leur propriété et leur fonction originale.

Hanahan et Weinberg [11] ont ainsi résumé dans leurs travaux la multitude de marqueurs incriminés, qui témoigne de la complexité des interactions cellulaires, et de la difficulté de comprendre les causes et les effets en présence d'un cancer. Cette complexité est accrue du fait d'une **collaboration de certaines cellules saines avec les cellules cancéreuses**. Cette collaboration entre cellules tumorales et cellules du microenvironnement est illustrée dans l'exemple suivant qui porte sur le cancer du sein. Les cellules cancéreuses sécrètent du CSF-1 (*Colony Stimulating Factor-1*) qui est le principal facteur de croissance des macrophages. Le CSF-1 va activer les macrophages qui en retour vont sécréter de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*). L'EGF étant le principal facteur de croissance des cellules tumorales, il va activer la prolifération et la croissance tumorale.

Certains marqueurs sont présents dans tout type de cancers (Annexe 1). **Bien d'autres gènes et marqueurs sont incriminés, dans le cas de cancers précis**. Par exemple, dans le cas du **cancer de la prostate** (BRCA1, BRCA2, ATM, RAD51D, ATR) [13], **du col de l'utérus** (SCC-Ag, cytokératines TPA TPS Cyfra21-1, CEA) [14], ou du **cancer du sein** (BRCA1, BRCA2) [15]. Parfois, la variété de gènes incriminés peut expliquer la variété de syndromes différents qui sont rencontrés, comme pour le cas des **cancers colorectaux** (PMS2, MSH2, MSH6, MLH1, APC, K-RAS, Smad4, BMPR1A, b-Raf, EGFR, etc.) [16].

La détection de récepteurs en surface des cellules cancéreuses est une méthode qui présente un intérêt majeur dans le cadre de nos travaux, parmi lesquels, les récepteurs tyrosine kinase, les intégrines, les E-cadhérines, les cytokines ou autres composants de surface. **Il a par ailleurs été prouvé que le récepteur tyrosine kinase B (TrkB) était surexprimé à la surface des cellules cancéreuses** [8], [17] **et pourrait être un bon candidat pour envisager le diagnostic de tout type de cancer. L'EGFR est également un récepteur souvent utilisé pour un diagnostic générique de cancer** [18].



## I.2. Outils d'aide au diagnostic et à la thérapie de cancers

Il existe des protocoles hospitaliers standards qui permettent de mettre en évidence la présence de cancers. Cependant, le diagnostic opératoire n'est pas une vérité absolue et laisse parfois place à beaucoup d'interprétation de la part de l'observateur. Par exemple dans le cas de sarcomes, il n'est pas rare de le confondre avec des lésions bénignes, avec environ 55% d'erreur réalisée par ce diagnostic [19]. Il est alors **important de mettre en place des procédures et des outils de diagnostic qui soient les plus fiables possibles, tout en étant faciles et rapides d'utilisation pour les praticiens.**

### I.2.1. Dépistage, recherche de signes cliniques et stades de diagnostics

Le diagnostic d'un cancer peut se faire de façon fortuite, comme avec la découverte d'une masse tumorale au cours d'une endoscopie visuelle ou d'une radiographie X, mais peut aussi être systématique et de masse, comme avec le dépistage du cancer colorectal (*Hemoccult II*<sup>®</sup>, tous les 2 ans entre 50 et 74 ans), du cancer du col de l'utérus (frottis tous les 3 ans entre 25 et 65 ans) ou du cancer du sein (tous les 2 ans entre 50 et 74 ans). Du point de vue hospitalier, le diagnostic peut se faire par l'étude de signes cliniques [1] :

- **Signes de la tumeur elle-même** : douleur, masse, saignement, compression
- **Signes d'une extension ganglionnaire de défense du système immunitaire** : augmentation de volume des ganglions, en particulier les ganglions lymphatiques (adénopathie), ou compression veineuse, lymphatique, viscérale
- **Signes d'extension métastatique** : au niveau des os, des poumons, du foie, du cerveau.

Les signes cliniques permettent de conclure à un risque élevé de pathologie cancéreuse, mais qui doit néanmoins être confirmé par différentes approches. Des examens médicaux sont effectués, comme des **imageries médicales, des endoscopies ou des tests biologiques**, en faveur d'un **diagnostic positif**, puis un **diagnostic de certitude**, par le biais d'une **biopsie** (analyse de tissus par des anatomopathologistes) ou **pièce d'exérèse** (retrait et analyse d'une partie jugée dangereuse). Ces tests peuvent être parfois très longs, en fonction de délais propres à la prise en charge (délai d'attente avant examen) et en fonction de délais incompressibles (délais d'interprétation des résultats par les spécialistes).

Une fois le diagnostic avéré, le patient doit subir un **bilan d'extension**, afin d'obtenir des informations sur le cancer, comme des scanners du cerveau, de l'abdomen, des tests biologiques, ainsi qu'un **bilan pré-thérapeutique** pour « gagner du temps » (bilans préopératoire, pré-chimiothérapeutique, pré-radiothérapeutique, etc.). **Tous ces outils restent nécessaires à la prise en charge du patient.**



## I.2.2. Techniques standards hospitalières de diagnostic de cancers

Il existe plusieurs méthodes de mises en évidence de cellules cancéreuses [1] :

- **La cytologie**, qui s'attache à observer les cellules en dehors de leur microenvironnement et indépendamment de leur architecture tissulaire. Cette technique est rapide de mise en œuvre et permet de guider le diagnostic, bien que ce soit insuffisant pour l'orienter complètement (diagnostic positif, mais pas de certitude).
- **L'histologie, en réalisant des biopsies ou exérèses**, qui figent les tissus et permettent d'observer les cellules en coupe, avec une coloration du noyau et du cytoplasme des cellules pour mieux les étudier.
- **L'immunohistochimie**, qui consiste à rechercher la présence d'une protéine en particulier, de façon indirecte, en utilisant un anticorps spécifique de la protéine recherchée, qui est marqué en fluorescence puis révélé en microscopie optique.
- **L'hybridation *in situ***, dont le but est d'identifier une séquence d'acide nucléique (ADN ou ARN) particulière, en utilisant une sonde nucléique avec fluorochrome (exemple : gène HER2 pour certains cancers du sein, quand l'immunohistochimie ne permet pas de conclure).

Les biopsies ou pièces d'exérèse sont des tests favorisant un diagnostic de certitude, qui sont donc obligatoires, mais leur préparation peut prendre plusieurs jours. Il existe aussi des examens extemporanés, c'est-à-dire réalisés sous 30 minutes lors d'une opération chirurgicale, afin notamment de délimiter les pourtours d'une tumeur, mais qui peuvent donner des faux négatifs. Aussi, certains prélèvements, lors de l'opération chirurgicale, peuvent être non contributifs. Pour limiter cela, il faut alors privilégier des prélèvements de taille suffisante, réaliser plusieurs biopsies, et **faire un repérage préliminaire par imagerie, qui doit servir à discriminer les tissus d'architecture suspecte, par rapport au tissu sain.**

Par ailleurs, dans le cas de cancers colorectaux, il arrive qu'apparaissent des polypes bénins, qui peuvent être retirés par sécurité (risque de transformation en tumeurs). Aussi, dans le cas d'un dépistage positif (lors du dépistage de masse *Hemoccult II*<sup>®</sup>), un patient doit alors subir une endoscopie de contrôle. De plus, si l'endoscopie révèle la présence de nombreux polypes, le dépistage par *Hemoccult II*<sup>®</sup> n'est alors plus adéquat et le patient doit alors subir des endoscopies de contrôles complètes à 3 ans, puis tous les 5 ans à vie. Il en va de même pour les cancers du col de l'utérus, dans le cas d'un frottis anormal ou dépistage positif du papillomavirus, la patiente doit alors subir des endoscopies du col de l'utérus et biopsies afin de vérifier la présence de lésions précancéreuses ou de dysplasies. **L'endoscopie de surveillance s'avère ainsi obligatoire dans de nombreux cas de cancers.**



### I.2.2.1. L'endoscopie : quelques exemples de cas cliniques

Lorsqu'il y a forte suspicion de cas de cancers, et pour des stades avancés, des scanners ou radiographies suffisent à montrer la présence de tumeurs (Figure 4). Dans d'autres cas, et pour des stades moins avancés, les tumeurs sont moins visibles, et l'endoscopie s'avère alors plus pertinente pour détecter des tumeurs précoces (Figure 5).

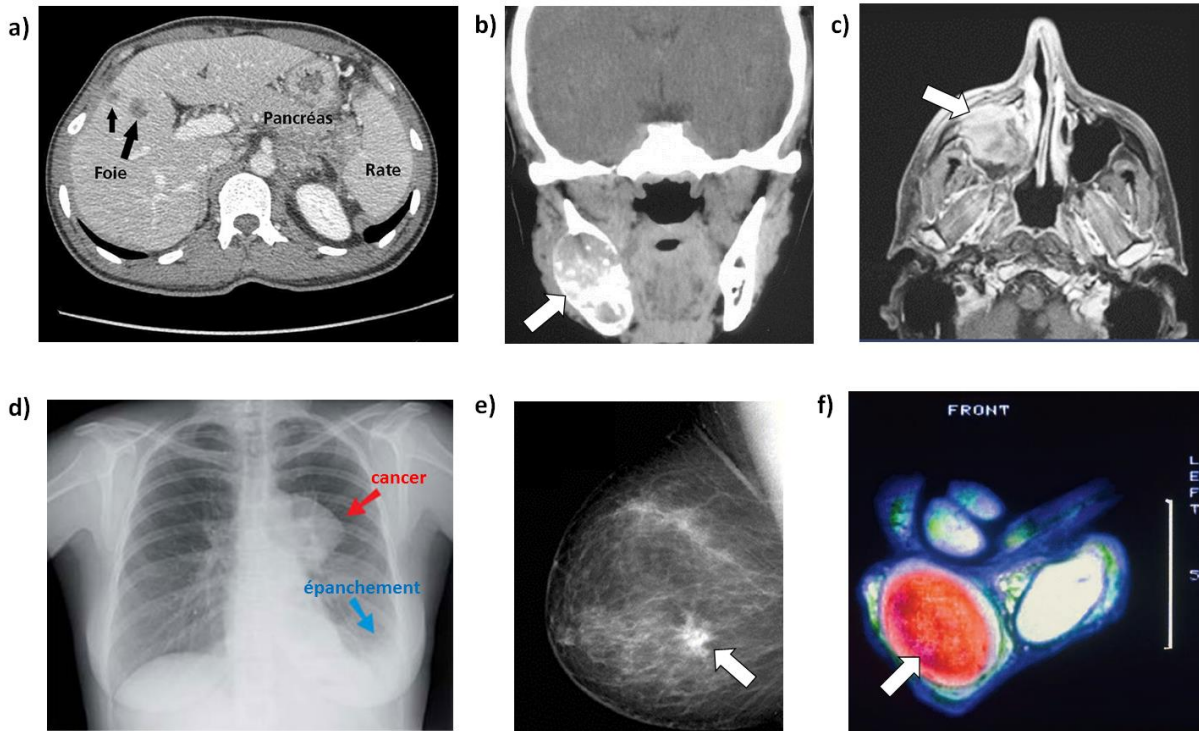


Figure 4 – Exemples de tumeurs mises en évidence par imagerie : métastases du foie [20] (a), sarcome de la mâchoire [21] (b), cancer du sinus droit [22] (c), cancer du poumon [23] (d), cancer du sein [24] (e), cancer du testicule [25] (f)

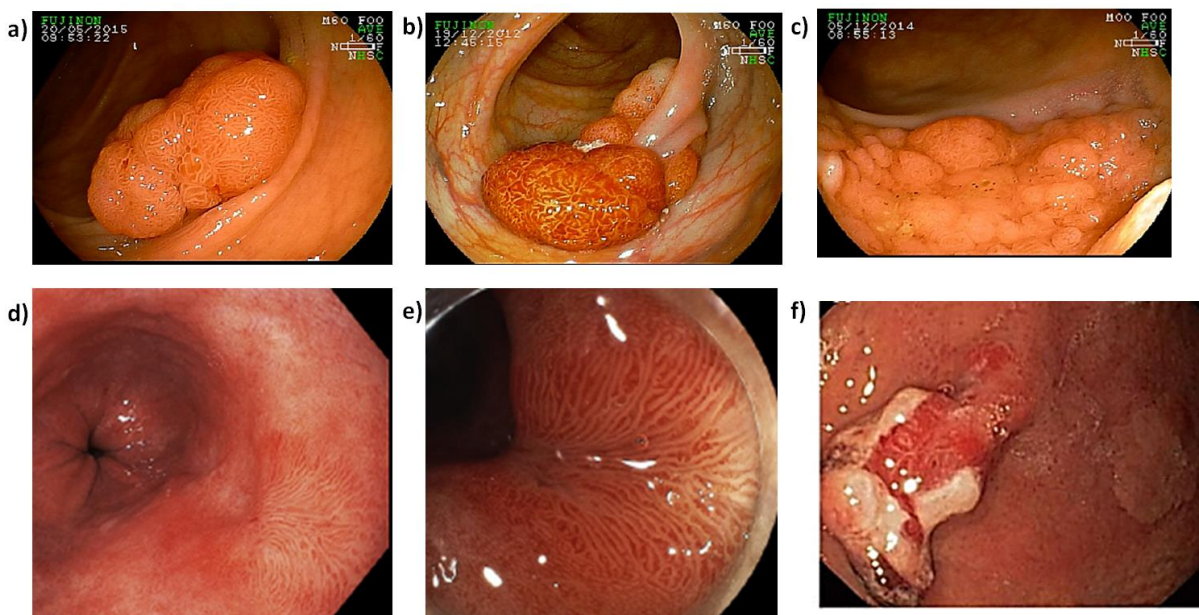


Figure 5 – Colon avec polypes adénomateux [26] : sessile (a), pédonculeux (b) et tumeur étendue latéralement (c) ; Œsophage de Barrett et lésions néoplasiques [27] (d)(e) ; Estomac et polype [28] (f)





### I.2.2.2. Avancées technologiques dans le domaine de l'endoscopie

Des auteurs japonais ont mentionné que **l'utilisation de biopsies doit être réalisée avec précaution**, car celles-ci peuvent causer des fibroses (formation de tissus supplémentaires) dans les zones où sont effectuées les biopsies [29]. En particulier, cela pourrait créer un développement prématuré si la zone est tumorale. Prenant en compte ces considérations, il a alors été utile de **développer toujours de meilleures techniques afin de pouvoir différencier de façon fiable les cancers des tumeurs bénignes**.

Dans l'exemple des cancers colorectaux, les polypes adénomateux trouvés lors de certaines explorations sont des tumeurs bénignes, mais qui peuvent évoluer vers un cancer. De nouvelles émergences dans le domaine de l'endoscopie optique permettent de mieux contraster l'observation et discriminer plus précisément et avec fiabilité les cancers :

- **L'endoscopie standard est faite en lumière blanche (WLI).**
- **La chromoendoscopie**, où un colorant est dispersé lors de l'exploration dans les voies digestives (pour être ensuite éliminé naturellement), afin d'imprégner les tissus en fonction des propriétés du colorant utilisé [26], [30]. Par exemple, le bleu de méthylène met en évidence les anomalies au niveau du petit intestin et du colon (Figure 6-b).
- **L'imagerie à bande spectrale étroite (NBI)**, qui consiste à utiliser l'absorption spécifique des tissus en fonction de leur nature. Elle permet par exemple de mieux éclairer le sang des vaisseaux sanguins (avec une lumière centrée à 415 nm), afin de mieux révéler les lésions de type polypes pré-cancéreux (Figure 6-c & d) [27], [31]. Cette technologie est notamment proposée par la société *Olympus*<sup>®</sup>.

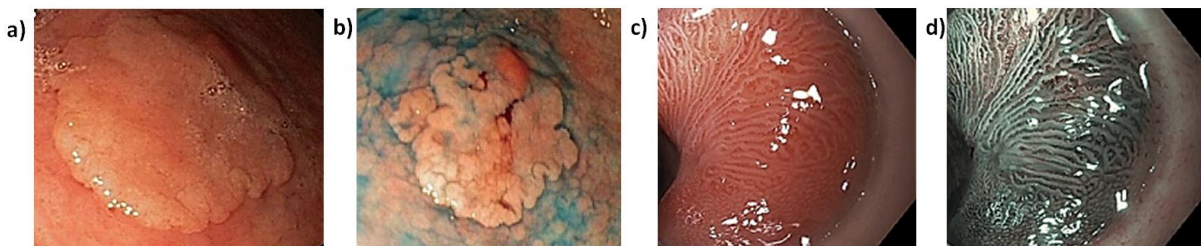


Figure 6 – Images d'un polype de l'estomac en lumière blanche (a) ou avec chromoendoscopie avec bleu de méthylène (b) ; images d'un œsophage de Barrett en lumière blanche (c) ou avec NBI (d)

- **La technologie Flexible spectral Imaging Colour Enhancement (FICE)**, qui est une chromoendoscopie virtuelle, qui reconstitue l'image avec un filtre virtuel de longueurs d'ondes (qui est un filtre optique physique dans le cas du NBI) [32], [33]. D'autres modes, fonctionnant sur le même principe sont **l'imagerie en lumière bleue (BLI)** [32] qui révèle les capillaires sanguins, sur le même principe d'absorption que pour la chromoendoscopie. Un mode spécial appelé **Linked-Color Imaging (LCI)** [32] utilise



l'imagerie en lumière blanche (WLI) et bleue (BLI), avec un traitement de données pour séparer la contribution dans le rouge. Ces technologies sont notamment disponibles auprès du groupe Fujifilm avec les équipements *Eluxeo*<sup>TM</sup> et *LASEREO*.

- **La technologie i-SCAN**, qui utilise aussi un traitement de données d'images, selon trois modes d'amélioration : de surface, de contraste et de teinte. L'utilisation des modes permet de mieux apprécier la nature des tissus observés [33]. Cette technologie est proposée par Pentax Medical.
- **L'endomicroscopie confocale (CLE)**, qui utilise la fluorescence intrinsèque des tissus ou un agent fluorescent appliqué par voie intraveineuse. Deux systèmes sont disponibles : un système intégré à l'endoscope (eCLE) comme le dispositif *Pentax*<sup>®</sup> ou bien un système sous forme d'une sonde (pCLE) comme le dispositif Cellvizio de la société Mauna Kea Technologies.
- **L'endocytoscopie**, utilise le même principe que la microscopie optique, à savoir d'utiliser des grossissements de x450 à x1000. Un des distributeurs de ces équipements est *Olympus*<sup>®</sup>.

Il est par la suite intéressant de comparer les performances de ces différentes techniques endoscopiques pour savoir s'il y en a une qui s'avère plus pertinente que les autres.

### **I.2.2.3. Comparaison des techniques endoscopiques en termes de précision**

La chromoendoscopie a montré de bons résultats concernant l'efficacité à diagnostiquer les **cancers colorectaux (CCR)** avec l'utilisation d'un colorant violet [34]. La détection des **adénomes colorectaux** n'est pas nécessairement meilleure en lumière bleue (BLI) qu'en lumière blanche (WLI), de plus, l'utilisation de la lumière bleue prend davantage de temps pour les praticiens [35]. La détection des néoplasies colorectales a montré des résultats équivalents en termes de précision entre les systèmes BLI et NBI (respectivement 74.0% et 77.8% de précision) [36]. Une autre étude présente 89.4% de précision avec le système FICE [34]. Néanmoins, il semble qu'aucune de ces techniques n'ait vraiment permis de mieux diagnostiquer les adénomes colorectaux [37].

Pour des **cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS)**, la technologie CLE donne par ailleurs de bons résultats [38], de même pour des **cancers des voies gynécologiques** [39].

L'utilisation des modes LCI et BLI montrent une meilleure reconnaissance des **cancers gastriques**, par rapport à l'endoscopie en lumière blanche, avec notamment une meilleure reconnaissance avec le mode LCI par rapport au mode BLI [32]. Une étude comparant les modes FICE et NBI dans la détections de **polypes des voies gastriques** a montré



sensiblement une meilleure efficacité du mode FICE par rapport au mode NBI, bien que le mode NBI soit jugé plus fiable (valeur prédictive négative plus forte pour NBI) [40]. Pour le diagnostic des métaplasies intestinales au niveau de la muqueuse gastrique, le mode FICE présente une sensibilité faible (60%) mais une bonne spécificité (87%) [41]. Concernant l'efficacité du mode i-SCAN, une autre étude comparative avec l'endoscopie en lumière blanche n'a pas permis de montrer la supériorité du mode i-SCAN [42]. L'endocytoscopie donne quant à elle de biens meilleurs résultats, avec une sensibilité de 78.4%, une spécificité de 93.3% et une précision de 87.3% [43].

Pour les cas **d'œsophage de Barrett**, l'endocytoscopie s'est avérée très décevante, avec beaucoup de données inexploitable [44]. Les techniques de chromoendoscopie, du NBI et d'endomicroscopie confocale (pCLE) ont été comparées dans une revue concernant les **cancers superficiels de l'œsophage** [45]. Ces travaux révèlent dans ce cas que la chromoendoscopie avec l'indigo carmin (70-83% de sensibilité) est meilleure qu'en lumière blanche (40-64% de sensibilité). L'endomicroscopie confocale (68-96% de sensibilité) est aussi meilleure que la chromoendoscopie, mais moins bonne que l'utilisation du NBI (90-100% de sensibilité). Cependant, le NBI, la pCLE et la chromoendoscopie sont moins spécifiques que l'endoscopie en lumière blanche, ce qui montre la présence de faux positifs.

Toujours pour **les cancers de l'œsophage**, il apparaît que la technologie pCLE est non seulement limitée par sa faible sensibilité, mais elle est en plus coûteuse du point de vue de l'équipement et du coût des agents de contrastes requis [27]. D'autre part, la technologie NBI, après avoir suscité beaucoup d'enthousiame, n'a pas montré de progrès dans la détection de néoplasies de l'œsophage [46].

**En conclusion, il est possible de dire que les différentes avancées technologiques ont permis de mieux contraster les images obtenues par les praticiens lors des observations afin de les guider dans leur prise de décision. Cependant, les apports des différentes techniques ne permettent pas d'avoir une technique unique d'endoscopie qui permette de détecter les cancers de différents types et pour différentes localisations.**

#### **I.2.2.4. Autres techniques de diagnostics émergentes**

**L'endoscopie par ultrasons (EUS)** est une méthode de diagnostic qui a fait ses preuves concernant la détection des cancers colorectaux, avec une forte précision (89%) [26]. **Des biocapteurs utilisant des microondes** permettent aussi de faire de la détection de cellules cancéreuses (testé sur des cellules de cancers colorectaux), bien que la détection ne soit pas nécessairement spécifique dans ce cas [47]. En effet, le biocapteur est un circuit



électronique permettant de mesurer une différence de fréquence de résonance et d'intensité de résonance qui semblent néanmoins propres à chaque type de cellules [48].

Des **techniques de spectroscopie** permettent de mettre en évidence la présence de cancers. Par exemple, pour des cas de **cancers du sein**, une **aiguille fibrée** est utilisée afin de récupérer la fluorescence intrinsèque de tissus [49], [50]. L'aiguille est insérée par guidage échographique à l'intérieur d'un tissu potentiellement cancéreux. La technique permet alors de voir si le nodule est bénin ou malin, ces deux types de nodules ayant une réponse différente en fluorescence. D'autres types de dispositifs utilisant la spectroscopie de fluorescence sont par ailleurs déjà commercialisés, comme le *Fluobeam*<sup>®</sup> de la société Fluoptics [51]. L'équipement consiste en une caméra de fluorescence qui n'est cependant pas utilisée pour de l'endoscopie, le dispositif étant trop volumineux. Il sert à récupérer la signature en fluorescence, par l'utilisation de marqueurs fluorescents peu coûteux, au cours d'une chirurgie.

**La spectroscopie infrarouge** est également utilisée *ex vivo* sur des prélèvements réalisés pour des biopsies [52], et qui donne de nombreuses informations sur la nature des tissus, comme la quantification sur les lipides, les protéines, les sucres, etc. La méthode consiste à cartographier le prélèvement par infrarouge, avec une résolution spatiale de 10 µm. Il y a alors un très grand nombre de spectres collectés, ce qui permet d'utiliser des méthodes de traitement de données statistiques de chimométrie. Par le biais d'une banque de données de spectres caractéristiques d'un grand nombre de marqueurs, il serait alors possible de traiter l'image d'un prélèvement en moins de 10 secondes. **La spectroscopie Raman** met quant à elle en évidence les **tumeurs cérébrales** [53] et permet au praticien de maximiser le volume à réséquer, tout en minimisant le volume de tissu sain à enlever. Cette méthode a fait ses preuves, en permettant de distinguer notamment la nécrose au sein de tumeurs, mais aussi de différencier la tumeur des tissus sains, avec une sensibilité de 84%, une spécificité de 89% et une précision de 87%. La société ODS médical commercialise ce type de technologie.

Enfin, la dernière avancée concerne l'utilisation de **nanoparticules d'or**, qui sont sujettes à la résonance plasmonique de surface, lorsqu'elles sont soumises à des sollicitations électromagnétiques [54]. Si elles sont marquées par des anticorps de reconnaissance, l'intensité du signal de résonance diminue, jusqu'à être complètement atténué lors de la reconnaissance des marqueurs d'intérêts. Des **nanocomposites carbone-or**, permettant de fixer jusqu'à 3 anticorps de reconnaissance, et ont été utilisés pour la détection des marqueurs cancéreux correspondants (CEA, PSA, AFP) [55]. Des **nanoparticules de silice**, fonctionnalisées en surface par deux types d'anticorps marqués en fluorescence, ont aussi été utilisées dans le cadre de la détection ciblée de marqueurs surexprimés dans le cas de cancers du sein (MUC1 et HER2) [56].



### I.2.2.5. Autres types de biocapteurs et élaboration

Depuis les années 70, le concept de biocapteur connaît une véritable explosion. Parmi les exemples les plus courants de biocapteurs commercialisés, il est notamment possible de citer les systèmes de mesure de la glycémie (comme *Accu-Check*<sup>®</sup>), les tests de grossesse (*Clearblue*<sup>®</sup>) ou plus récemment les tests de dépistage du VIH (*autotest VIH*<sup>®</sup>). La multitude de biocapteurs existants se différencie en plusieurs types :

- De type **électrochimique** [57]–[59], basé sur l’immobilisation en surface de la sonde d’un biorécepteur générant un signal électrique lors de la détection de l’analyte.
- De type **piézoélectrique** [60] **ou acoustique** [61], pour lesquels un biorécepteur est immobilisé en surface de la sonde. Lors de la détection de l’analyte d’intérêt, un gain de masse apparaît, résultant en un changement de la fréquence de résonance.
- De type **thermique** [62], qui permet de mesurer les changements d’enthalpie lors de la réaction de détection de l’analyte par le biorécepteur.
- De type **optique**, par la mesure d’un signal de **fluorescence** [63], **d’absorbance** [64], **de chimiluminescence** [65], **d’onde évanescente ou de résonance plasmonique de surface** [66].

Les biocapteurs optiques présentent le plus d’intérêt. En effet, un biocapteur se doit d’être **peu coûteux** (car majoritairement jetables dans le cas de diagnostics hospitaliers), **rapide et facile d’utilisation**, tout en pouvant **être produit en d’importantes quantités**. Il est par ailleurs apparu intéressant d’utiliser des méthodes de dépôt de matériaux sol-gel pour la réalisation de biocapteurs, notamment des gels de silice qui présentent de très bonnes propriétés optiques [67].

**La fonctionnalisation biologique** de la sonde peut intervenir d’une multitude de manières différentes (Figure 7) [68], permettant notamment l’ancrage de biorécepteurs comme des **enzymes** [69], **des antigènes ou des anticorps** [70], **ou encore des bactéries** [71] **ou des cellules** [72]. Il est même possible de fonctionnaliser la sonde en vue de réaliser un biocapteur ADN [73], [74].

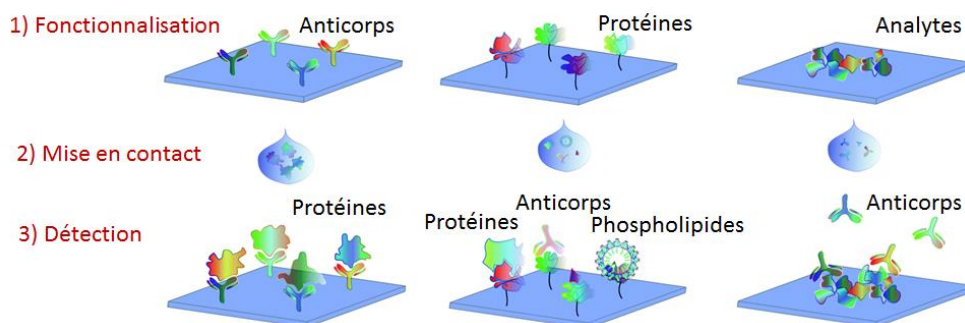


Figure 7 – Exemples de fonctionnalisations biologiques & reconnaissance [68]



Par rapport à la thématique de diagnostic de cancers, comme pour d'autres thématiques biologiques, il était par ailleurs nécessaire de pouvoir développer des biocapteurs toujours plus petits, comme c'est le cas pour les systèmes microfluidiques développés pour la détection de cancers [75]. En lien avec les techniques endoscopiques, la technologie a évolué pour permettre **l'utilisation de fibres optiques**, permettant une détection optique très sensible, et dont la fonctionnalisation intervient grâce à différentes techniques comme la photolithographie, la nano-impression, l'usinage par faisceau d'ions, l'ablation laser, le dépôt de films minces, etc. [76].

Toutes ces découvertes ont permis d'aboutir à l'élaboration de systèmes pour par exemple la **détection de nanoparticules et de cellules** [77], des **sondes de pH utilisant des chromophores présents en surface de la sonde** [78], [79] ou bien des **sondes opto-électriques** [80], similaires à la technique de chromoendoscopie, et qui utilisent des anticorps de reconnaissance marqués en fluorescence pour pouvoir ensuite les observer avec la sonde à l'intérieur du corps du patient.

#### **I.2.2.6. Méthode de détection par effet FRET et exemples de cas expérimentaux**

D'autres types de biocapteurs reposent sur l'utilisation d'anticorps, immobilisés en surface de la fibre optique par le biais de protéines, la protéine et l'anticorps étant tous deux marqués en fluorescence par des fluorochromes. Lors de la détection de la biomolécule d'intérêt, la réponse en fluorescence peut être suivie (sous certaines conditions relatives au couple de fluorochromes utilisé), par un phénomène physique de transfert d'énergie entre les fluorochromes utilisés. Il s'agit du **transfert d'énergie par résonance de type Förster ou effet FRET**.

L'effet FRET (Figure 12), a été découvert par Theodor Förster en 1946 [81] et les conditions d'obtention de cet effet ont été rappelées dans les travaux de Lubert Stryer [82] :

- A. **Le spectre d'émission du fluorochrome donneur doit recouvrir une partie du spectre d'absorption du fluorochrome accepteur.** Ceci est quantifié par l'intégrale  $J = \int f_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $f_D$  l'intensité émise par le donneur et  $\epsilon_A$  le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.
- B. **La distance séparant les deux fluorochromes doit être inférieure à 1,8 fois le rayon de Förster  $R_0$** , qui est le rayon pour lequel l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%.
- C. **L'orientation des dipôles a une importance sur l'efficacité du transfert d'énergie** (pas d'effet FRET si les dipôles sont orientés orthogonalement, et FRET maximal si les dipôles sont orientés parallèlement).



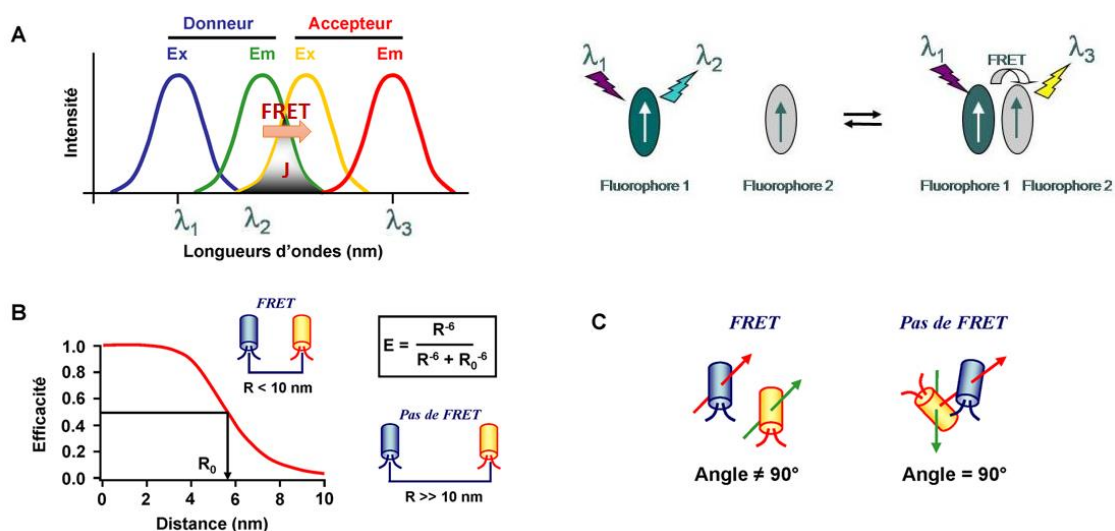


Figure 8 – Principe de la détection par effet FRET et conditions d'obtention

L'effet FRET peut être mis en évidence de trois manières différentes : soit en observant la **diminution de fluorescence du donneur** [83], soit en observant **l'augmentation de celle de l'accepteur** [84], soit, de façon équivalente, en observant la **variation du ratio des intensités d'émission de l'accepteur sur celle du donneur ou inversement** [85]. Il est aussi possible d'utiliser le **photoblanchiment**, qui est une méthode indirecte consistant à **éteindre la fluorescence d'un des fluorochromes et d'observer la variation d'intensité de l'autre fluorochrome après extinction du premier** [86], [87].

Les applications de l'effet FRET en biologie sont multiples. Ce phénomène permet par exemple, lorsqu'il est utilisé sous forme d'une sonde fonctionnalisée avec un dérivé de rhodamine, de **mettre en évidence la présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$**  [88], nocifs et parfois responsables de maladies dégénératives (Alzheimer, Parkinson, etc.) [89], ou encore de **mettre en évidence d'autres métaux trivalents tels que  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Cr}^{3+}$**  [90], qui interviennent dans le métabolisme cellulaire [91].

Sous forme de nanoparticules formées par auto-assemblage micellaire et chargées avec un fluorochrome, l'effet FRET permet de **déduire la présence de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$**  [92], élément qui, en grande concentration, occasionne des maladies comme des cancers ou des maladies dégénératives comme Alzheimer ou Parkinson [93]. **Des nanoparticules à base de lanthanides permettent aussi d'induire un effet FRET lors de la reconnaissance de marqueurs cancéreux, que ce soit sur support ou en voie liquide** (Figure 9-a) [94], ou aussi pour en **déduire l'activité enzymatique au sein de cellules cancéreuses, par un suivi de la diminution du signal FRET** (Figure 9-b) [95]. L'effet FRET est aussi utilisé sur d'autres types de marqueurs, notamment concernant la **détection de protéines membranaires impliquées dans la croissance de cellules cancéreuses**, comme les protéines ERK [96].



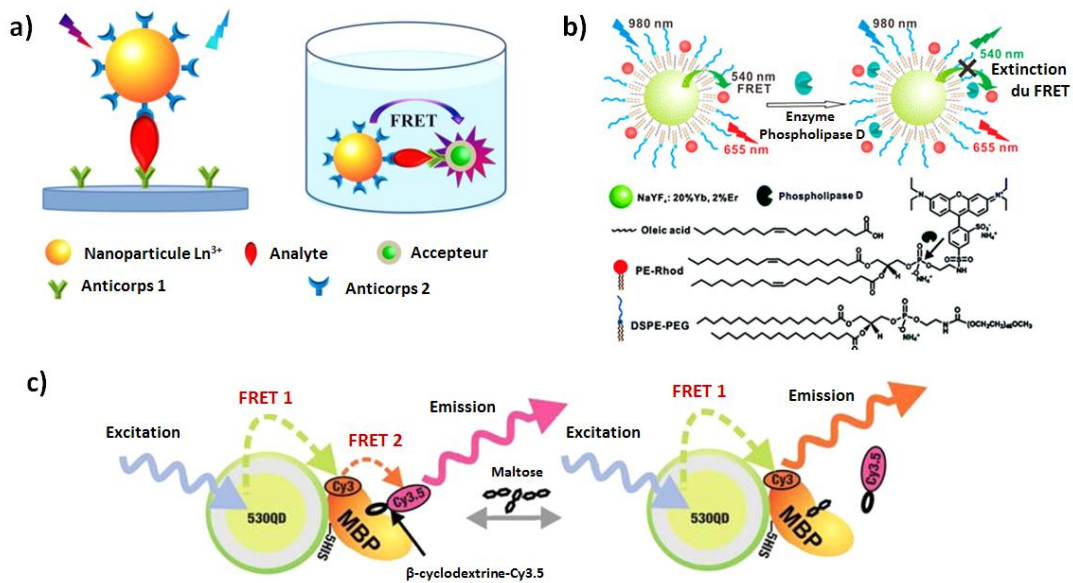


Figure 9 – Utilisation de l'effet FRET avec des nanoparticules de lanthanides pour : la détection d'analyte [94] (a) ou la quantification de l'activité enzymatique de cellule [95] (b). Double utilisation de l'effet FRET avec des QDs [97] (c)

De nouveaux développements relatifs aux *quantum dots* (QDs) permettent de les utiliser suivant de **multiples assemblages pouvant être complexes** [98], **qui permettent parfois de s'affranchir d'une source de sollicitation extérieure** [99]. L'effet FRET avec des QDs permet aussi de faire de **l'imagerie de tumeurs** [100], [101], l'effet FRET n'étant déclenché que lorsque les QDs pénètrent à l'intérieur de cellules tumorales et permettant aussi de diagnostiquer uniquement un certain type de cancer, en fonction des marqueurs utilisés, comme pour le cas des cancers de la prostate avec l'antigène PSA [102]. Le recours à un **double effet FRET permet également d'avoir un système encore plus sélectif** (Figure 9-c) [99].

### I.2.2.7. Biocapteurs existants et fonctionnant sur le principe d'effet FRET

Il existe actuellement des **biocapteurs développés à partir de silice mésoporeuse sous forme de microplots** (Figure 10-A), bien que les travaux de Nampi *et al.* [103] montrent des dépôts massifs et peu réguliers. Ces microplots sont fonctionnalisés chimiquement par de nombreuses étapes en vue d'immobiliser des biomolécules marquées en fluorescence, qui permettent de détecter la présence de troponine cardiaque I (cTnI), utile dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde par effet FRET [104].

**Les sondes composant un biocapteur peuvent être fonctionnalisées sur le pourtour du cœur de la fibre ou bien à son extrémité.** Les travaux de Polley *et al.* [105] décrivent notamment une sonde fonctionnalisée sur son pourtour (Figure 10-B), afin d'immobiliser un colorant fluorescent (le chlorure de dansyle) qui **permet la détection d'ADN** marqué également en fluorescence (par du bromure d'éthidium).





Les travaux de Ko *et al.* [106] présentent quant à eux une fibre sous forme de pointe, fonctionnalisée à son extrémité par une protéine (G) servant d'accroche à une autre protéine (immunoglobuline de chèvre, IgG), toutes deux marquées par des fluorochromes appropriés (Figure 10-C). Cette sonde peut alors être utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la détection *in situ* de salmonelle (*Salmonella*). Le principe repose sur la reconnaissance de la salmonelle par l'IgG, résultant en un changement de conformation occasionnant le transfert d'énergie de FRET, par diminution de la distance entre les fluorochromes  $R < R_0$ .

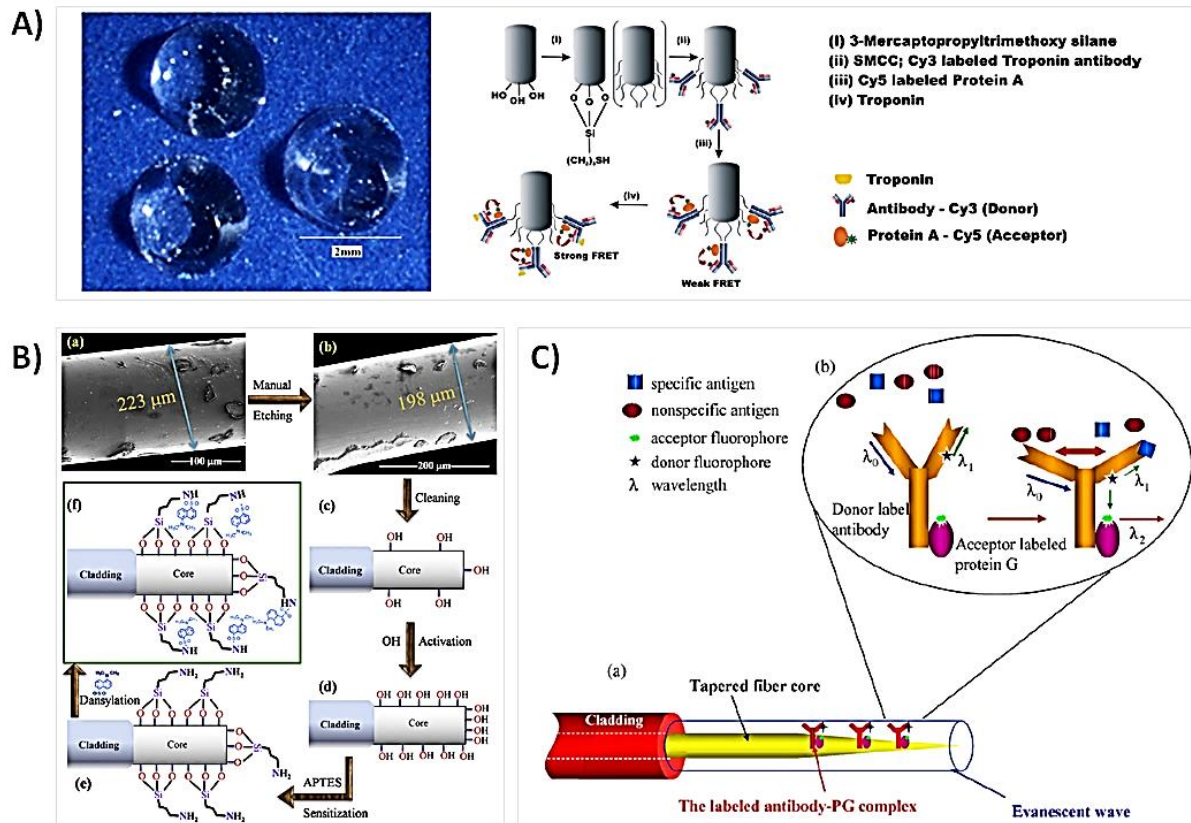


Figure 10 – Détection de biomolécules par effet FRET : utilisation de microplots de silice mésoporeuse par voie sol-gel (A), ou bien sous forme d'une fibre fonctionnalisée sur son pourtour (B) ou encore sous forme d'une fibre sous forme de pointe, fonctionnalisée à son extrémité (C)

Une sonde fibrée fonctionnalisée sur son pourtour présenterait l'avantage d'avoir une plus grande surface fonctionnalisée, par rapport à une sonde fonctionnalisée à son extrémité. Néanmoins, une fibre fonctionnalisée à son extrémité présenterait aussi l'avantage de mieux transmettre le signal de fluorescence réémis, par rapport à l'ouverture numérique de la fibre concernée. Dans leur fonctionnement, et quel que soit le type de fonctionnalisation, **ces sondes sont reliées à un spectrofluorimètre**, composé d'une source, de filtres, de lentilles de focalisation et de lentilles dichroïques [104]–[106]. Ce spectrofluorimètre permet notamment la stimulation lumineuse du fluorochrome donneur, et permet aussi d'analyser le signal de fluorescence réémis et de conclure sur la présence ou non de signal de FRET.



### I.2.3. Etat de l'art sur les différentes techniques de thérapie de cancers

En milieu hospitalier, les chances de réussite d'une thérapie sont influencées par les **facteurs liés au cancer** (type de cancer, stade évolutif, taille de la tumeur, extension ganglionnaire, extension métastatique, complications), mais aussi à des **facteurs liés au patient** (état général, état nutritionnel, âge, statut alcoolo-tabagique, statut immunodéprimé, par le VIH ou le diabète, etc.) ainsi que des **facteurs liés au traitement** (prise en charge précoce, sensibilité au traitement). **La thérapie à utiliser doit être indiquée dans le cas du patient et doit lui permettre d'obtenir les meilleurs pronostics possibles.**

Pour cela, tout patient diagnostiqué doit bénéficier d'une **réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP)** qui réunit des chirurgiens de différentes spécialités, qui pourront présenter au patient un plan thérapeutique qui lui sera adapté, et afin de constituer son **programme personnalisé de soins (PPS)**.

#### **I.2.3.1. Techniques hospitalières existantes pour la thérapie de cancers**

Il existe de nombreux traitements anti-cancéreux, parmi lesquels la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, des thérapies ciblées, des traitements par hormonothérapie ou immunothérapie (Annexe 2). Il est à noter qu'au cours de l'année 2018, un prix Nobel de médecine a récompensé les travaux des chercheurs James Allison [107] et Tsukuru Honjo [108] pour leurs travaux sur l'immunothérapie en tant que moyen de lutte contre le cancer.

Ces divers traitements reposent sur des principes différents et leur application doit être adaptée au cas de cancer en présence. En général, le traitement est spécifique de la zone atteinte, à savoir [1] :

- **Pour un cancer localisé précoce**, il s'agira de traitements locaux comme la chirurgie en premier lieu pour enlever la plus grosse partie de la tumeur, accompagné ou non d'une radiothérapie. Parfois, un traitement complémentaire peut intervenir avant ou après la chirurgie, comme un traitement d'hormonothérapie ou de chimiothérapie.
- **Pour un cancer local avancé**, traité de façon analogue à un cancer localisé, ou bien si la chirurgie n'est pas possible, le traitement sera alors uniquement basé sur un mélange de radiothérapie et chimiothérapie.
- **Pour un cancer métastatique étendu**, la chirurgie et la radiothérapie sont inutiles, ou servent parfois uniquement à limiter l'étendue du cancer, sans toutefois résoudre complètement le problème. Dans ce cas, le traitement repose principalement sur la chimiothérapie qui agit ainsi sur l'ensemble des zones atteintes.

D'autres techniques de thérapie ont été développées depuis, basées pour certaines sur des innovations scientifiques et techniques.



### I.2.3.2. Des techniques de thérapie ciblée et de nouveaux outils d'aide à la thérapie

De nouvelles techniques thérapeutiques ont vu le jour depuis 2010. Parmi celles-ci, le ciblage thérapeutique a été permis par l'utilisation de **nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNs) fonctionnalisées** pouvant cibler certains récepteurs surexprimés sur les cellules cancéreuses, comme le récepteur MMP9 dans le cas de cancers des poumons [109]. D'autres cas de cancers sont concernés par le recours aux nanoparticules de silice, comme le rétinoblastome. Ces nanoparticules peuvent en plus être chargées, comme par exemple avec un générateur photoacide permettant d'induire un saut de pH par stimulation lumineuse, après incorporation par les cellules cancéreuses [110]. Des anticancéreux comme la doxorubicin (DOX) peuvent aussi être incorporés dans les nanoparticules de silice mésoporeuses afin de réaliser ce ciblage thérapeutique [111].

La **photothérapie dynamique (PDT)** est une méthode de thérapie par la lumière connue depuis l'antiquité (Egypte ancienne, Inde, Chine) et utilisée pour guérir certaines maladies, mais l'utilisation de photosensibilisateurs (PS) a suscité un intérêt à partir des années 1900. **L'utilisation de ces photosensibilisateurs permet, par désexcitation de photons, de produire de l'oxygène singulet dans le milieu cellulaire de façon ciblée (Figure 11), résultant en un stress oxydatif pour les cellules cancéreuses et afin d'enclencher leur mort par apoptose** [112], [113]. En effet, l'oxygène singulet ainsi produit est à un état très instable, du fait de la présence de deux électrons non appariés sur deux orbitales de même énergie, et qui explique la durée de vie très courte et la forte réactivité de cette espèce. Dans le but de trouver des photosensibilisateurs toujours plus efficaces, des recherches sont toujours menées sur cette thématique [114]–[117].

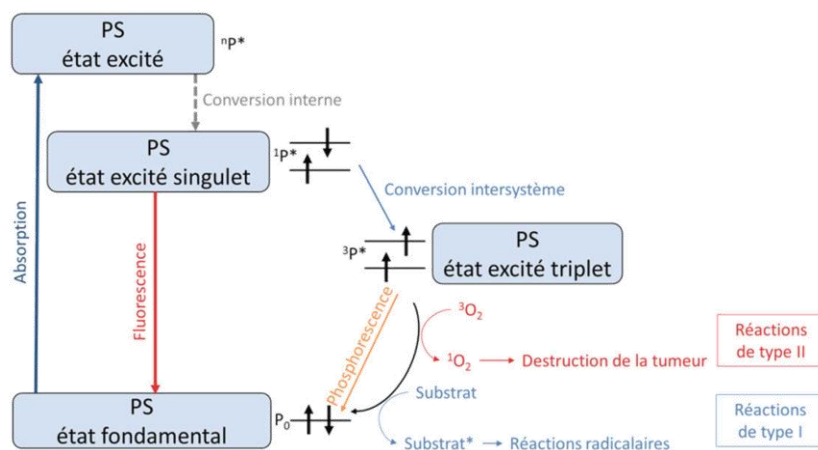


Figure 11 – Diagramme de Jablonski : Principe de la Photothérapie Dynamique (PDT) [114]

Par ailleurs, **l'imagerie multi-photon**, initialement utilisée pour du diagnostic de cancers, a révélé une fonction thérapeutique lorsque des pulses nanosecondes de champs électriques sont appliqués dans le cas de cancers cérébraux comme le glioblastome [118].



Enfin, un nouvel outil d'aide à la thérapie, servant à l'établissement du plan de soins, a émergé récemment, à savoir l'**Oncogramme® développé par la société Oncomedics**. Il s'agit de prélever des cellules tumorales du patient, qui sont ensuite cultivées en laboratoire puis exposées à différents agents chimio-thérapeutiques. La résistance ou la sensibilité des cellules tumorales du patient par rapport aux différents agents chimio-thérapeutiques est ensuite appréciée, ce qui aide les praticiens à adapter et sélectionner un traitement individualisé pour chaque patient, donnant ainsi de meilleurs pronostics de survie. Ce type de test a déjà été éprouvé sur des cancers colorectaux lors d'études cliniques [119], [120].

### I.2.3.3. Vers l'élaboration de nouveaux dispositifs pour le traitement local de cancers

Des dispositifs existent pour le traitement local de cancers, bien que très peu soient recensés dans la bibliographie. Une des problématiques repose sur l'illumination de la zone à traiter. En application externe, la lumière ne pénètre les tissus que sur une dizaine de millimètres, mais pour des tumeurs profondes, il est possible de recourir à des **fibres optiques** insérées par le biais de cathéters (Figure 12-a) [121]. Un **système photonique sans fil** a aussi été développé (Figure 12-b), qui fonctionne sous l'effet d'un champ radiofréquence [122]. Néanmoins, le dispositif reste encombrant (environ 4 mm de côté), ce qui nécessite de l'implanter au cœur de la tumeur (avec un risque invasif) et qui ne permet pas de s'affranchir de l'application de photosensibilisateurs sous forme de nanoparticules circulantes.

Depuis 2011, une équipe américaine développe une **sonde PDT** qui présente l'avantage d'avoir les photosensibilisateurs immobilisés en surface de la sonde (Figure 12-c) [123]–[125], et qui permet à la fois un apport en oxygène ainsi que la sollicitation lumineuse par l'intermédiaire de la fibre optique. Néanmoins, cette sonde a pour défaut principal son encombrement, à savoir des embouts sous forme de capsules de diamètre 5 mm, et qui peut être mutilant car nécessite d'ouvrir les tissus pour accéder à la zone à traiter.

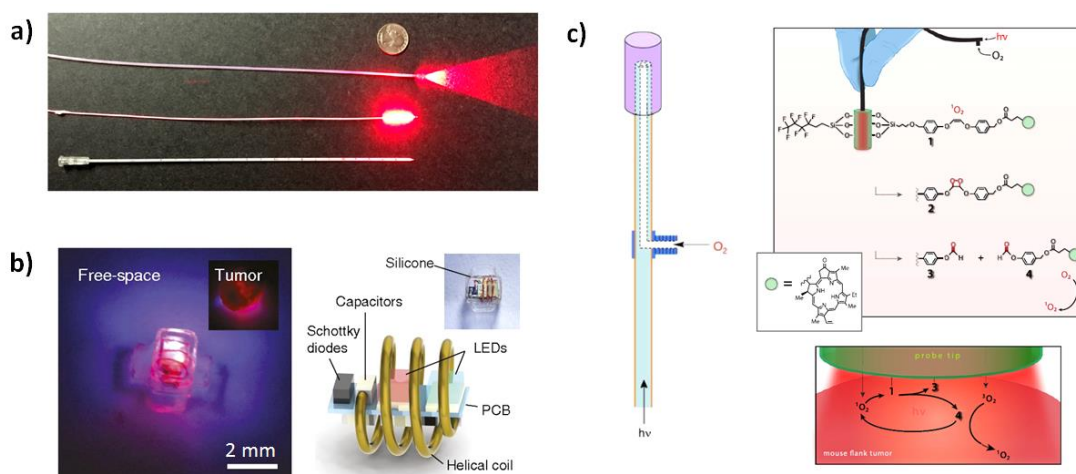


Figure 12 – Eclairage de la zone à traiter par le biais de fibres optiques (a), d'un microcomposant photonique implantable (b) ou d'une sonde fonctionnalisée avec des photosensibilisateurs (c)



### I.3. Présentation du dispositif développé dans de cette étude

En vue du diagnostic de tumeurs à des stades précoces, le dispositif développé au cours de ces travaux est constitué d'une sonde sous forme d'une fibre optique, fonctionnalisée par des biomolécules permettant la détection de marqueurs cancéreux par le principe d'effet FRET. La surface de ces fibres est imprimée par des microplots de silice mésoporeuse, eux-mêmes fonctionnalisés par un espaceur par chimie *click*, puis greffés par des protéines et des anticorps reconnaissant les marqueurs cancéreux, ces deux biomolécules étant marquées en fluorescence pour permettre la détection par effet FRET (Figure 13). L'anticorps retenu est un anticorps anti-TrkB permettant de cibler le récepteur membranaire TrkB, surexprimé à la surface des cellules cancéreuses [8], [17].

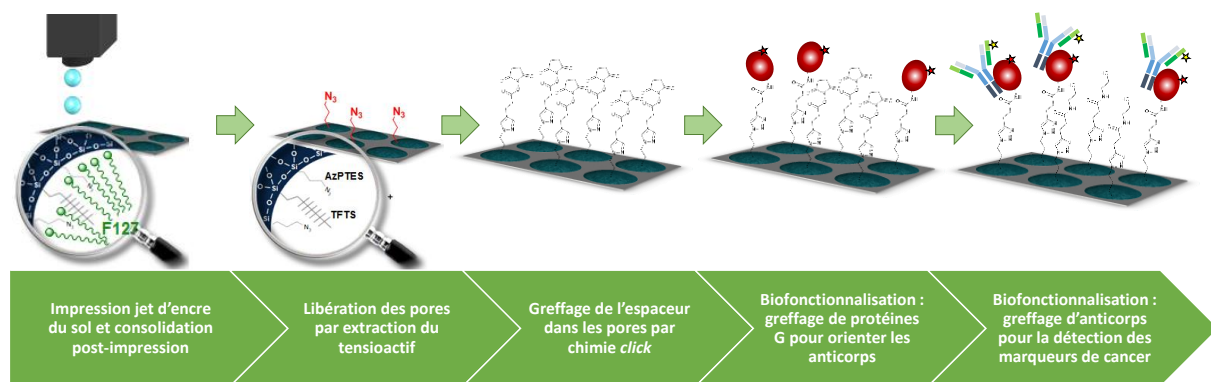


Figure 13 – Fonctionnalisation des sondes dans le cas du diagnostic

Pour la thérapie, le même type de fibres est utilisé, mais fonctionnalisées dans ce cas par des photosensibilisateurs (PS) permettant d'induire la photothérapie dynamique (PDT) et la mort des cellules cancéreuses par apoptose (Figure 14). Les PS peuvent être greffés par chimie *click* post-impression (voie N°1, Figure 14) ou bien directement incorporés dans la solution à déposer sur la sonde (voie N°2, Figure 14).

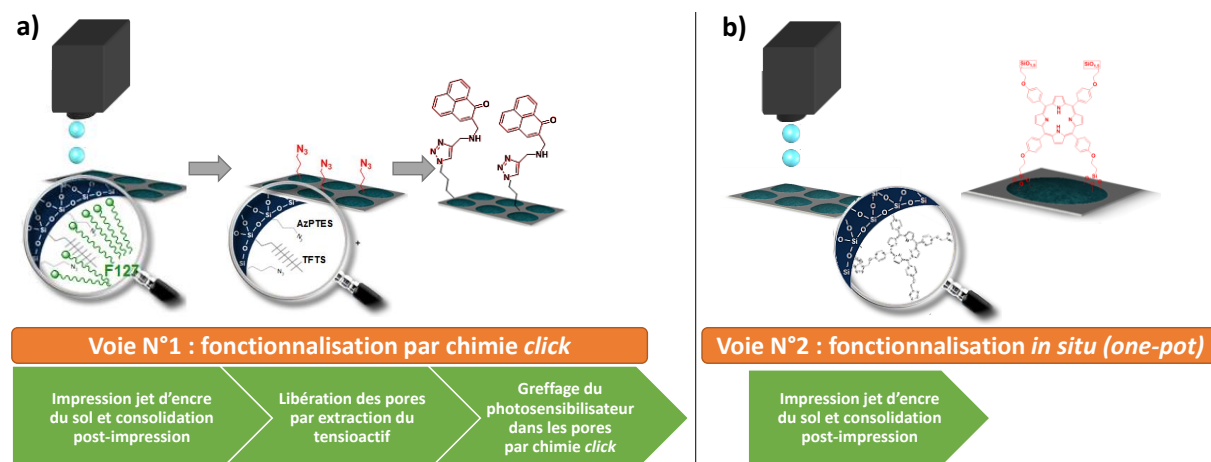


Figure 14 – Fonctionnalisations des sondes dans le cas de la thérapie : une voie N°1 avec PS greffé post-impression (a), ou une voie N°2 avec PS incorporé directement dans la solution à imprimer (b)



Ces sondes sont reliées à un spectrofluorimètre capable de gérer, via une interface informatique et un traitement du signal, l'excitation à une longueur d'onde permettant de stimuler le fluorochrome donneur dans le cas du diagnostic, ou de stimuler les photosensibilisateurs dans le cas de la thérapie. La transmission du signal se fait par l'intermédiaire de la fibre optique constituant la sonde. **Cette technologie a fait l'objet d'un premier dépôt de brevet en 2013 [126] et d'un second en 2017 [127].**

**Le dispositif sera limité dans un premier temps aux cancers colorectaux (CCR) ou aux cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS),** qui concernent notamment la cavité buccale, le pharynx, le larynx, l'œsophage. Ceci pourrait être étendu ensuite à tout cancer accessible par voie endoscopique (utérus, ovaires) ou par une petite incision du tissu (cancer du sein, prostate, etc.), ce qui est par ailleurs couramment utilisé par les praticiens hospitaliers pour certaines chirurgies (chirurgie cardiaque, gastrique, etc.).

Comme pour les autres techniques récemment développées, **le dispositif a pour but de pouvoir limiter le nombre de biopsies à réaliser, pour ne pas créer de complications supplémentaires, en particulier des fibroses, qui risqueraient de favoriser l'apparition de tumeurs malignes.**

Les techniques existantes actuelles permettent d'orienter le diagnostic, sans pour autant que ce soit un diagnostic de certitude. Aussi, la précision des dispositifs compétitifs n'excède pas les 90%, et bien souvent il revient au praticien de décider ou non s'il doit procéder à une résection. D'autre part, le morceau réséqué peut être analysé pour voir si les marges de l'exérèse sont saines et savoir indirectement s'il reste des cellules cancéreuses au niveau de la zone opérée. **Le dispositif envisagé doit pouvoir répondre à ces questions, à savoir pour la détection fiable des tumeurs précancéreuses, et en cas d'exérèse, de permettre de vérifier que la tumeur n'est pas propagée en sous-cutanée et que les marges d'exérèse sont saines. Cette méthode pourrait également être utilisée en suivi post-opératoire pour les patients à haut risque, pour vérifier que la zone soignée n'a pas subi de rechute.** Ce dispositif ne sera toutefois pas indiqué dans le cas de tumeurs étendues, comme dans le cas de cancers de stade 3 à 4 avec présence de métastases multiples.

Par la suite, **la thérapie locale par PDT pourrait remplacer la chimiothérapie ou la radiothérapie qui sont faites post-chirurgie pour éviter les rechutes, sous la condition de démontrer la faisabilité et la fiabilité d'une telle méthode par voie fibrée.** La PDT induite par des photosensibilisateurs représenterait une voie tout aussi agressive pour les cellules cancéreuses, tout en étant « plus douce et confortable » pour le patient. Cette voie est également moins invasive (car ciblée et locale), par comparaison avec l'utilisation de nanoparticules utilisées pour du ciblage thérapeutique ou du relargage, qui sont circulantes.



#### I.4. Objectifs global des travaux menés

L'objectif global des travaux porte sur la fiabilisation et l'optimisation de la détection, notamment par rapport à la sensibilité de détection du dispositif, et qui se traduit par l'optimisation du changement de signature en fluorescence par l'effet FRET, c'est-à-dire le basculement d'énergie du fluorochrome donneur au fluorochrome accepteur. Pour cela, plusieurs aspects sont envisageables :

- **Optimiser le taux de fluorochromes donneurs par rapport au taux de fluorochromes accepteurs** : il faudrait un taux de fluorochromes donneurs qui soit maximum pour garantir un maximum de transfert d'énergie de FRET, tout en garantissant que chaque fluorochrome participe bien à cet effet (pas de saturation de fluorescence, pas d'effet « *bulk* »).

- **Maximiser le nombre de fluorochromes par biomolécule, tout en garantissant un greffage équivalent**, c'est-à-dire sans saturer la biomolécule, au risque que les sites d'accroches ne soient plus accessibles et qu'elle ne soit pas ancrée à la surface de la sonde.

- **Maximiser le nombre de biomolécules greffées, par l'optimisation des protocoles de biofonctionnalisation, et en maximisant le taux d'espaceur fonctionnalisé par chimie *click*, tout en garantissant la bonne répartition des biomolécules.**

La structure de la porosité, en lien direct avec la répartition de l'espaceur en surface et en volume, influencerait l'homogénéité du greffage des biomolécules. En effet, plusieurs types de structurations ont déjà été obtenus pour ce type de matériau, en utilisant des solutions ou conditions d'impression différentes. Il faut par ailleurs garantir une reproductibilité au niveau des microplots imprimés. Pour cela, **la structure de la porosité est étudiée en fonction de divers paramètres lors de l'impression** (cf. Chapitre II).

L'efficacité de la chimie *click*, directement reliée au taux de fonctions disponibles pour le greffage des biomolécules, est étudiée en vue d'optimiser cette réaction (cf. Chapitre III), en testant différents milieux réactionnels, différentes proportions, etc. **L'étude du greffage des protéines en fonction de différents taux de fonctionnalisation et différents types de structures de porosité ont aussi été réalisés.**

Pour le diagnostic, il faut bien sûr démontrer la preuve de concept avec le dispositif réalisé, utilisant les fibres optiques fonctionnalisées, c'est-à-dire montrer la précision et la spécificité de détection des marqueurs cancéreux choisis (cf. Chapitre III). Pour la thérapie, la preuve de concept est également à faire (cf. Chapitre IV), dans un premier temps, en vérifiant la possibilité de fonctionnaliser les sondes par les photosensibilisateurs, puis dans un second temps, en réalisant des tests biologiques préliminaires pour attester de l'efficacité du principe PDT, soit en voie *in vitro* sur des cellules cancéreuses, soit en voie *in vivo* sur des animaux présentant une tumeur.



## Sources – Chapitre 1

---

- [1] A. Bellesoeur, L. Cabel, E. Hutt, et M. Mustarhfir, *iKB Cancérologie*, VG Editions. 2016.
- [2] « Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016 », *World Health Organization*, 2018.
- [3] « Global Cancer Observatory ». [En ligne]. Disponible sur: <http://gco.iarc.fr/>. [Consulté le: 20-sept-2018].
- [4] F. Bray, A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay, et D. Forman, « Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study », *The Lancet Oncology*, vol. 13, n° 8, p. 790-801, août 2012.
- [5] « Worldwide cancer statistics », *Cancer Research UK*, 13-mai-2015. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>. [Consulté le: 05-sept-2018].
- [6] « Rapport Les Cancers en France », Institut National du Cancer, janv. 2014.
- [7] K. Jéhannin-Ligier *et al.*, « Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017 », Santé publique France, Rapport technique, 2017.
- [8] M. Hecht, J. H. Schulte, A. Eggert, J. Wiltling, et L. Schweigerer, « The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness », *Carcinogenesis*, vol. 26, n° 12, p. 2105-2115, déc. 2005.
- [9] « Cancers de l'enfant : le neuroblastome », *Institut Curie*. [En ligne]. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/cancers-de-lenfant-le-neuroblastome>. [Consulté le: 02-sept-2018].
- [10] « Cancer: une part importante de hasard », 02-janv-2015. [En ligne]. Disponible sur: <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2015/01/02/23222-cancer-part-importante-hasard>. [Consulté le: 02-sept-2018].
- [11] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The Hallmarks of Cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000.
- [12] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011.
- [13] J. M. Cozar *et al.*, « Genetic markers a landscape in prostate cancer », *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 775, p. 1-10, janv. 2018.
- [14] S. Dasari, R. Wudayagiri, et L. Valluru, *Cervical Cancer: Biomarkers for Diagnosis and Treatment*, vol. 445. 2015.
- [15] S. Delaloge *et al.*, « Dépistage du cancer du sein : en route vers le futur », *Bulletin du Cancer*, vol. 103, n° 9, p. 753-763, sept. 2016.
- [16] K. Witold, K. Anna, T. Maciej, et J. Jakub, « Adenomas – Genetic factors in colorectal cancer prevention », *Report of Practical Oncology and Radiotherapy*, vol. 23, p. 75-83, 2018.
- [17] H. Akil, A. Perraud, M.-O. Jauberteau, et M. Mathonnet, « Tropomyosin-related kinase B/brain derived neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer », *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, n° 2, p. 490-500, 2016.





- [18] A. S. Englhard *et al.*, « Confocal laser endomicroscopy in head and neck malignancies using FITC-labelled EpCAM- and EGF-R-antibodies in cell lines and tumor biopsies », *Journal of Biophotonics*, vol. 10, n° 10, p. 1365-1376, oct. 2017.
- [19] Z. K. Arbiser, A. L. Folpe, et S. W. Weiss, « Consultative (Expert) Second Opinions in Soft Tissue Pathology Analysis of Problem-Prone Diagnostic Situations », *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 116, n° 4, p. 473-476, oct. 2001.
- [20] « Université Numérique Francophone des Sciences de la Santé et du Sport, Cours, Item 151: Tumeurs du foie primitives et secondaires ». [En ligne]. Disponible sur: [http://campus.cerimes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item151/site/html/4\\_3.html](http://campus.cerimes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item151/site/html/4_3.html). [Consulté le: 20-août-2018].
- [21] S. Haddar *et al.*, « Sarcomes des maxillaires, à propos de 14 cas, presentation pédagogique, service d'imagerie médicale du CHU H Bourguiba Sfax, Tunisie ». [En ligne]. Disponible sur: <http://pe.sfrnet.org/Data/ModuleConsultationPoster/pdf/2009/1/f1ebcc27-d829-4ca3-b815-dca1dac02455.pdf>. [Consulté le: 20-sept-2018].
- [22] V. Saint-Jean, « Sarcomes de la tête et du cou de l'adulte ». [En ligne]. Disponible sur: <https://docplayer.fr/45935214-Sarcomes-de-la-tete-et-du-cou-de-l-adulte.html>. [Consulté le: 20-sept-2018].
- [23] « Centre Interprofessionnel d'Etudes et d'Examens Médicaux, Bilan de santé personnalisé au centre de bilan de santé du CIEM ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.leciem.com/actualites/bilan-de-sante-actus-61.html>. [Consulté le: 20-sept-2018].
- [24] « Centre de radiologie Belledonne ». [En ligne]. Disponible sur: [https://radiologiebelledonne.fr/radiobel\\_mammographie.html](https://radiologiebelledonne.fr/radiobel_mammographie.html). [Consulté le: 20-sept-2018].
- [25] « Cancer du Testicule : Que sait-on ? », *Ligue contre le cancer*. [En ligne]. Disponible sur: [/vivre/article/26472\\_cancer-du-testicule-que-sait](http://vivre/article/26472_cancer-du-testicule-que-sait). [Consulté le: 20-sept-2018].
- [26] C. E. O. dos Santos, J. C. Pereira-Lima, et F. de Q. Onófrío, « Large Colorectal Lesions: Evaluation and Management », *GE Portuguese Journal of Gastroenterology*, vol. 23, n° 4, p. 197-207, juill. 2016.
- [27] D. F. Boerwinkel, A.-F. Swager, W. L. Curvers, et J. J. G. H. M. Bergman, « The Clinical Consequences of Advanced Imaging Techniques in Barrett's Esophagus », *Gastroenterology*, vol. 146, n° 3, p. 622-629.e4, mars 2014.
- [28] V. Pasechnikov, S. Chukov, E. Fedorov, I. Kikuste, et M. Leja, « Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis », *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, n° 38, p. 13842-62, 2014.
- [29] S. Tanaka *et al.*, *JGES guidelines for colorectal endoscopic submucosal dissection/endoscopic mucosal resection: Colorectal ESD/EMR guidelines*, vol. 27. 2015.
- [30] J. E. Allen et P. Sharma, *Polyp characterization at colonoscopy: Clinical implications*, vol. 31. 2017.
- [31] S. Mordon, V. Maunoury, P. Bulois, P. Desreumaux, et J.-F. Colombel, « L'endoscopie à bande spectrale étroite en gastroentérologie », *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, vol. 29, n° 11, p. 1190-1192, nov. 2005.



- [32] Y. Yoshifuku *et al.*, « Evaluation of the visibility of early gastric cancer using linked color imaging and blue laser imaging », *BMC Gastroenterology*, vol. 17, n° 1, p. 150, déc. 2017.
- [33] M. Serrano, I. Kikuste, et M. Dinis-Ribeiro, « Advanced endoscopic imaging for gastric cancer assessment: New insights with new optics? », *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 28, n° 6, p. 1079-1091, déc. 2014.
- [34] N. Yoshida *et al.*, « The detection of surface patterns by flexible spectral imaging color enhancement without magnification for diagnosis of colorectal polyps », *International Journal of Colorectal Disease*, vol. 27, n° 5, p. 605-611, mai 2012.
- [35] H. Ikematsu *et al.*, « Detectability of colorectal neoplastic lesions using a novel endoscopic system with blue laser imaging: a multicenter randomized controlled trial », *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 86, n° 2, p. 386-394, août 2017.
- [36] N. Yoshida *et al.*, *The ability of a novel blue laser imaging system for the diagnosis of invasion depth of colorectal neoplasms*, vol. 49. 2013.
- [37] S. Ishaq *et al.*, « Technological advances for improving adenoma detection rates: The changing face of colonoscopy », *Digestive and Liver Disease*, vol. 49, n° 7, p. 721-727, juill. 2017.
- [38] M. Abbaci *et al.*, « Confocal laser endomicroscopy for non-invasive head and neck cancer imaging: A comprehensive review », *Oral Oncology*, vol. 50, n° 8, p. 711-716, août 2014.
- [39] G. Chene *et al.*, « In vivo confocal laser endomicroscopy during laparoscopy for gynecological surgery: A promising tool », *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, vol. 46, n° 7, p. 565-569, sept. 2017.
- [40] C. Akarsu *et al.*, « FICE vs Narrow Band Imaging for In Vivo Histologic Diagnosis of Polyps », *Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons*, vol. 20, n° 4, p. 84-91, 2016.
- [41] I. Kikuste, D. Stirna, I. Liepniece-Karele, M. Leja, et M. Dinis-Ribeiro, *The accuracy of flexible spectral imaging colour enhancement for the diagnosis of gastric intestinal metaplasia: Do we still need histology to select individuals at risk for adenocarcinoma?*, vol. 26. 2014.
- [42] J. Nishimura *et al.*, *Efficacy of i-Scan Imaging for the Detection and Diagnosis of Early Gastric Carcinomas*, vol. 2014. 2014.
- [43] M. Kaise *et al.*, *Accuracy and concordance of endocytoscopic atypia for the diagnosis of gastric cancer*, vol. 46. 2014.
- [44] E. Coron, T. Matysiak-Budnik, M. Le Chevalier de Préville, et J. P. Galmiche, « Définition et méthodes de diagnostic de l'oesophage de Barrett », *Cancéro digest*, vol. 1, n° 4, p. 265-271, 2009.
- [45] G. Rahmi, « Comment explorer un œsophage de Barrett ?, Congrès l'Association Française de Formation Médicale Continue en Hépatogastro-Entérologie. », *FMC-HGE*. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu\\_year/comment-explorer-un-oesophage-de-barrett/](https://www.fmcgastro.org/textes-postus/no-postu_year/comment-explorer-un-oesophage-de-barrett/). [Consulté le: 20-sept-2018].
- [46] R. Singh *et al.*, *Preliminary feasibility study using a novel narrow-band imaging system with dual focus magnification capability in Barrett's esophagus: Is the time ripe to abandon random biopsies?*, vol. 25. 2013.



- [47] L. Y. Zhang *et al.*, « Discrimination of colorectal cancer cell lines using microwave biosensors », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 216, p. 405-416, sept. 2014.
- [48] C. Dalmay, M. Cheray, A. Pothier, F. Lalloué, M. O. Jauberteau, et P. Blondy, « Ultra sensitive biosensor based on impedance spectroscopy at microwave frequencies for cell scale analysis », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 162, n° 2, p. 189-197, août 2010.
- [49] A. Toullec, « Dispositif d'aiguille fibrée pour la spectroscopie de fluorescence endogène de lésions mammaires et pulmonaires ex vivo et in vivo ; vers le développement d'une méthode d'histopathologie in situ ». Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud, 2018.
- [50] R. Farcy *et al.*, « Aiguille fibrée pour l'aide au diagnostic du cancer du sein par fluorescence endogène », *Photoniques*, n° 79, p. 22-25, 2015.
- [51] « FLUOBEAM – Fluoptics ». .
- [52] E. Ly-Morin, O. Piot, et M. Manfait, « La micro-imagerie infrarouge appliquée au diagnostic des cancers cutanés », *Photoniques*, n° 79, p. 26-29, 2015.
- [53] J. Desroches *et al.*, « Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification », *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, n° 7, p. 2380-2397, juill. 2015.
- [54] R. Viswambari Devi, M. Doble, et R. S. Verma, « Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 68, p. 688-698, juin 2015.
- [55] T. Xu, N. Liu, J. Yuan, et Z. Ma, *Triple tumor markers assay based on carbon-gold nanocomposite*, vol. 70. 2015.
- [56] H. Jo, J. Her, et C. Ban, « Dual aptamer-functionalized silica nanoparticles for the highly sensitive detection of breast cancer », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 71, p. 129-136, sept. 2015.
- [57] C. Chen *et al.*, *Recent advances in electrochemical glucose biosensors: A review*, vol. 3. 2013.
- [58] C. N. Kotanen, F. G. Moussy, S. Carrara, et A. Guiseppi-Elie, « Implantable enzyme amperometric biosensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 35, n° 1, p. 14-26, mai 2012.
- [59] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao, et Q.-J. Zhang, « Impedimetric biosensors », *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 97, n° 4, p. 219-226, janv. 2004.
- [60] W. Pang, H. Zhao, E. Sok Kim, H. Zhang, H. Yu, et X. Hu, *Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection*, vol. 12. 2011.
- [61] I. Voiculescu et A. N. Nordin, « Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 33, n° 1, p. 1-9, mars 2012.
- [62] B. Danielsson, « Calorimetric biosensors », *Journal of Biotechnology*, vol. 15, n° 3, p. 187-200, août 1990.
- [63] M. Morris, *Fluorescent Biosensors - Probing Protein Kinase Function in Cancer and Drug Discovery.*, vol. 1834. 2013.



- [64] C. J. Musto et K. S. Suslick, *Differential sensing of sugars by colorimetric arrays*, vol. 14. 2010.
- [65] G. Gauglitz, *Direct Optical Detection in Bioanalysis: An Update*, vol. 398. 2010.
- [66] J. Homola, *Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species*, vol. 108. 2008.
- [67] M. Rowena N. Monton, E. Forsberg, et J. D. Brennan, *Tailoring Sol–Gel-Derived Silica Materials for Optical Biosensing*, vol. 24. 2011.
- [68] V. Romanov, S. Davidoff, A. R. Miles, D. W. Grainger, B. Gale, et B. Brooks, *A critical comparison of protein microarray fabrication technologies*, vol. 139. 2014.
- [69] H. Yang, « Enzyme-based ultrasensitive electrochemical biosensors », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 16, n° 3, p. 422-428, août 2012.
- [70] P. B. Lippa, L. J. Sokoll, et D. W. Chan, « Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry », *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, n° 1, p. 1-26, déc. 2001.
- [71] L. Su, W. Jia, C. Hou, et Y. Lei, « Microbial biosensors: A review », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n° 5, p. 1788-1799, janv. 2011.
- [72] S. Cagnin, E. Cimetta, C. Guiducci, P. Martini, et G. Lanfranchi, *Overview of Micro- and Nano-Technology Tools for Stem Cell Applications: Micropatterned and Microelectronic Devices*, vol. 12. 2012.
- [73] J. Zhou, M. Battig, et Y. Wang, *Aptamer-based molecular recognition for biosensor development*, vol. 398. 2010.
- [74] F. R. R. Teles et L. P. Fonseca, « Trends in DNA biosensors », *Talanta*, vol. 77, n° 2, p. 606-623, déc. 2008.
- [75] Z. Zhang et S. Nagrath, *Microfluidics and Cancer: Are we there yet?*, vol. 15. 2013.
- [76] G. Kostovski, P. Stoddart, et A. Mitchell, *Optical Fibers: The Optical Fiber Tip: An Inherently Light-Coupled Microscopic Platform for Micro- and Nanotechnologies (Adv. Mater. 23/2014)*, vol. 26. 2014.
- [77] Y. Li, H. Xin, X. Liu, Y. Zhang, H. Lei, et B. Li, *Trapping and Detection of Nanoparticles and Cells Using a Parallel Photonic Nanojet Array*, vol. 10. 2016.
- [78] J. C. Carter *et al.*, « Fabricating optical fiber imaging sensors using inkjet printing technology: A pH sensor proof-of-concept », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 7, p. 1359-1364, janv. 2006.
- [79] J. H. W. Cramp, R. F. Reid, R. T. Murray, et R. M. Mortier, « Fibre optic sensor with bonded dye », European Patent No. EP0072627.
- [80] D. R. Walt et S. Szunerits, « Electro-Optical Stimulation/Measurement », US Patent No. US7480433.
- [81] T. Förster, *Energiewanderung und Fluoreszenz*, vol. 33. 1946.
- [82] L. Stryer, « Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 47, n° 1, p. 819-846, juin 1978.



- [83] D. L. Sokol, X. Zhang, P. Lu, et A. M. Gewirtz, *Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells*, vol. 95. 1998.
- [84] S. S. Chan, D. Arndt-Jovin, et T. M. Jovin, *Proximity of lectin receptors on the cell surface measured by fluorescence energy transfer in a flow system*, vol. 27. 1979.
- [85] A. Miyawaki *et al.*, *Fluorescent Indicators for Ca<sup>2+</sup> Based on Green Fluorescent Proteins and Calmodulin*, vol. 388. 1997.
- [86] B. Gregan *et al.*, *Ligand-dependent Differences in the Internalization of Endothelin A and Endothelin B Receptor Heterodimers*, vol. 279. 2004.
- [87] T. S Karpova *et al.*, *Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser*, vol. 209. 2003.
- [88] Z. Hu *et al.*, *A facile “click” reaction to fabricate a FRET-based ratiometric fluorescent Cu<sup>2+</sup> probe*, vol. 2. 2014.
- [89] G. Multhaupt *et al.*, « The Amyloid Precursor Protein of Alzheimer’s Disease in the Reduction of Copper(II) to Copper(I) », *Science*, vol. 271, n° 5254, p. 1406, mars 1996.
- [90] N. R. Chereddy *et al.*, « A novel FRET ‘off-on’ fluorescent probe for the selective detection of Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> and Cr<sup>3+</sup> ions: Its ultrafast energy transfer kinetics and application in live cell imaging », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 68, p. 749-756, juin 2015.
- [91] T. Kawano, T. Kadono, T. Furuichi, S. Muto, et F. Lapeyrie, « Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 308, n° 1, p. 35-42, août 2003.
- [92] J. Qiao, Z. Liu, Y. Tian, M. Wu, et Z. Niu, « Multifunctional self-assembled polymeric nanoprobe for FRET-based ratiometric detection of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in living cells », *Chemical Communications*, vol. 51, n° 17, p. 3641-3644, 2015.
- [93] M. G. Dickens et K. J. Franz, « A Prochelator Activated by Hydrogen Peroxide Prevents Metal-Induced Amyloid  $\beta$  Aggregation », *ChemBioChem*, vol. 11, n° 1, p. 59-62, janv. 2010.
- [94] Z. Chen *et al.*, *Lanthanide-Doped Luminescent Nano-Bioprobes for the Detection of Tumor Markers*, vol. 7. 2015.
- [95] Y. Cen, Y. Wu, X. Kong, S. Wu, R. Yu, et X. Chu, *Phospholipid-Modified Upconversion Nanoprobe for Ratiometric Fluorescence Detection and Imaging of Phospholipase D in Cell Lysate and in Living Cells*, vol. 86. 2014.
- [96] R. Fritz *et al.*, *A Versatile Toolkit to Produce Sensitive FRET Biosensors to Visualize Signaling in Time and Space*, vol. 6. 2013.
- [97] Z. Yi et W. Tza-Huei, « Quantum Dot Enabled Molecular Sensing and Diagnostics », *Theranostics*, vol. 2, n° 7, p. 631-654, 2012.
- [98] C. E. Rowland, J. B. Delehanty, C. L. Dwyer, et I. L. Medintz, « Growing applications for bioassembled Förster resonance energy transfer cascades », *Materials Today*, vol. 20, n° 3, p. 131-141, 2017.



- [99] A. Samanta, S. Walper, K. Susumu, C. Dwyer, et I. L. Medintz, *An enzymatically-sensitized sequential and concentric energy transfer relay self-assembled around semiconductor quantum dots*, vol. 7. 2015.
- [100] I. L. Medintz, H. Uyeda, E. R. Goldman, et H. Mattoussi, *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*, vol. 4. 2006.
- [101] Y. Wang *et al.*, *Protease-Activatable Hybrid Nanoprobe for Tumor Imaging*, vol. 24. 2014.
- [102] A. F.-J. Jou *et al.*, *Diagnosing the miR-141 Prostate Cancer Biomarker Using Nucleic Acid-Functionalized CdSe/ZnS QDs and Telomerase*, vol. 6. 2014.
- [103] P. P. Nampi, C. C. Kartha, G. Jose, A. K. P.R., T. Anilkumar, et H. Varma, « Sol-gel nanoporous silica as substrate for immobilization of conjugated biomolecules for application as fluorescence resonance energy transfer (FRET) based biosensor », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 185, p. 252-257, août 2013.
- [104] S. A. Grant, M. E. Pierce, D. J. Lichlyter, et D. A. Grant, « Effects of immobilization on a FRET immunosensor for the detection of myocardial infarction », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 381, n° 5, p. 1012-1018, mars 2005.
- [105] N. Polley, S. Singh, A. Giri, P. K. Mondal, P. Lemmens, et S. K. Pal, « Ultrafast FRET at fiber tips: Potential applications in sensitive remote sensing of molecular interaction », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 210, p. 381-388, avr. 2015.
- [106] S. Ko et S. A. Grant, « A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of Salmonella typhimurium », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 7, p. 1283-1290, janv. 2006.
- [107] M. K Callahan, J. D Wolchok, et J. Allison, *Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy*, vol. 37. 2010.
- [108] Y. Iwai, J. Hamanishi, K. Chamoto, et T. Honjo, *Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway*, vol. 24. 2017.
- [109] S. van Rijt *et al.*, *Protease Mediated Release of Chemotherapeutics From Mesoporous Silica Nanoparticles to Ex Vivo Human and Mouse Lung Tumors*, vol. 9. 2015.
- [110] D. He, X. He, K. Wang, Z. Zou, Z. Tong, et X. Li, *Remote-Controlled Drug Release from Graphene Oxide-Capped Mesoporous Silica to Cancer Cells by Photoinduced pH-Jump Activation*, vol. 30. 2014.
- [111] T. Nakamura, F. Sugihara, H. Matsushita, Y. Yoshioka, S. Mizukami, et K. Kikuchi, *Mesoporous silica nanoparticles for <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery*, vol. 6. 2014.
- [112] Z. Huang, « A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy », *Technol Cancer Res Treat*, vol. 4, n° 3, p. 283-293, juin 2005.
- [113] C. Frochot *et al.*, « La thérapie photodynamique: état de l'art et perspectives », 2015.
- [114] C. Fidanzi-Dugas, « Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique, étude in vitro et in vivo ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2016.



- [115] C. Mauriello-Jimenez, « Theranostic Nanoparticles for cancer treatment using one or twophoton photodynamic therapy ». Thèse d'université, Université de Montpellier, 2016.
- [116] D. Olivier, « Identification de nouveaux composés pour la photochimiothérapie des cancers ». Thèse d'université, Université de Nantes, 2008.
- [117] G. Garcia, F. Hammerer, F. Poyer, S. Achelle, M.-P. Teulade-Fichou, et P. Maillard, « Carbohydrate-conjugated porphyrin dimers: synthesis and photobiological evaluation for a potential application in one-photon and two-photon photodynamic therapy », *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 21, n° 1, p. 153—165, janv. 2013.
- [118] S. Bardet, L. Carr, M. Soueid, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, et R. O'Connor, *Multiphoton imaging reveals that nanosecond pulsed electric fields collapse tumor and normal vascular perfusion in human glioblastoma xenografts*, vol. 6. 2016.
- [119] E. Loum, S. Giraud, B. Bessette, S. Battu, M. Mathonnet, et C. Lautrette, « Oncogramme, a new individualized tumor response testing method: application to colon cancer », *Cytotechnology*, vol. 62, n° 5, p. 381-388, oct. 2010.
- [120] C. Bounaix Morand du Puch *et al.*, « Chemotherapy outcome predictive effectiveness by the Oncogramme: pilot trial on stage-IV colorectal cancer », *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, n° 1, p. 10, janv. 2016.
- [121] G. Shafirstein *et al.*, « Interstitial Photodynamic Therapy—A Focused Review », *Cancers*, vol. 9, n° 2, 2017.
- [122] A. Bansal, F. Yang, T. Xi, Y. Zhang, et J. Ho, *In vivo wireless photonic photodynamic therapy*, vol. 115. 2018.
- [123] M. Zamadar *et al.*, *Photosensitizer Drug Delivery via an Optical Fiber*, vol. 133. 2011.
- [124] A. Ghogare, I. Rizvi, T. Hasan, et A. Greer, "*Pointsource*" *Delivery of a Photosensitizer Drug and Singlet Oxygen: Eradication of Glioma Cells In Vitro*, vol. 90. 2014.
- [125] A. A. Ghogare *et al.*, « Fluorinated Photodynamic Therapy Device Tips and their Resistance to Fouling for *In Vivo* Sensitizer Release », *Photochemistry and Photobiology*, vol. 92, n° 1, p. 166-172, janv. 2016.
- [126] M. Lejeune *et al.*, « Dispositif photoactif permettant la détection et la transformation d'éléments chimiques à son contact », Brevet Français N° FR 3 006 878.
- [127] J. Desroches, O. Baudet, M. Lejeune, R. Trihan, et F. Lalloué, « Fibre optique à extrémité d'exploration fonctionnalisée », Brevet Français N° FR 17 70494.



## Chapitre II. Réalisation par impression jet d'encre (IJP) de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée .....41

II.1. Techniques de dépôts de matériaux mésoporeux .....	42
II.1.1. Procédé sol-gel .....	42
II.1.2. Structuration des matériaux mésoporeux .....	44
II.1.2.1. Mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation (EISA) .....	44
II.1.2.2. Différents types de tensioactifs pour différents types de structure de porosité .....	45
II.1.3. Fonctionnalisation de matériaux mésoporeux : le cas de la silice mésoporeuse ..	46
II.1.3.1. Fonctionnalisation post-traitement par silylation .....	46
II.1.3.2. Fonctionnalisation <i>one-pot</i> par co-condensation .....	47
II.2. Etat de l'art sur la réalisation de microplots de silice mésoporeuse par impression jet d'encre .....	48
II.2.1. Formulations précédemment testées .....	48
II.2.2. Fonctionnalisation <i>in situ</i> avec ajout de TFTS : $TTf_xF_{0.006}E_5Et_{20}$ (X = 5% ou 10%) .....	50
II.2.3. Fonctionnalisation <i>in situ</i> avec ajout d'AzPTES : $TTf_xAz_yF_{0.006}E_5Et_{20}$ (pour X = 5%, Y = 5%, 10% et 15% – pour X = 2,5%, Y = 10%) .....	53
II.3. Problématique et démarche adoptée .....	55
II.3.1. Analyse de la problématique .....	55
II.3.2. Protocoles de réalisation des différents dépôts de microplots .....	56
II.3.2.1. Préparation des encres .....	56
II.3.2.2. Impression des microplots .....	56
II.3.3. Techniques de caractérisation mises en œuvre .....	57
II.3.3.1. Caractérisation des encres .....	57
II.3.3.2. Caractérisation des dépôts après impression et consolidation .....	57
II.4. Incidence sur l'organisation de la mésoporosité de facteurs propres à l'encre ou au procédé de mise en œuvre .....	58
II.4.1. Influence de paramètres intrinsèques à la formulation des encres sur les cinétiques de condensation des sols et leurs propriétés physico-chimiques .....	58
II.4.1.1. Cinétiques de condensation des sols pour différents taux d'AzPTES .....	58
II.4.1.1.1. Etude de l'incorporation des molécules de TFTS et d'AzPTES (espèces $T_n$ ) .....	58
II.4.1.1.2. Etude de la condensation du TEOS (espèces $Q_n$ ) en fonction du taux d'AzPTES introduit .....	60
II.4.1.1.3. Bilan sur le comportement global des différents sols formulés .....	62
II.4.1.2. Contrôle des propriétés des sols avant impression .....	63
II.4.2. Evolution de la rugosité des dépôts par augmentation du nombre de couches .....	64
II.5. Influence de différents paramètres du procédé sur la structuration de la porosité, pour des encres avec 10% d'AzPTES .....	66
II.5.1. Influence du taux d'humidité relative sur la structuration de la porosité .....	66
II.5.2. Incidence du type de réseau (carré, hexagonal) sur la structuration .....	69
II.5.3. Incidence de l'espacement entre les plots sur la structuration .....	72
II.5.4. Incidence de la stratégie de dépôt (continu ou en plusieurs fois) .....	75
II.5.5. Incidence du nombre de couches .....	77
II.6. Influence du taux d'AzPTES sur la structuration de la porosité .....	80
II.6.1.1. Etude de la structuration en fonction du taux d'AzPTES .....	80
II.6.1.2. Etude des paramètres du réseau poreux en fonction du taux d'AzPTES .....	83





II.6.1.3. Conclusion sur l'organisation de la structuration en fonction du taux d'AzPTES .....	86
II.7. Importance relative des différents facteurs sur la structuration : tests croisés .....	87
II.8. Vers une étape de pré-industrialisation : influence du traitement de consolidation .....	89
II.8.1. Influence du temps de séchage avant recuit sur la structuration de la porosité.....	90
II.8.2. Influence du type de recuit : essais par recuit photonique.....	92
II.8.2.1. Tests préliminaires de recuit et caractérisation par microscopie.....	92
II.8.2.2. Influence du recuit photonique sur la structuration de la mésoporosité.....	94
II.8.2.3. Influence du recuit photonique sur la chimie du matériau et sur la fonctionnalisation .....	95
II.8.2.4. Influence du recuit photonique sur la fonctionnalisation par chimie <i>click</i> .....	96
II.8.2.5. Conclusions sur le recuit photonique.....	97
II.9. Conclusions générales sur la structuration de la mésoporosité .....	98
Sources – Chapitre 2.....	99



## Chapitre II. Réalisation par impression jet d'encre (IJP) de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée

---

Le procédé sol-gel est une voie de réalisation de dépôt par « chimie douce », en général à température ambiante et peu coûteux, avec des précurseurs faciles d'utilisation. Il brille aussi par les multiples déclinaisons de ses domaines d'applications, parmi lesquels il est possible de citer, de façon non exhaustive : des systèmes pour de la détection de gaz polluants [1], des revêtements antireflets, ou protecteurs optiques [2] ou sur les vitres de certains véhicules pour l'aéronautique [3], des revêtements hydrophobes autonettoyants dans l'habitat et l'industrie [4], des revêtements anticorrosion [5] pour les transports et l'habitat, des films à faible constante diélectrique pour l'électronique [6], des applications en tant que barrière thermique [7], ou encore pour des applications biomédicales [8], que ce soit pour de l'encapsulation de biomolécules dans une matrice sol-gel, comme pour des biomolécules greffées en surface d'un matériau.

Le procédé sol-gel permet d'obtenir des matériaux mésoporeux, *i.e.* avec des pores de 2 à 50 nm, qui offrent beaucoup de possibilités de fonctionnalisation et d'architectures complexes. Ils ont généralement une surface spécifique importante (jusqu'à 1200 m<sup>2</sup>/g) et une mésoporosité monodisperse et contrôlable [9], qui maximisent leurs propriétés. En particulier, la silice obtenue par voie sol-gel s'avère particulièrement intéressante pour l'élaboration de biocapteurs optiques, du fait de sa transparence dans l'UV et le visible, et convient ainsi pour des techniques de détection par absorbance, réflexion, fluorescence ou luminescence.

De nombreux procédés permettent de mettre en forme ces matériaux mésoporeux, comme les procédés *dip coating*, *spin coating* et aérosol, propres aux revêtements sol-gel, ou encore le micromoulage de couches minces, la photopolymérisation UV, la lithographie *micro-pen* ou par microcontact, ainsi que l'impression jet d'encre [10]. Ces procédés ont tous des avantages et des inconvénients, et le procédé retenu doit être en adéquation avec les contraintes du système utilisé et de l'application recherchée. Dans le cas d'une sonde composée d'une fibre optique ayant une surface d'impression d'environ 1 mm de diamètre, seule l'impression jet d'encre s'avère suffisamment pertinente pour réaliser des dépôts avec une résolution et une précision suffisante, tout en garantissant une intégrité de ces dépôts.

Dans ce chapitre, l'état de l'art sera tout d'abord présenté, concernant le procédé sol-gel et les différentes voies envisageables pour réaliser des dépôts de silice mésoporeuse par voie sol-gel. Les résultats des études antérieures, portant sur la réalisation de réseaux de microplots de silice mésoporeuse, seront ensuite résumés, avant de développer les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse.



## II.1. Techniques de dépôts de matériaux mésoporeux

### II.1.1. Procédé sol-gel

Le procédé sol-gel [11] consiste à former un réseau inorganique à partir d'une solution de précurseurs polymérisables dans un solvant, par chimie douce, *i.e.* dans des conditions normales de température et de pression. Le précurseur inorganique utilisé est un **alcoxyde métallique  $M(OR)_n$** , où **M est un métal de coordinence n et R un groupement alkyle ( $C_nH_{2n+1}$ )**. Plusieurs candidats sont alors possibles pour l'élément M, parmi lesquels le silicium, le titane, le zirconium, l'aluminium ou encore le vanadium, *etc.*

La suspension colloïdale initiale de précurseurs, formée **d'entités de quelques nanomètres (oligomères)**, va polymériser et devenir de plus en plus visqueuse par percolation des oligomères, jusqu'à former un gel. La polymérisation s'effectue en deux temps : **l'hydrolyse**, conduisant à la formation des oligomères, suivie de la **condensation** (oxolation et alcoxolation), amenant à la percolation des oligomères pour former un squelette (Figure 15).

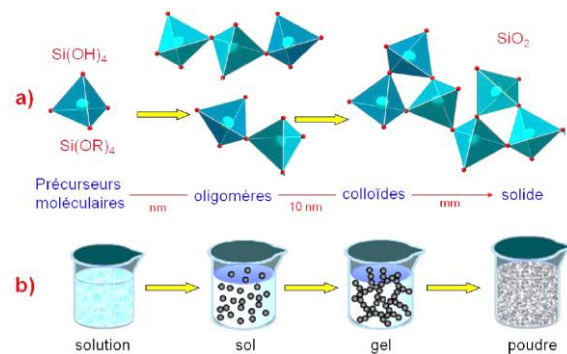
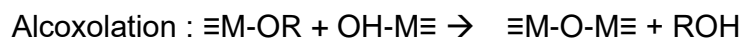
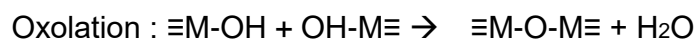
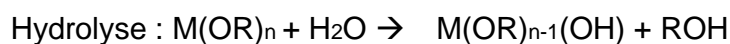


Figure 15 – Sol-gel de silice : polymérisation inorganique (a) et schéma du procédé observé à l'échelle macroscopique (b)

**Les cinétiques d'hydrolyse et de condensation régissent la formation des matériaux sol-gel** et ces équations de réaction sont présentées ci-dessous :



Les conditions opératoires qui régissent ces réactions sont multiples, à savoir par exemple la nature du solvant utilisé pour solubiliser le précurseur, la concentration en précurseur, le pH de la solution, la température, la quantité d'eau, *etc.* La dépendance de la formation de silice à partir du précurseur TEOS (orthosilicate de tétraéthyle, de formule  $Si(OC_2H_5)_4$ ) en solution dans de l'éthanol, en fonction du pH en solution est illustrée Figure 16.

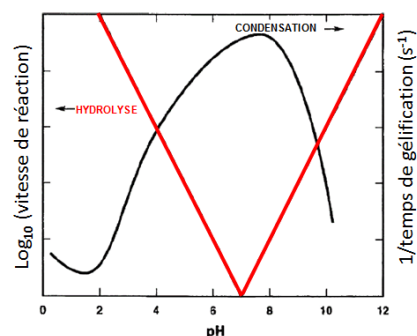


Figure 16 – Influence du pH sur la cinétique d'hydrolyse-condensation du TEOS [12]



Pour des pH faibles, la réaction d'hydrolyse est favorisée, mais la condensation est lente. En revanche, pour des pH neutres, soit autour de 7, l'hydrolyse est faible et la condensation est forte. Ces cinétiques expliquent que le précurseur ait différents degrés d'hydrolyse, et par la suite, différents degrés de polymérisation, illustré pour le TEOS par la concentration en espèces  $Q_i$  (oligomères de silice) contenues dans la solution (Figure 17). La structure du réseau formé est très dépendante du type de catalyse et du degré de polymérisation des oligomères formés (teneurs en espèces  $Q_i$ ).

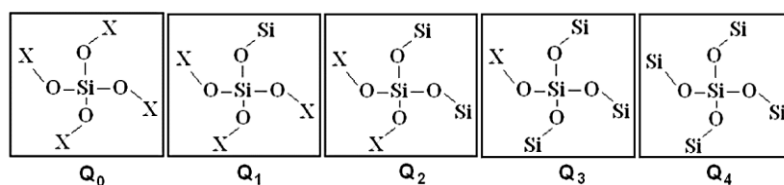


Figure 17 – Espèces  $Q_i$  ( $0 \leq i \leq 4$ ) obtenues lors de la condensation du TEOS ( $X = H$  ou  $X = C_2H_5$ )

Il convient de bien choisir les conditions opératoires, dont le type de catalyseur pour influencer le pH [13]. Le type de catalyseur ainsi que le pH déterminent différents temps de gélification. En effet, des acides forts (HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>...) utilisés à pH très faibles (< 0,05) donnent lieu à une condensation lente et un temps de gélification important. Des acides moins forts (CH<sub>3</sub>COOH) utilisés à pH plus élevés (3,70) donnent une condensation plus rapide et un temps de gélification moins important.

L'utilisation de ces nombreux paramètres (type de précurseur et concentration, solvant utilisé, pH de la solution, quantité d'eau, etc.) aboutit à des propriétés différentes du matériau (degré d'hydrolyse et de condensation, morphologie du réseau, temps de gélification). Cela laisse alors place à une multitude de voies pour l'utilisation du procédé sol-gel (Figure 18).

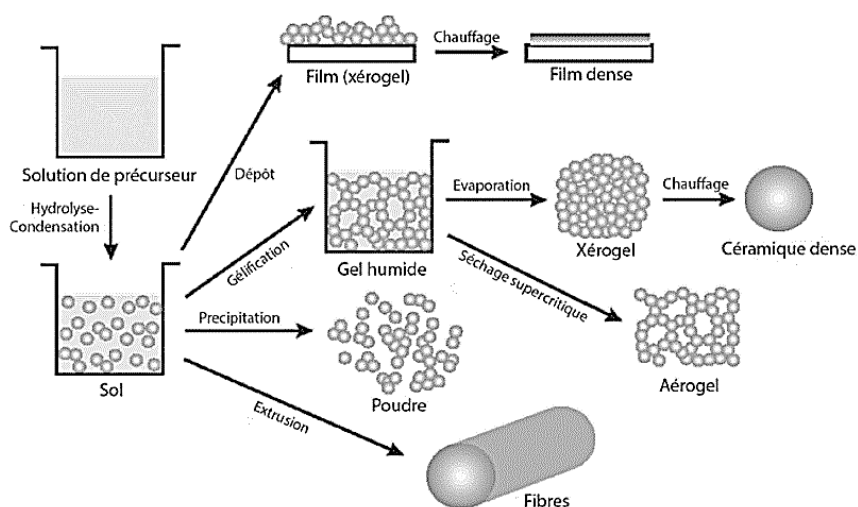


Figure 18 – Différentes possibilités offertes par le procédé sol-gel [14]



## II.1.2. Structuration des matériaux mésoporeux

### II.1.2.1. Mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation (EISA)

Le mécanisme d'auto-assemblage par évaporation (EISA : *Evaporation-Induced Self-Assembly*) a été mis en évidence en 1992 par des chercheurs de la société *Mobil*. Ceux-ci ont montré que l'utilisation d'une structure secondaire servant d'agent structurant, permet l'organisation des précurseurs polymériques selon une structure particulière, lors de la condensation du réseau inorganique. La mésoporosité est monodisperse, mais également organisée périodiquement dans la matrice inorganique qui résulte de ce phénomène [15]. Cet auto-assemblage se définit comme une organisation spontanée du matériau, grâce à des interactions non-covalentes. Le principe de ce mécanisme d'EISA est présenté en Figure 19.

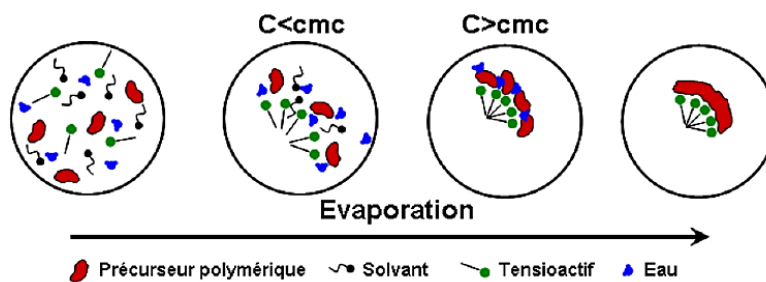


Figure 19 – Mécanisme d'auto-assemblage par évaporation (EISA) de solvant : formation de micelles

Le tensioactif est l'agent structurant utilisé pour organiser le matériau et créer artificiellement la porosité par encombrement stérique. Une solution est préparée à partir des précurseurs polymériques, du solvant, du tensioactif et de l'eau. Il faut garantir que la concentration initiale en tensioactif ( $C_0$ ) soit très inférieure à la concentration micellaire critique ( $C_{MC}$ ). Au cours du procédé, l'évaporation du solvant permet de concentrer le dépôt en eau et en espèces non volatiles (précurseurs et tensioactif). Lorsque la concentration en tensioactif atteint la concentration micellaire critique, des micelles de tensioactif se forment par regroupement des parties hydrophobes au centre des micelles, les parties hydrophiles étant orientées vers l'extérieur des micelles. Les précurseurs ou oligomères, également hydrophiles, se répartissent alors autour des micelles, afin de minimiser l'énergie de surface du système. L'évaporation du solvant finit ensuite d'organiser le matériau. Des exemples de structures obtenues sont donnés en Figure 20 [16].

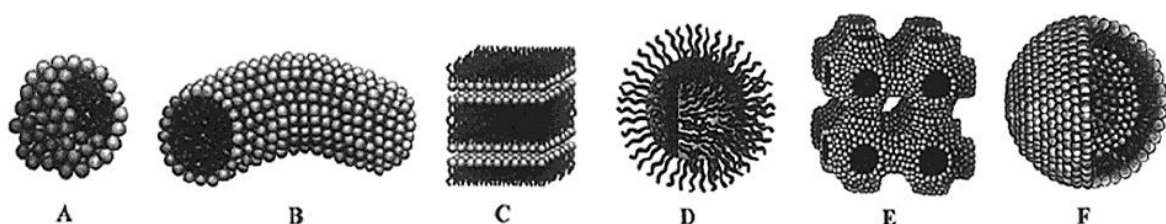


Figure 20 – Structures micellaires possibles : sphérique (a), cylindrique (b), lamellaire (c), micelle inverse (d), phase continue (e) ou liposome (f) [16]



### II.1.2.2. Différents types de tensioactifs pour différents types de structure de porosité

Différents types de tensioactifs sont utilisés pour la voie sol-gel :

- Les **tensioactifs anioniques**, où le groupement hydrophile porte une charge négative, comme pour les sulfates, les sulfonates, les phosphates et les acides carboxyliques [17].
- Les **tensioactifs cationiques**, où le groupement hydrophile porte une charge positive, comme pour les sels d'alkylammonium, les sels de céthyléthylpiperidinium, et les sels bi-chaînes (dialkyl-diméthylammonium) [17]. Le CTAB ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$ ) ou bromure de céthyltriméthylammonium, utilisé avec un précurseur de silice permet d'obtenir des pores de taille entre 1,8 et 3,7 nm, en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle [18]. Les travaux de l'équipe de David Grosso ont permis de montrer qu'il est possible d'avoir plusieurs types de structuration de la porosité avec ce type de tensioactif [19]–[21].
- Les **tensioactifs non-ioniques** ou neutres pour lesquels le groupement hydrophile n'est pas chargé, comme avec les amines primaires [22] et les copolymères triblocs [23].

Les copolymères triblocs possèdent deux blocs Poly-Ethylène-Oxyde (PEO, de formule  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ) et un bloc central Poly-Propylène-Oxyde (PPO, de formule  $\text{OCH}_2\text{CHCH}_3$ ). Ils sont représentés usuellement par la formule **PEO<sub>n</sub>-PPO<sub>m</sub>-PEO<sub>n</sub>** où n est le nombre de répétitions de la chaîne PEO et m le nombre de répétitions de la chaîne PPO. Le type de micelles formées est déterminé par le rapport  $n_{\text{EO}}/n_{\text{PO}}$  [24], *i.e.* **n/m**. En effet, **plus la chaîne PEO hydrophile est longue, plus la courbure des micelles est importante**, ce qui conduit à former des phases cubiques. En revanche, lorsque la taille des blocs PEO hydrophiles diminue, la phase cubique puis la phase hexagonale disparaissent pour donner un système où la phase lamellaire domine (Tableau 4).

Tableau 4 – Première mésophase formée une fois la concentration micellaire critique atteinte, pour différents copolymères triblocs en fonction du rapport  $n_{\text{EO}}/n_{\text{PO}}$  [24]

$n_{\text{EO}}/n_{\text{PO}}$	$\ll 0,1$	$\sim 0,15$	$\sim 0,25$	$\geq 0,5$
Phase formée	insoluble	lamellaire	hexagonale 2D	cubique
Exemples	-	L121, L122	P123	F127

Une fois en présence du précurseur polymérisable, **les phases formées dépendent également du rapport tensioactif/précurseur**, qui est un indicateur de l'arrangement du précurseur autour des micelles de tensioactif, une fois la concentration micellaire critique atteinte, comme illustré dans les travaux de Cagnol *et al.* [19].



## II.1.3. Fonctionnalisation de matériaux mésoporeux : le cas de la silice mésoporeuse

La fonctionnalisation de la silice mésoporeuse peut intervenir de deux façons : soit en **étape post-traitement par silylation**, soit en **incorporation dans le réseau de silice par co-condensation** (voie *one-pot*).

### II.1.3.1. Fonctionnalisation post-traitement par silylation

La fonctionnalisation post-traitement par silylation consiste à faire réagir les silanols (-SiOH) de surface, ou dans les pores rendus accessibles après élimination du tensioactif, avec des groupements réactifs. Des exemples sont donnés ci-dessous [25] :

- cas d'un chlorosilane :  $\equiv \text{Si-OH} + \text{Cl-SiR}_3 \xrightarrow{\text{base, } 25^\circ\text{C}} \equiv \text{Si-O-SiR}_3 + \text{HCl}$
- cas d'un alcoxyasilane :  $\equiv \text{Si-OH} + \text{R}'\text{O-SiR}_3 \xrightarrow{100^\circ\text{C}} \equiv \text{Si-O-SiR}_3 + \text{HOR}'$
- cas d'un silazane :  $2 \equiv \text{Si-OH} + \text{HN}(\text{SiR}_3)_2 \xrightarrow{25^\circ\text{C}} 2 \equiv \text{Si-O-SiR}_3 + \text{NH}_3$

Néanmoins, la formation des liaisons silanols (-SiOH) est difficile à maîtriser. En effet, un traitement thermique à 400-450 °C peut être effectué [26], ou bien une autre voie nécessite l'adsorption d'une couche d'eau en surface, mais la quantité d'eau ne doit pas être trop importante, au risque de conduire à une polymérisation non contrôlée du matériau à greffer [27]. Cette voie présente cependant beaucoup de fonctionnalisations possibles (Figure 21).

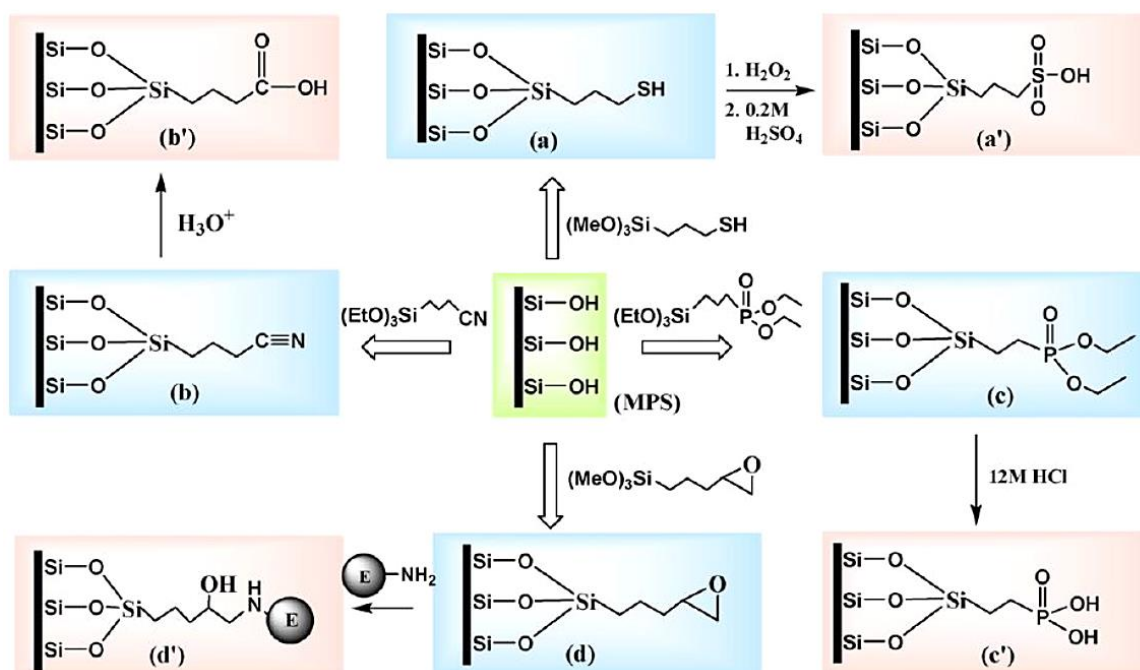


Figure 21 – Différentes fonctionnalisations de silice mésoporeuse : (a) thiol, (a') acide sulfonique, (b) nitrile, (b') acide carboxylique, (c) diéthylester, (c') acide phosphorique, (d) époxyde [28]



### II.1.3.2. Fonctionnalisation *one-pot* par co-condensation

Un moyen pour garantir une fonctionnalisation homogène de la silice consiste à introduire directement l'agent de fonctionnalisation dans l'encre lors de la formulation. Les précurseurs sont donc à la fois des **tétra-alcoxysilanes (Si(OR)<sub>4</sub>)** comme le TEOS, et des organosilanes, en général des **tri-alcoxysilanes (R'Si(OR)<sub>3</sub>)**. Ces deux types de précurseurs subissent les réactions d'hydrolyse et de condensation, en interagissant ensemble par co-condensation (Figure 22).

Cette méthode est très souvent utilisée car elle est rapide, simple et ne présente pas beaucoup de contrainte sur l'organosilane à utiliser, du moment que celui-ci est soluble dans la solution de départ. Concernant l'élimination du tensioactif après réalisation du matériau, celle-ci doit se faire à basse température (typiquement par lavage), afin de ne pas dégrader la fonction organique greffée.

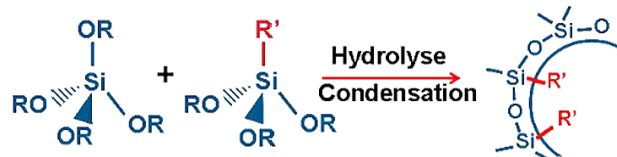


Figure 22 – Principe de co-condensation entre un tétra-alcoxysilane et un tri-alcoxysilane

Concernant cette méthode de fonctionnalisation *one-pot*, plusieurs résultats ont été obtenus précédemment :

- **L'organisation du matériau diminue par augmentation de la teneur en organosilane.** Ceci est lié au fait que des espèces Q<sub>4</sub> issues de la condensation du tétra-alcoxysilane (TEOS) sont remplacées par des espèces T<sub>3</sub> plus flexibles. De plus, **il existe une limite maximale d'incorporation des silanes**, au-delà de laquelle il est difficile de garder une structuration du matériau [29]–[31]. Cela peut même conduire à l'apparition de nouvelles mésophases, comme l'ont montré Babonneau *et al.* [32].
- L'optimum de structuration du matériau est obtenu pour un temps de vieillissement du sol plus faible, par rapport à un sol de silice pure [31].
- Les structures à matrice hybride sont caractérisées par des paramètres de maille plus faibles, par rapport à ceux d'une structure à matrice de silice seule [31].
- **Il est difficile de savoir clairement si les groupes fonctionnels sont greffés dans les murs de silice ou dans la porosité** [29], [33], [34].

Les travaux portant sur la réalisation de microplots de silice mésoporeuse ont fait appel à cette voie de fonctionnalisation.





## II.2. Etat de l'art sur la réalisation de microplots de silice mésoporeuse par impression jet d'encre

L'impression jet d'encre est le procédé choisi pour la réalisation de microplots de silice mésoporeuse. Un large spectre de fonctionnalisations est possible pour ces microplots, ce qui convient parfaitement pour l'élaboration de capteurs multifonctionnels, comme une sonde de diagnostic de cellules cancéreuses.

Cette étude se base sur des travaux antérieurs qui ont été réalisés au laboratoire IRCER (anciennement SPCTS). La possibilité de réaliser des dépôts de microplots a tout d'abord été mise en évidence grâce aux travaux de thèse de Marion Mougenot [9]. Une première fonctionnalisation *in situ* avec un agent fluoré hydrophobe, le TFTS, a été réalisée et étudiée de façon plus approfondie grâce aux travaux de Bruno Fousseret [35]. Enfin, en vue de réaliser des capteurs biologiques, une autre fonctionnalisation *in situ* a été réalisée, avec un composant apportant des fonctions azotures ( $-N_3$ ), l'AzPTES, au cours des travaux d'Olivia De Los Cobos [36]. Ces différents travaux, et les avancées qu'ils ont permises, seront développés par la suite.

### II.2.1. Formulations précédemment testées

Au cours des travaux antérieurs, les différentes encres ont été synthétisées à partir de la formulation de base suivante, à savoir :

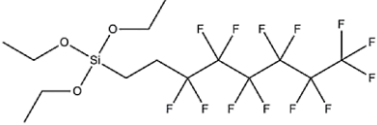
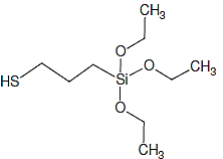
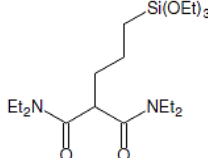
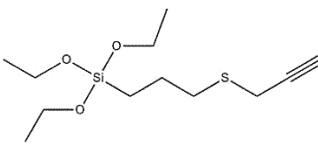
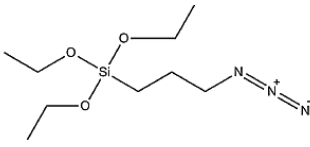
- **Le TEOS** (OrthoSilicate de TétraEthyle,  $Si(OC_2H_5)_4$ ), précurseur majoritaire et formateur du réseau de silice.
- **L'éthanol absolu**, solvant permettant de solubiliser les différents précurseurs et d'obtenir un mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation (EISA).
- **Le pluronic F127** ( $PEO_{106}-PPO_{70}-PEO_{106}$ ), tensioactif copolymère tribloc non-ionique, utilisé comme agent structurant responsable de la mésoporosité.
- **L'eau acidifiée par de l'acide nitrique** ( $H_2O-HNO_3$ ,  $c = 0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ ), diminue le pH de la solution pour assurer une hydrolyse rapide et une faible condensation du précurseur de silice afin de contrôler la taille des oligomères pour assurer une organisation de la mésoporosité et éviter le bouchage des buses d'impression.

**La syntaxe  $TF_{0.006}E_5Et_{20}$  sera utilisée pour décrire les proportions molaires d'une formulation d'encre, avec T pour TEOS, F pour F127, E pour eau-acide et Et pour éthanol. Dans le cas de la fonctionnalisation *in situ* par ajout d'un organosilane X en proportion Y, la syntaxe sera alors  $TX_YF_{0.006}E_5Et_{20}$ .**



Différents organosilanes ont été incorporés dans la formulation de base (voie *one-pot*) en vue de modifier les propriétés des sols et des dépôts (Tableau 5). Dans ce but, différentes formulations ont ainsi été réalisées.

Tableau 5 – Récapitulatif des différents organosilanes testés dans les travaux antérieurs à l'IRCER

Organosilanes	Formules et masses molaires	Intérêt de l'organosilane	Références
<b>TFTS (Tf)</b> Tridécafluoro-1,1,2,2-tétrahydrooctyl-triéthoxysilane	<b>F<sub>3</sub>C(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub></b>  MW = 510,36 g.mol <sup>-1</sup>	- Composé hydrophobe qui facilite l'éjection (la plaque à buses étant hydrophile) - Diminution du mouillage et de l'étalement sur le substrat	[9] [35] [36] [37]
<b>MPTES (M)</b> 3-mercatopropyl-triéthoxysilane	<b>HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub></b>  MW = 238,42 g.mol <sup>-1</sup>	- Capture de métaux lourds tels que le mercure, l'or - Greffage biologique thiol-maléimide	[9] [35] [38]
<b>Malonamide (Mal)</b> N,N,N',N'-tétraéthyl-2-triéthoxysilylpropyl-1,3-propanediamide	<b>(NOC<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub></b>  MW = 418 g.mol <sup>-1</sup>	- Capture de métaux lourds tels que les lanthanides (l'euprium, l'erbium, etc.) ou les actinides (plutonium, americium, etc.) - Capture de nanoparticules d'or	[35] [39] [40]
<b>PTPTES (S)</b> 3-propargylthiopropyl-triéthoxysilane	<b>HC≡CCH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub></b>  MW = 306 g.mol <sup>-1</sup>	- Fonctionnalisation <b>alcynes</b> - Greffage de biomolécules fonctionnalisées <b>azotures</b> par chimie <i>click</i> azotures-alcynes catalysée au cuivre I (CuAAC)	[36]
<b>AzPTES (Az)</b> 3-azidopropyl-triéthoxysilane	<b>N<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub></b>  MW = 247 g.mol <sup>-1</sup>	- Fonctionnalisation <b>azotures</b> - Greffage de biomolécules fonctionnalisées <b>alcynes</b> par chimie <i>click</i> azotures-alcynes catalysée au cuivre I (CuAAC)	[36] [41] [42] [43]

La synthèse des travaux antérieurs, présentée ci-après, s'attachera aux résultats marquants obtenus pour des formulations correspondant à des ajouts d'organosilanes du type **TFTS** ou **AzPTES**, dans la mesure où les travaux de thèse font appel à ce type de formulation.



## II.2.2. Fonctionnalisation *in situ* avec ajout de TFTS : $TTf_xF_{0,006}E_5Et_{20}$ (X = 5% ou 10%)

Marion Mougenot s'est attachée à montrer la faisabilité de réaliser des réseaux de microplots de silice mésoporeuse par le procédé d'impression jet d'encre. Pour les premières formulations testées, adaptées des travaux de Grosso *et al.* [44], [45], les proportions de la formulation TEOS/F127/eau/éthanol ont été ajustées afin d'obtenir une solution avec des propriétés physico-chimiques (viscosité, tension de surface) compatibles avec le procédé d'impression jet d'encre. **Elle a ainsi abouti à la formulation  $TF_{0,006}E_5Et_{20}$ .**

Afin de fiabiliser l'éjection des sols, **une fonctionnalisation *in situ* des plots de silice a été mise en œuvre grâce au composé hydrophobe TFTS. Le TFTS a été introduit dans la formulation en plus du TEOS**, en lien avec les travaux de Brinker *et al.* [37], [46], bien que l'ajout en substitution du TEOS soit possible également [47], [48]. L'ajout de TFTS dans ce cas vise à augmenter le caractère hydrophobe du sol afin de limiter le phénomène de nappage de la tête d'impression, celle-ci ayant un caractère hydrophobe. **La formulation alors testée contient 5% molaires de TFTS, c'est-à-dire la formulation  $TTf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$** , et dont les caractéristiques (viscosité, tension de surface) sont compatibles avec l'impression jet d'encre.

L'étude du vieillissement du sol  $TTf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$  réalisée par RMN liquide du  $^{29}Si$  montre que **la condensation du sol est beaucoup plus rapide avec 5% molaire de TFTS**, par rapport au sol  $TF_{0,006}E_5Et_{20}$  qui ne contient pas de TFTS (Figure 23). En effet, les espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  sont en quantités égales au bout de 30 h de vieillissement pour le sol avec 5% molaire de TFTS, contre 45 h pour le sol sans TFTS. Ceci serait dû à l'augmentation de la teneur en silicium dans la solution. Ceci a aussi été mis en évidence par le biais d'analyses DLS [9], qui montrent des oligomères de taille plus importante avec 5% molaire de TFTS et pour un même temps de vieillissement que le sol sans TFTS. Marion Mougenot a expliqué ceci par le fait que le TFTS, en condensant avec le TEOS jouerait le rôle de pseudo-tensioactif.

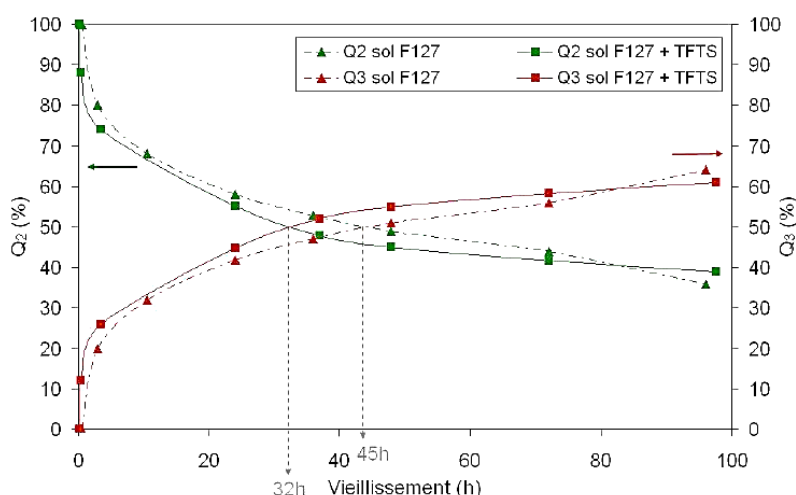


Figure 23 – Variation des espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  (somme normalisée à 100%) au cours du temps pour un sol sans TFTS ( $TF_{0,006}E_5Et_{20}$ ) et un sol avec 5% molaire de TFTS ( $TTf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ) [9]



Les dépôts, réalisés sur wafers de silicium, ont été caractérisés par diverses techniques (DRX, MET, GISAXS). Alors que le dépôt ne contenant pas de TFTS est globalement non structuré (Figure 24-a), celui avec TFTS présente une structure de la porosité organisée, caractéristique d'une structure de type rectangulaire centrée (Figure 24-b) et qui a aussi été mise en évidence en microscopie électronique en transmission (Figure 24-c, d & e).

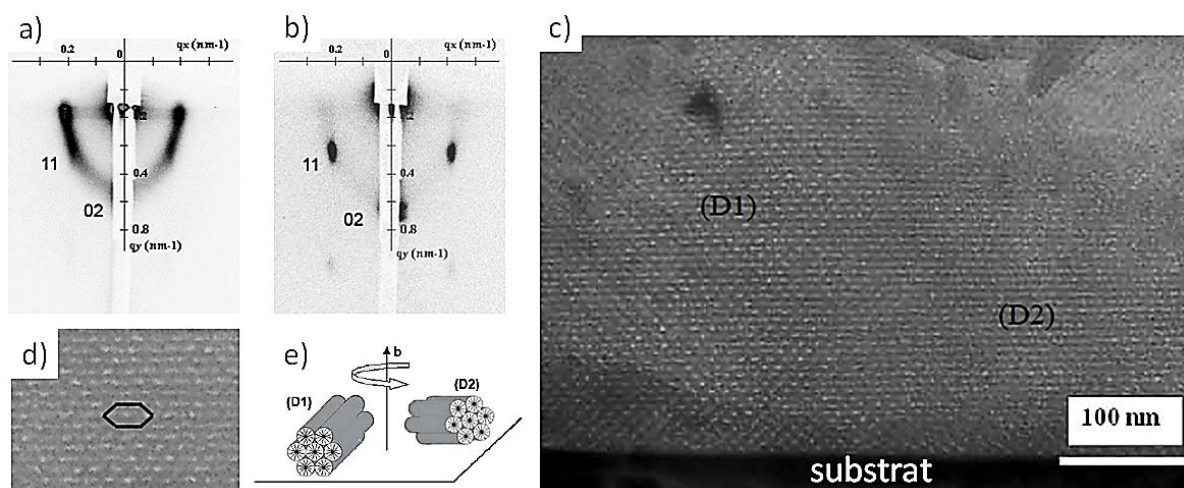


Figure 24 – Clichés GISAXS de réseaux monocouches réalisés avec un sol sans TFTS (a) ou avec 5% molaire de TFTS (b). Image MET de la section d'un microplot monocouche imprimé à partir d'un sol avec 5% molaire de TFTS (c). Les domaines présentent la structure rectangulaire centrée vue de face (d) comme pour le domaine D1, ou vue à 90° (e) comme pour le domaine D2 [9].

**Un réseau monocouche est mieux structuré pour un sol avec 5% de TFTS que sans TFTS.** Marion Mougnot a expliqué cela par le rôle de co-tensioactif du TFTS qui oriente les parties hydrophobes vers la porosité et les parties hydrophiles vers la silice, ce qui accélère la cinétique d'auto-assemblage des micelles cylindriques. Ceci permet au système d'atteindre un état final de structuration plus avancé. **L'augmentation du temps de séchage entre les couches (correspondant à des gouttes successives), de 1 min à 10 min, permet également d'améliorer la structuration des échantillons,** chacune des couches étant mieux structurée avant le dépôt de la goutte suivante.

L'observation de la section d'un plot a été réalisée en MET sur un échantillon présentant 5 couches et 10 min de séchage entre couches, à partir du sol  $\text{TTf}_{0,05}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  (Figure 25). Ces clichés mettent en évidence le fait que **l'échantillon est globalement très bien organisé, avec cependant la présence d'une structure vermiculaire désorganisée au cœur du microplot,** probablement en lien avec une accumulation de solvant à cœur. D'autre part, les micelles sont organisées en domaines différents. **Certains domaines présentent des micelles orientées parallèlement au substrat, avec de multiples orientations dans le plan du substrat** (Figure 25).



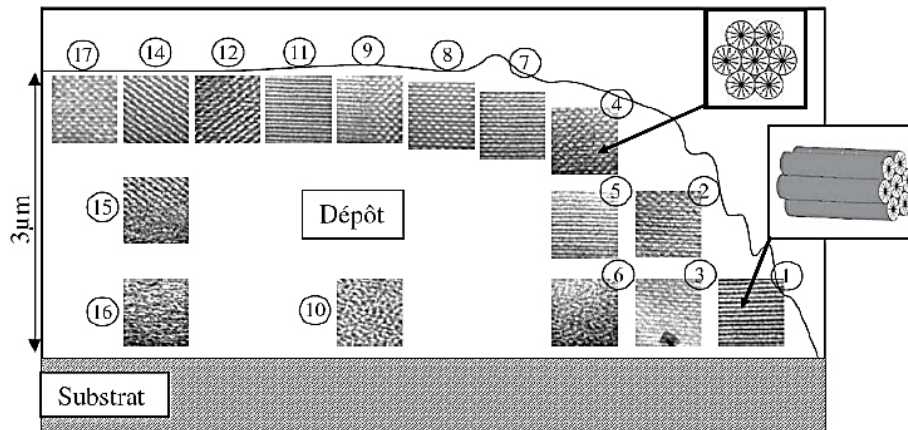


Figure 25 – Schéma des observations MET de la section transverse d'un microplot de 5 couches réalisés à partir du sol  $Tf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$  et un temps de séchage de 10 min entre chaque couche [9]

D'autres paramètres ont été étudiés, parmi lesquels :

- **La diminution du volume déposé, qui permet d'améliorer la structuration du matériau.** D'autre part, les dépôts ainsi générés sont moins sensibles aux changements d'humidité relative.
- **Le temps de vieillissement du sol  $Tf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$ , qui a été optimisé.** Le temps de vieillissement précédemment utilisé était de 4 jours en se basant sur des travaux similaires [44], [49]. Cependant, **un temps de vieillissement du sol de 48 h conduit à un meilleur degré de structuration.** Par ailleurs, **une augmentation du taux de TFTS de 5% à 10% nuit à la structuration des dépôts** [9].

Les résultats importants qui ont été obtenus précédemment sont synthétisés dans la figure ci-après (Figure 26).

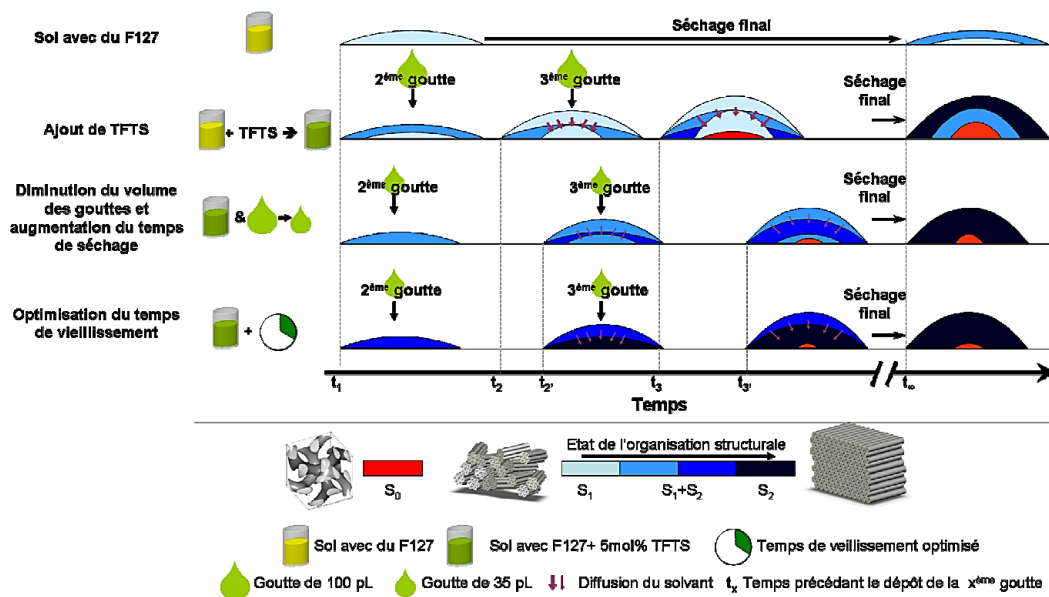


Figure 26 – Evolution de la structuration d'un microplot en fonction des paramètres étudiés [50]



### II.2.3. Fonctionnalisation *in situ* avec ajout d'AzPTES : $TTf_xAz_yF_{0.006}E_5Et_{20}$ (pour $X = 5\%$ , $Y = 5\%$ , $10\%$ et $15\%$ – pour $X = 2,5\%$ , $Y = 10\%$ )

L'ajout d'AzPTES à la formulation permet d'apporter des fonctions azotures au matériau, et de permettre ultérieurement sa fonctionnalisation, par réaction avec des fonctions alcynes, ce qui sera détaillé au chapitre III.

L'ajout de 10% d'AzPTES à la solution standard  $TTf_{0,05}F_{0,006}E_5Et_{20}$  ralentit la cinétique de condensation des oligomères de silice [36]. Les analyses par DLS confirment également cela, car pour 48 h de vieillissement, les oligomères de silice sont de taille supérieure pour le sol sans azoture par rapport au sol avec azotures.

Seule la structure vermiculaire a été observée pour le sol  $TTf_{0,05}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ , quel que soit le temps de vieillissement du sol, visible par la présence d'un anneau de diffusion large et peu intense sur les clichés GISAXS (Figure 27).

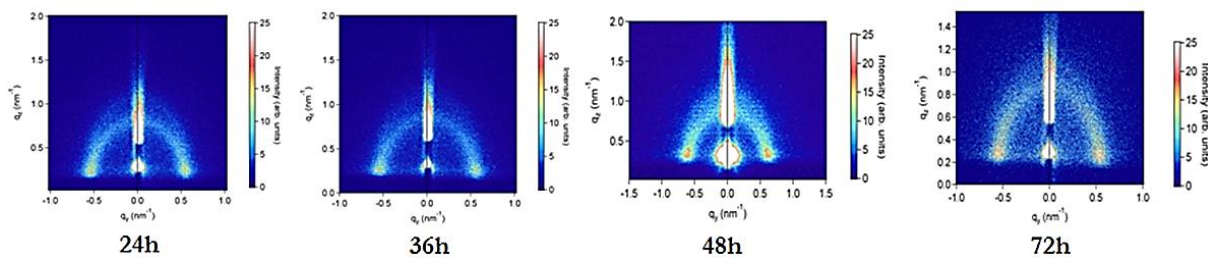


Figure 27 – Clichés GISAXS de réseaux de microplots de 5 couches du sol  $TTf_{0,05}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$  pour différents temps de vieillissement [36]

De même, la structure reste vermiculaire pour des taux d'azotures de 5, 10 et 15%, toujours avec 5% de TFTS. Le taux de TFTS a alors été diminué à 2,5% et cette diminution a été étudiée en RMN liquide du  $^{29}Si$  (Figure 28).

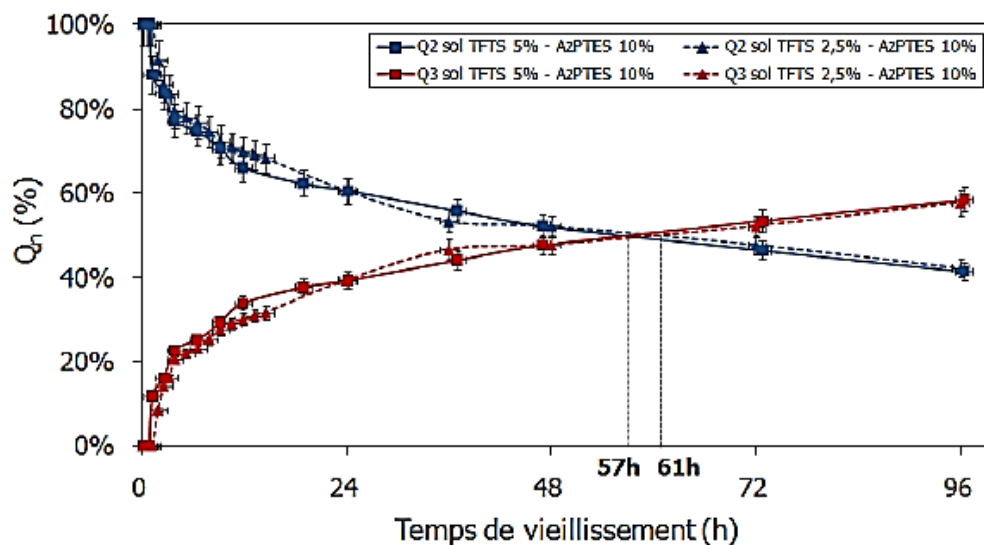


Figure 28 – Variation des espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  au cours du temps de vieillissement pour un sol contenant 2,5% de TFTS ( $TTf_{0,025}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ) et un sol en contenant 5% ( $TTf_{0,05}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ) [36]



L'AzPTES semble avoir un effet prépondérant sur les cinétiques de condensation, par rapport à l'effet du TFTS, car la diminution du TFTS ne fait que très peu varier la condensation du sol. **De plus, la diminution du taux de TFTS de 5 à 2,5% permet l'apparition de la phase rectangulaire centrée**, visible par des taches caractéristiques de cette structure en GISAXS (Figure 29-a), et qui apparaît généralement sous forme de canaux en microscopie électronique en transmission (C1, Figure 29-b), les pores cylindriques étant vus de côté ou de dessus plutôt que de face.

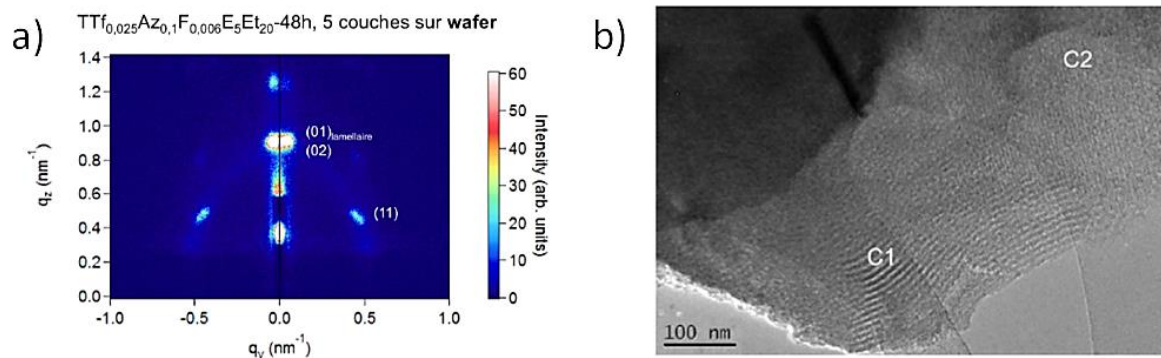


Figure 29 - Clichés GISAXS (a) et MET (b) de réseaux de microplots de 5 couches, à partir d'un sol  $TTf_{0,025}AZ_{0,1}F_{0,006}E_5Et_{20}$  sur wafer de silicium [36]

Par ailleurs, l'impression de réseaux de microplots de 5 couches avec le sol  $TTf_{0,025}AZ_{0,1}F_{0,006}E_5Et_{20}$  donne parfois des structurations organisées en surface, comme cela a été observé lors d'analyses par microscopie à force atomique (AFM) (Figure 30).

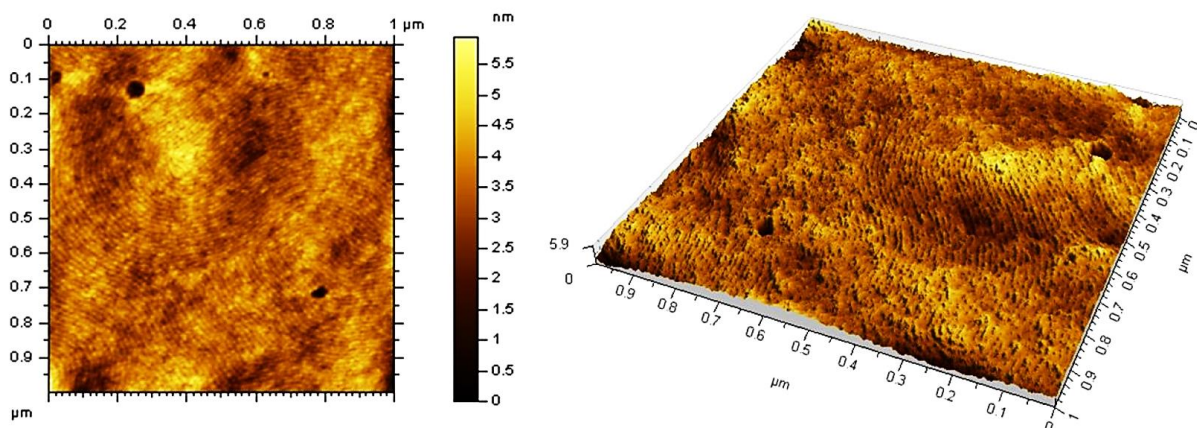


Figure 30 – Image AFM de la surface d'un microplot de 5 couches du sol  $TTf_{0,025}AZ_{0,1}F_{0,006}E_5Et_{20}$  [36]

Ces échantillons ont ensuite été fonctionnalisés post-impression par des biomolécules. L'étude précédente n'a pas permis de déterminer quel type de structuration de la porosité (vermiculaire ou rectangulaire centrée) favorise la fonctionnalisation du matériau. De plus, les conditions d'impression ne sont pas encore totalement maîtrisées et ne permettent pas de savoir l'effet des conditions opératoires sur la structuration.



## II.3. Problématique et démarche adoptée

### II.3.1. Analyse de la problématique

Compte tenu des objectifs visés définis au chapitre I, à savoir développer un dispositif présentant un maximum de sensibilité en terme de détection de cancers précoces, il est nécessaire d'**identifier les facteurs contrôlant cette sensibilité**.

**La sensibilité de détection va être essentiellement contrôlée par le mode de greffage des biomolécules** (concentration, répartition et orientation à la surface des microplots). Les biomolécules greffées ont une taille de 4 nm pour les protéines [51], de 8 à 14 nm pour les anticorps [52], [53], et sont de taille importante par rapport au diamètre des pores d'environ 6 nm. **Le greffage sera donc essentiellement un mécanisme de surface**.

Par conséquent, **le taux de greffage sera fonction de la concentration de fonctions NHS accessibles en surface des microplots**. Pour cette raison, il y a **nécessité d'optimiser l'étape de chimie *click* du pentynoate de NHS** avec les fonctions azotures présentes dans tout le volume des plots (cf. résultats présentés au chapitre III). Ceci permettra de maximiser le taux de fonctions NHS en surface des microplots, bien que **l'accessibilité des fonctions NHS soit contrôlée par la structuration de la mésoporosité**.

Par conséquent, **différents paramètres ont été testés afin de modifier la structuration de la mésoporosité et d'étudier ensuite l'incidence de la structuration sur le mode de greffage des biomolécules**. Parmi ces paramètres, il y a notamment :

- **Le taux d'AzPTES**, directement lié au taux de fonctions azotures apportées au matériau
- **L'humidité relative** lors du dépôt, qui a une influence indirecte sur l'évaporation du solvant
- **L'espacement entre les plots déposés (E), le type de réseau** (hexagonal, carré, etc.), ainsi que **la stratégie de dépôt** (cf. §II.5.4), qui influent sur la concentration locale de solvant à évaporer.
- **Le nombre de couches (N)**, car un nombre de couches important peut faire varier les conditions de séchage, en raison d'une accumulation possible de solvant dans le matériau.

Au préalable, le **vieillessement des encres** sera étudié, car les cinétiques d'hydrolyse et de condensation influent sur la taille des oligomères et sur la morphologie du réseau formé (taille des pores, épaisseurs des murs de silice, etc.). **L'étape de filtration à 1 µm** de l'encre avant impression sera aussi étudiée pour assurer une invariance de composition.

Afin d'étudier l'incidence de ces paramètres sur la structuration de la mésoporosité, différentes encres ont été formulées et des dépôts ont été réalisés par impression jet d'encre, selon les protocoles définis ci-après.





## II.3.2. Protocoles de réalisation des différents dépôts de microplots

### II.3.2.1. Préparation des encres

Les encres testées au cours de ces travaux de thèse correspondent aux sols de formulation  $\text{TF}_{0,025}\text{Az}_x\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  avec **X le taux d'AzPTES (X = 1%, 5%, 10%, 15%, ou 17,5%)**. Les constituants sont ajoutés dans l'ordre suivant :

- **Le TFTS** (TridécaFluorooctylTriéthoxySilane,  $\text{F}_3\text{C}(\text{CF}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , ABCR), agent hydrophobe, qui facilite l'éjection des sols pendant l'impression en évitant le nappage de la tête d'impression (qui a un caractère hydrophile), et diminue le mouillage et l'étalement des gouttes lors de l'impact sur le substrat.
- **L'AzPTES** (3-AzidoPropylTriéthoxySilane,  $\text{N}_3(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ , synthétisé au laboratoire AM<sub>2</sub>N-ICGM de Montpellier), qui introduit les fonctions azotures (-N<sub>3</sub>) dans la solution afin de fonctionnaliser ultérieurement le matériau (cf. chapitre III).
- **Le TEOS** (OrthoSilicate de TétraEthyle,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , Sigma-Aldrich), précurseur majoritaire et formateur du réseau de silice.
- **L'éthanol absolu** (VWR Chemicals), solvant permettant de solubiliser les différents précurseurs et d'obtenir le mécanisme d'auto-assemblage (EISA).
- **Le pluronic F127** (PEO<sub>106</sub>-PPO<sub>70</sub>-PEO<sub>106</sub>, Sigma-Aldrich), tensioactif copolymère tribloc non-ionique, utilisé comme agent structurant responsable de la mésoporosité.
- **L'eau acidifiée par de l'acide nitrique** ( $\text{H}_2\text{O}-\text{HNO}_3$ ,  $c = 0,014 \text{ mol.L}^{-1}$ ) diminue le pH de la solution pour assurer une hydrolyse rapide et une faible condensation du précurseur de silice afin de contrôler la taille des oligomères pour assurer une organisation de la mésoporosité et éviter le bouchage des buses d'impression.

### II.3.2.2. Impression des microplots

**Les échantillons sont imprimés à partir des encres préparées et en utilisant un équipement d'impression jet d'encre de type Ceraprinter X-series.** Ce procédé est explicité en Annexe 3. Ce dispositif d'impression jet d'encre pour céramiques a été développé initialement au laboratoire IRCER (anciennement SPCTS) [54] et a fait l'objet d'un dépôt de brevet [55]. Le savoir-faire a ensuite été transféré à la société Ceradrop en 2006.

**Après impression, les échantillons sont consolidés par un traitement thermique en étuve,** avec une montée lente en température (0,1 °C/min), jusqu'à un palier à 130 °C durant 2 jours, se terminant par une descente en température lente (1 °C/min).



### II.3.3. Techniques de caractérisation mises en œuvre

Différentes techniques de caractérisation ont été mises en œuvre afin de suivre toutes les étapes du procédé lors de la préparation des échantillons.

#### II.3.3.1. Caractérisation des encres

Le vieillissement des encres au cours du temps a été suivi par **résonance magnétique nucléaire (RMN)** liquide de l'élément silicium  $^{29}\text{Si}$  (cf. Annexe 4). Cette technique permet d'étudier la vitesse de condensation du sol, liée à la taille des oligomères, et aussi de déterminer un temps de vieillissement optimum pour garantir une bonne structuration des échantillons mésoporeux. Ces analyses ont été complétées avec le suivi de la taille des oligomères par **diffusion dynamique de la lumière (DLS)** (cf. Annexe 5.1.3).

Les **propriétés physico-chimiques des encres (viscosité, tension de surface, densité)** sont contrôlées avant impression (cf. Annexe 5). La **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)** en transmission (cf. Annexe 6.1.1) a permis de s'intéresser à l'éventuelle variation de composition due à l'étape de filtration à 1  $\mu\text{m}$ .

#### II.3.3.2. Caractérisation des dépôts après impression et consolidation

Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser **la structuration de la porosité du matériau** (cf. Annexe 7). En premier lieu, la **microscopie électronique en transmission (MET)**, réalisée sur des éclats de microplots déposés sur une grille à membrane, permet d'évaluer de façon globale les structures de porosité en présence, sans toutefois savoir comment s'organisent ces structures au sein du matériau. La structure de la porosité peut aussi être caractérisée de façon plus fine grâce à la **diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante (GISAXS)**, pour une certaine épaisseur de la surface, qui dépend de la profondeur de pénétration des rayons X. L'analyse GISAXS permet également de quantifier certaines dimensions du réseau de pores (désordre dans le plan et hors du plan, distances entre pores, etc.).

**La structuration de la porosité peut aussi être observée suivant la section d'un microplot**, sur environ 20  $\mu\text{m}$  de longueur, en utilisant **des lames minces préparées par sonde ionique focalisée (FIB)**, observées en MET. Pour une structure organisée ou présentant les deux types de structurations (rectangulaire centrée et vermiculaire), l'observation de la section permet de connaître les arrangements des phases entre elles ainsi que l'orientation des phases organisées. Enfin, la **microscopie à force atomique (AFM) en mode tapping** permet de caractériser la structuration de la porosité présente en surface des microplots, de façon plus locale mais avec une très bonne résolution.



## II.4. Incidence sur l'organisation de la mésoporosité de facteurs propres à l'encre ou au procédé de mise en œuvre

Cette partie vise à comprendre, quels sont les phénomènes qui régissent la structuration de la mésoporosité et comment contrôler celle-ci par le biais des paramètres procédés et/ou matériaux. Plusieurs paramètres seront traités, à savoir les propriétés des encres formulées (vieillessement, taux d'AzPTES, composition après filtration, etc.), ainsi que d'autres paramètres procédés ou encore le cycle de consolidation du réseau poreux.

### II.4.1. Influence de paramètres intrinsèques à la formulation des encres sur les cinétiques de condensation des sols et leurs propriétés physico-chimiques

#### II.4.1.1. Cinétiques de condensation des sols pour différents taux d'AzPTES

L'introduction d'AzPTES à hauteur de 10% dans un sol contenant 2,5% de TFTS ralentit les cinétiques de condensation du sol [36]. Aussi, au vu de l'application, il peut être intéressant d'augmenter le taux de fonctions azotures, afin de maximiser la fonctionnalisation du matériau. Néanmoins, la structure de la mésoporosité semble dégradée pour un taux de tri-alcoxysilanes (TFTS ou AzPTES) supérieur à 20% [29]–[32]. Afin de ne pas dépasser ce taux global de 20%, des sols ont été formulés avec 2,5% de TFTS et différents taux d'azotures, à savoir 10%, 15% et 17,5%, puis caractérisés par RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$  (Annexe 4).

##### II.4.1.1.1. Etude de l'incorporation des molécules de TFTS et d'AzPTES (espèces $T_n$ )

Pour étudier les différences engendrées par différents taux de tri-alcoxysilanes, **il est pertinent de s'intéresser surtout aux espèces  $T_n$**  (Figure 31), **caractéristiques à la fois du TFTS et de l'AzPTES** (qui possèdent les fonctions azotures fonctionnalisables). Bien qu'elles apparaissent en faible intensité, ces espèces  $T_n$  sont présentes sur l'intervalle entre -38 ppm et -70 ppm sur les spectres RMN (cf. Annexe 4.2), comme mis en évidence dans des études antérieures par rapport à l'ajout de TFTS [9].

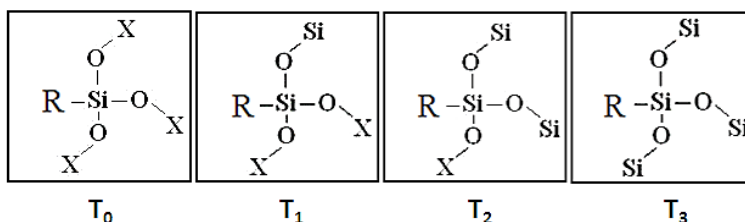


Figure 31 – Espèces  $T_n$  ( $0 \leq n \leq 3$ ) obtenues lors de l'hydrolyse-condensation d'un tri-alcoxysilane

L'analyse des espèces  $T_n$  (Tableau 6) montre une bonne condensation, qui est d'ailleurs plus rapide que celle des espèces  $Q_n$  (cf. § II.4.1.1.2), ce qui suggère une bonne incorporation de l'AzPTES et du TFTS au sein des oligomères de silice, par co-condensation avec le TEOS.



Tableau 6 – Evolution qualitative générale des espèces  $T_n$  tirée de l'observation des spectres RMN

Période	Observations et commentaires
<b>A partir de 30 min</b>	Espèces $T_0$ visibles et proportionnelles au taux d'AzPTES. Espèces $T_1$ également visibles.
<b>Entre 1 h et 3 h</b>	Apparition des espèces $T_2$ .
<b>Entre 3 h et 6 h</b>	Compétition entre les réactions $T_0 \rightarrow T_1$ et $T_1 \rightarrow T_2$ .
<b>Entre 6 h et 12 h</b>	Disparition des espèces $T_0$ . Diminution des espèces $T_1$ . Taux d'espèces $T_2$ constant qui suggère l'apparition des espèces $T_3$ .
<b>A 24 h</b>	Quantité d'espèces $T_2$ proportionnelle au taux d'AzPTES, ce qui semble indiquer que les cinétiques de condensation de l'AzPTES et du TFTS sont indépendantes du taux d'AzPTES introduit. Espèces $T_3$ visibles.
<b>A partir de 48 h</b>	Disparition des espèces $T_1$ . Présence uniquement d'espèces $T_2$ et $T_3$ , ce qui montre la bonne condensation de l'AzPTES et du TFTS. Pas d'évolution après 48 h.

D'autre part, il est possible de quantifier ces espèces  $T_n$ , avec une erreur importante (environ  $\pm 15\%$ ), du fait de la faible intensité des pics et de la présence d'un fort bruit sur les spectres RMN. Il semble alors pertinent de s'intéresser à la quantité  $T_2+T_3$  en fonction du temps de vieillissement (Figure 32).

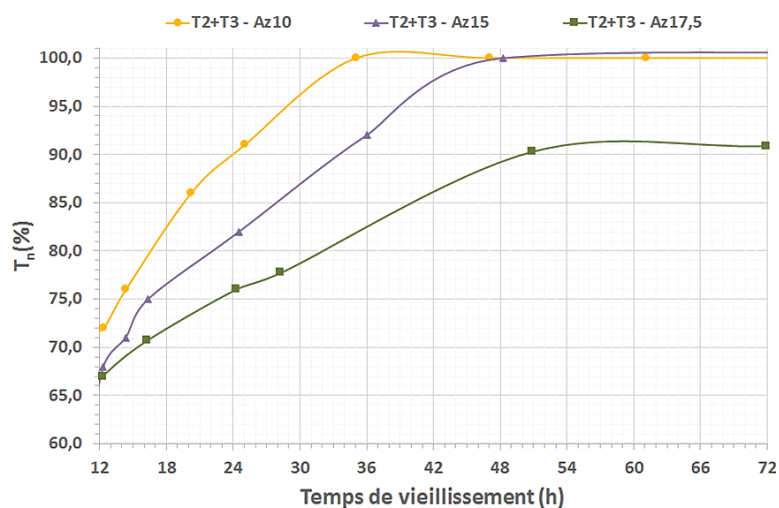


Figure 32 – Evolution des espèces  $T_2+T_3$  normalisées à 100% en fonction du temps de vieillissement

La somme des espèces  $T_n$  a été normalisée à 100% pour chaque sol, afin de raisonner de manière indépendante du taux d'AzPTES introduit et de comparer les comportements des sols entre eux. La courbe  $T_2+T_3$  (Figure 32) permet de s'intéresser à la fin de la condensation de l'AzPTES et du TFTS, lorsqu'un taux de 100% est atteint pour  $T_2+T_3$ , la cinétique  $T_2 \rightarrow T_3$



étant très lente après une trentaine d'heures. Ce taux de 100% est atteint pour  $T_2+T_3$  au bout de 24 h pour le sol Az10% et au bout de 48 h pour le sol Az15%.

Le sol Az17,5% n'atteint quant à lui jamais le taux de condensation totale. Il resterait après 48 h environ 10% d'espèces  $T_n$  autres que  $T_2$  et  $T_3$  qui ne peuvent pas condenser davantage, donc très probablement des espèces  $T_1$ . Il est en effet peu probable que ce soit des espèces  $T_0$  en raison de la cinétique rapide  $T_0 \rightarrow T_1$ . Ce comportement singulier peut s'expliquer par le fait que le sol Az17,5% est à la limite du taux de tri-alcooxysilanes incorporables dans un sol [29]–[32].

#### II.4.1.1.2. Etude de la condensation du TEOS (espèces $Q_n$ ) en fonction du taux d'AzPTES introduit

L'état de condensation d'un tétra-alcooxysilane comme le TEOS peut être caractérisé en s'intéressant aux espèces  $Q_n$  en RMN (Figure 33), dont les déplacements chimiques sont connus (cf. Annexe 4.1) [56], [57]. Il est alors possible de quantifier ces espèces  $Q_n$  sur leurs intervalles de définition en fonction du temps de vieillissement (Figure 34 à partir des spectres en Annexe 4.2).

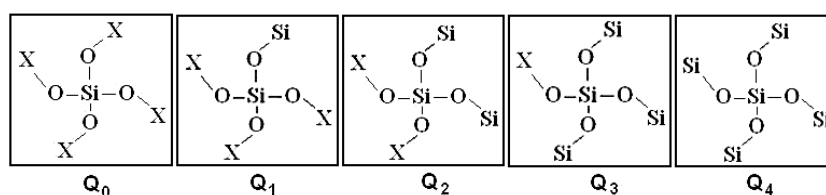


Figure 33 - Espèces  $Q_n$  ( $0 \leq n \leq 4$ ) obtenues lors de l'hydrolyse-condensation d'un tétra-alcooxysilane

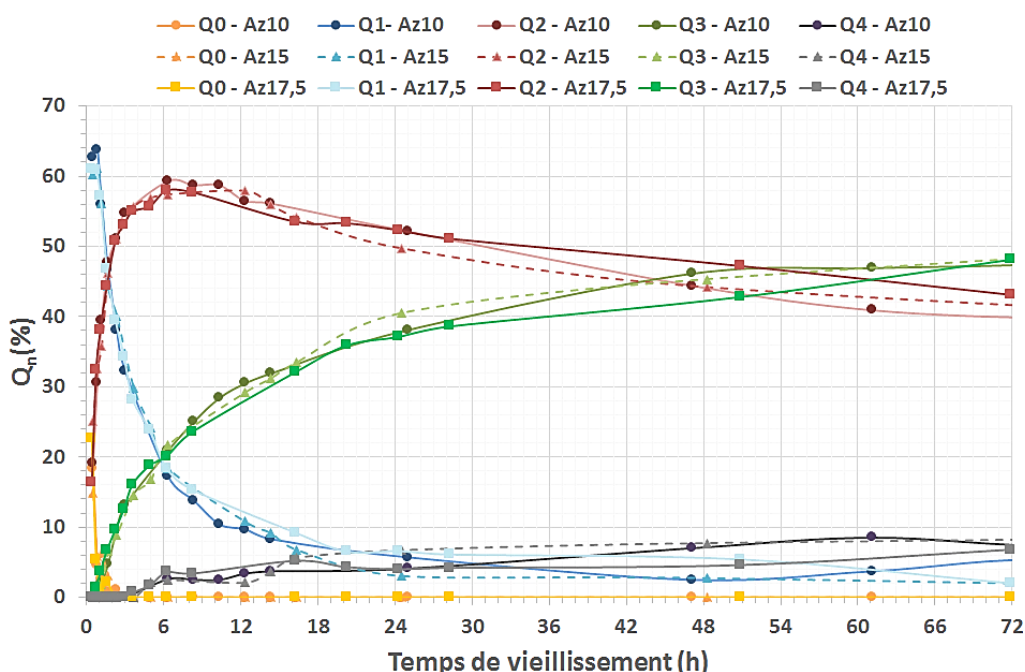


Figure 34 - Variation des espèces  $Q_n$  (somme normalisée à 100%) au cours du temps de vieillissement des sols  $TTf_{0,025}AZ_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ,  $TTf_{0,025}AZ_{0,15}F_{0,006}E_5Et_{20}$  &  $TTf_{0,025}AZ_{0,175}F_{0,006}E_5Et_{20}$



La proportion d'espèces  $Q_0$  et  $Q_1$  diminue très rapidement et la proportion d'espèces  $Q_4$  n'excède jamais 10% du total. **Pour juger de la bonne condensation du système, il est alors pertinent de s'intéresser plus particulièrement aux espèces  $Q_2$  et  $Q_3$**  (Figure 35). La technique de mesure présente une erreur non négligeable ( $\pm 2,5\%$ ) mais qui ne nuit pas à la tendance observée et à la qualité des courbes obtenues.

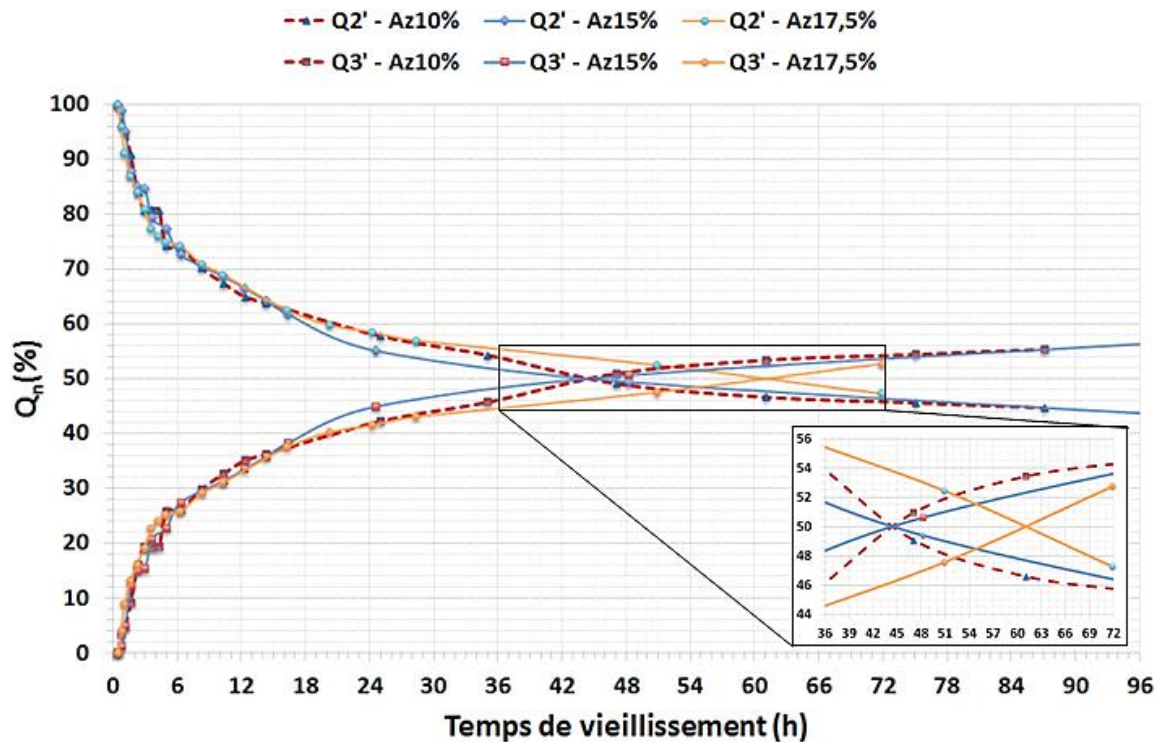


Figure 35 – Variation des espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  (somme normalisée à 100%) au cours du temps de vieillissement des sols  $TTf_{0,025}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ,  $TTf_{0,025}Az_{0,15}F_{0,006}E_5Et_{20}$  &  $TTf_{0,025}Az_{0,175}F_{0,006}E_5Et_{20}$

Jusqu'à 18 h de vieillissement, les trois sols ont globalement le même comportement. Cependant, à partir de 18 h, la cinétique de transformation  $Q_2 \rightarrow Q_3$  est plus rapide pour le sol avec 15% d'AzPTES que celle du sol avec 10% d'AzPTES. La cinétique de condensation du sol Az17,5% est cependant très retardée, avec une diminution plus lente des espèces  $Q_2$  et une augmentation plus lente des espèces  $Q_3$  (Figure 35), ainsi qu'une teneur en espèces  $Q_4$  toujours inférieure à celle des deux autres sols (Figure 34). La condensation du sol contenant 17,5% d'AzPTES est donc plus lente que les sols Az10% et Az15%. Ceci peut s'expliquer par le fait que le taux limite de fonctions de 20% est atteint, en présence de 17,5% d'AzPTES et de 2,5% de TFTS.

Il en résulte que le temps pour lequel  $Q_2 = Q_3$ , correspondant à un optimum de condensation du système, est différent pour le sol Az17,5% par rapport aux deux autres. Celui-ci intervient au même moment pour les sols avec 10 et 15% d'AzPTES (à environ 44 h de vieillissement du sol), mais intervient bien plus tard pour le sol avec 17,5% d'AzPTES (à 61 h).



**La condensation du réseau de silice est donc favorisée lorsque le taux d’AzPTES augmente, mais est fortement ralentie à la limite du taux de fonction** (soit 17,5% d’AzPTES ajoutés à 2,5% de TFTS, pour un total de fonctions de 20% par rapport au TEOS).

#### **II.4.1.1.3. Bilan sur le comportement global des différents sols formulés**

Les analyses des quantités d’espèces  $T_n$  et  $Q_n$  précédemment réalisées ont permis de mettre en évidence plusieurs comportements des sols.

##### **□ Pour le sol Az17,5% :**

- 1) Par rapport aux deux autres sols, **le sol Az17,5% a un comportement singulier, en raison d’un taux limite de tri-alcoxysilanes de 20%**.
- 2) Le système des espèces  $T_n$  ne semble évoluer que très peu après 48 h et il resterait 10% des espèces  $T_n$ , différentes des espèces  $T_2$  et  $T_3$  (Figure 32) qui ne peuvent plus condenser, c’est-à-dire probablement des espèces  $T_1$ .
- 3) **Les réactions sur les  $Q_n$  sont similaires entre le sol Az17,5% et les deux autres sols jusqu’à 18 h. Par la suite, la réaction  $Q_2 \rightarrow Q_3$  est très lente pour le sol Az17,5% et l’égalité  $Q_2 = Q_3$  intervient tardivement, à environ 61 h.**

Les conclusions 2 et 3 orientent vers **l’hypothèse que des tri-alcoxysilanes aient co-condensés entre eux**. En effet, ceci coïnciderait avec le fait qu’il reste environ 10% d’espèces  $T_1$  qui ne condensent plus, du fait de l’encombrement stérique consécutif à la condensation de ces espèces tri-alcoxysilanes. Ceci explique aussi la condensation moins rapide des espèces  $Q_2$  et  $Q_3$ , par la réaction préliminaire rapide de co-condensation des tri-alcoxysilanes qui ne réagissent alors que de façon moindre avec les espèces  $Q_n$  par rapport aux deux autres sols.

##### **□ Pour les sols Az10% et Az15% :**

- 4) Entre 12 h et 48 h, **la réaction  $T_2 \rightarrow T_3$  est plus rapide pour le sol Az10% que pour le sol Az15%** (Figure 32), ce qui s’explique par des aspects cinétiques : le sol Az15% ayant davantage de tri-alcoxysilanes à condenser, la cinétique de la réaction  $T_2 \rightarrow T_3$  semble plus lente car elle nécessite un temps de réaction plus long.
- 5) Entre 16 h et 44 h, **la réaction  $Q_2 \rightarrow Q_3$  est plus rapide pour le sol Az15% que pour le sol Az10%** (Figure 35). Ceci s’explique par le retard de condensation des espèces  $T_2$  (d’après la conclusion N°4) pour le sol Az15%, et qui accentue ainsi la condensation des espèces  $Q_2$  pour le sol Az15%.



En conclusion, il semble donc que les sols Az10% et Az15% aient des comportements équivalents entre eux, avec une intersection des courbes  $Q_2$  et  $Q_3$  intervenant à 44 h, et une incorporation des molécules d'AzPTES par co-condensation avec le TEOS. Cette incorporation est jugée complète à partir de 36 h pour le sol Az10% et à partir de 48 h pour le sol Az15% (Figure 32). **Les sols Az10% et Az15% pourraient donc être idéalement utilisés à partir de 48 h de vieillissement pour le procédé d'impression jet d'encre.**

D'autre part, **le sol Az17,5% présente une singularité, notamment du fait du taux limite de tri-alcoxysilanes (20%).** En effet, la condensation de l'AzPTES est très rapide mais incomplète, avec une saturation après 48 h. Des molécules d'AzPTES peuvent avoir co-condensé entre elles. Il en résulte un ralentissement global de la condensation du TEOS, avec par la suite une possible répartition inhomogène des fonctions azotures au sein du matériau. **Un temps de vieillissement de 48 h pourrait être adapté pour ce sol Az17,5%, comme pour les deux autres sols, ce qui correspond à des taux quasi-équivalents de  $Q_2$  et  $Q_3$ .**

Ces sols sont intéressants afin de maximiser le taux de fonctions azotures au sein des échantillons. Leurs propriétés physico-chimiques sont contrôlées avant de réaliser des dépôts.

#### II.4.1.2. Contrôle des propriétés des sols avant impression

**Les propriétés physico-chimiques des encres, à savoir la densité, la viscosité et la tension de surface, ont été mesurées à 48 h de vieillissement du sol, avant et après filtration à 1  $\mu\text{m}$**  (cf. Annexe 5). Cette étape est nécessaire pour éviter le bouchage des buses d'impression. Les valeurs de densité et de tension de surface ne sont que très légèrement modifiées par l'étape de filtration, mais la viscosité diminue de façon non négligeable, **signe que des oligomères condensés pourraient être éliminés par l'étape de filtration.**

Pour compléter ces caractérisations, **la taille des particules a été suivie par diffusion dynamique de la lumière** (cf. Annexe 5). Une encre non filtrée fait apparaître à 48 h de vieillissement une répartition bimodale : des entités d'environ 7 nm et d'autres d'environ 1000 à 2000 nm. La filtration permet d'éliminer les grosses particules, mais une signature faible est toujours présente autour de 1000 nm pour l'encre filtrée ayant servi à l'impression, ce qui montre l'évolution du sol à l'intérieur du réservoir de l'équipement jet d'encre.

**Pour vérifier que la filtration n'induit pas de changement de composition du sol, des analyses par spectroscopie infrarouge en transmission ont été réalisées, au moyen de monocristaux de KBr**, en normalisant les spectres obtenus par la bande des azotures à  $2100\text{ cm}^{-1}$  (Annexe 6.2). Les résultats laissent apparaître que **la filtration à 1  $\mu\text{m}$  ne modifie pas la composition des sols. Les sols Az10%, Az15% et Az17,5% ont donc pu être imprimés avec l'équipement d'impression jet d'encre au bout de 48 h de vieillissement.**





## II.4.2. Evolution de la rugosité des dépôts par augmentation du nombre de couches

Il peut être intéressant d'étudier l'évolution de l'épaisseur des microplots en fonction du nombre de couches déposées, et de savoir si cette épaisseur peut induire une interaction optique dans le cas d'une sonde de diagnostic. **L'augmentation du nombre de couches entraîne, comme attendu, une augmentation de l'épaisseur des dépôts** (Figure 36). Ceci a été observé par profilométrie et confirmé par interférométrie. **Des microplots de 1, 5, 10 et 25 couches ont respectivement une épaisseur de 0,15  $\mu\text{m}$ , 1,4  $\mu\text{m}$ , 2,9  $\mu\text{m}$  et 5,6  $\mu\text{m}$ .**

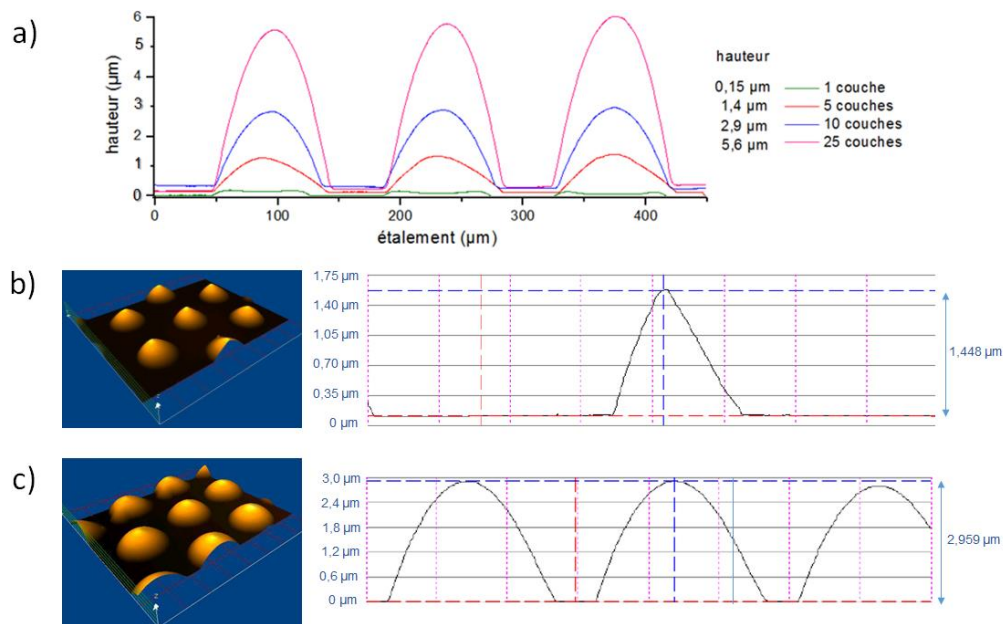


Figure 36 – Estimation de la hauteur des plots par profilométrie pour plusieurs nombres de couches (a) ou par interférométrie optique sur des plots de 5 couches (b) ou 10 couches (c)

**L'épaisseur moyenne d'une couche est d'environ 0,3  $\mu\text{m}$ .** La première couche est d'épaisseur moindre car sa morphologie est singulière, en forme de « tâche de café », avec des bords plus épais que le centre du plot (Figure 37).

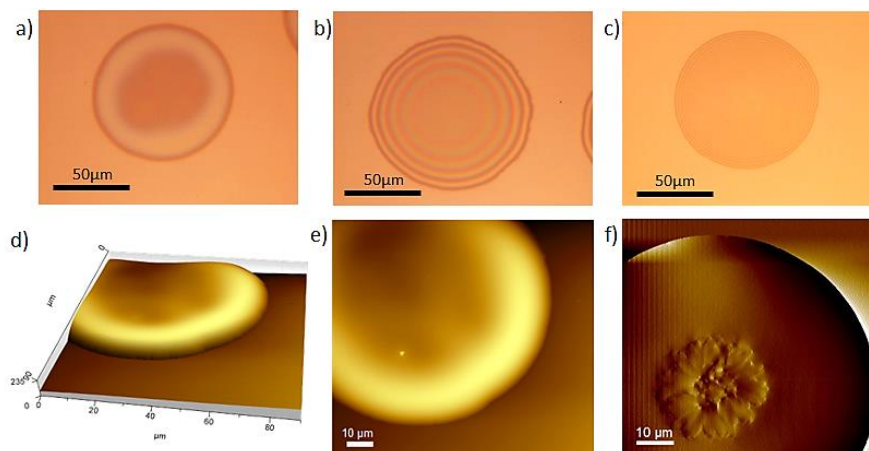


Figure 37 – Microscopies optiques de microplots de 1 couche (a), 5 couches (b), 10 couches (c) et images par AFM (mode contact 90 x 90  $\mu\text{m}$ ) pour des plots de 1 couche (d)(e) et 10 couches (f)



La nature poreuse du matériau pourrait avoir une incidence sur la transmission de la lumière au sein du mésoporeux [58]. Il est aussi possible que la rugosité des plots induise une modification du signal lumineux, par diminution d'intensité du faisceau retransmis, dans le cadre de l'application en tant que biocapteur, où les plots sont imprimés sur une fibre optique. **La rugosité des plots représente également la surface d'accroche pour les biomolécules.** C'est pourquoi cette rugosité a été estimée en fonction du nombre de couches.

Pour cela, le modèle de la calotte sphérique [9] n'est pas adapté, du fait que la morphologie des microplots n'est pas forcément régulière (Figure 36 et Figure 37). Néanmoins, les mesures interférométriques permettent, par traitement de données, de déterminer la surface développée des plots et de calculer la rugosité, définie comme le rapport de la surface développée sur la surface projetée (Tableau 7). Ces traitements sont faits en mesurant la surface développée et la rugosité d'un plot individuellement, *i.e.* sans tenir compte du substrat, ou bien en tenant compte du substrat, *i.e.* sur la totalité de la fenêtre d'analyse (0,310 mm<sup>2</sup>) qui est environ du double de la surface d'une fibre optique (0,16 mm<sup>2</sup>).

Tableau 7 – Estimation de la surface développée et de la rugosité par interférométrie, sur un plot individuellement, ou bien sur la totalité de la surface d'analyse (0,310 mm<sup>2</sup>)

		Monocouche	5 couches	10 couches	25 couches
<b>Surface développée (mm<sup>2</sup>)</b>	Plot individuel	0,187	0,190	0,198	0,259
	Fenêtre totale	0,310	0,313	0,326	0,466
<b>Rugosité</b> $\left(\frac{S_{développée}}{S_{projetée}}\right)$	Plot individuel	1,0032	1,0056	1,0109	1,0120
	Fenêtre totale	1,0013	1,0121	1,0516	1,5035

Pour des nombres de couches de 1 à 10, la surface développée et la rugosité ne varient pas grandement (rugosité totale inférieure à 1,06). En revanche, pour 25 couches, la surface développée et la rugosité augmentent grandement.

**La conclusion est donc que pour des nombres de couches de 1 à 10, la surface développée, *i.e.* la surface d'accroche pour les biomolécules lors des étapes de préparation de la sonde de diagnostic envisagée, varie très peu.** En revanche pour des nombres de couches plus important, cette surface développée varie, ce qui induirait de devoir normaliser l'intensité du signal par rapport à la surface développée, en vue par exemple de comparer la réponse en intensité d'échantillons qui n'ont pas les mêmes nombres de couches.



## II.5. Influence de différents paramètres du procédé sur la structuration de la porosité, pour des encres avec 10% d'AzPTES

Afin de simplifier cette étude, les résultats présentés dans cette partie concernent un taux d'AzPTES fixé à 10% et 2,5% de TFTS. Ce sol est le sol de référence qui a été utilisé dans des études antérieures [36], [41], et qui a montré l'apparition d'une structure de type rectangulaire centrée, par diminution du taux de TFTS de 5% à 2,5%.

Certains paramètres sont connus pour avoir une influence sur l'organisation de la mésoporosité de la silice, comme par exemple **le taux d'humidité** lors de l'impression [19] ou **le temps de vieillissement du sol** [44], [49]. Néanmoins, **il existe de nombreux paramètres relatifs au procédé dont l'influence sur la structuration est encore inconnue**. En particulier, ces paramètres peuvent avoir un rôle sur les cinétiques d'évaporation, donc sur le mécanisme d'auto-assemblage de la porosité, à savoir : **le type de réseau (carré ou hexagonal), l'espacement entre les plots, la stratégie de dépôt (libre ou trapèze, cf. Annexe 3.3) et le nombre de couches**. **L'incidence de ces paramètres sur la structuration de la mésoporosité sera donc étudiée en plus du taux d'humidité relative**.

L'influence du taux d'AzPTES, du temps de stockage des dépôts avant consolidation et des conditions de consolidation après impression sera étudiée ultérieurement.

### II.5.1. Influence du taux d'humidité relative sur la structuration de la porosité

Dans ce paragraphe, l'influence de l'humidité est étudiée pour une formulation à base de 2,5% de TFTS et 10% d'AzPTES, ainsi que des conditions opératoires fixes au niveau du réseau de plots déposés, à savoir un réseau de type carré, imprimé en mode libre (continu), pour un espacement fixé entre les plots de 40  $\mu\text{m}$ , pour 5 couches déposées et un temps de séchage entre couches de 10 min. Les échantillons auront également subi, après impression, un traitement de consolidation standard, *i.e.* un cycle de recuit en étuve à 130 °C durant 48 h sous air.

Le taux d'humidité (ou humidité relative HR) est contrôlé sur un appareil de mesure, type station météo, placé dans l'enceinte de l'équipement d'impression jet d'encre. **Les échantillons ont été imprimés à 3 taux d'humidité : 30%, 40% et 50%**. Après consolidation en étuve, les échantillons imprimés ont été caractérisés par GISAXS et MET (Figure 38).

Les résultats présentés font apparaître que **pour un taux d'humidité de 30% la seule structuration présente est la phase vermiculaire**, visible en GISAXS (Figure 38-a) par l'anneau de diffusion large et de faible intensité, accompagné d'une absence de tache de diffusion. Ceci est confirmé par des observations MET qui ne montrent que la phase vermiculaire (Figure 38-d).



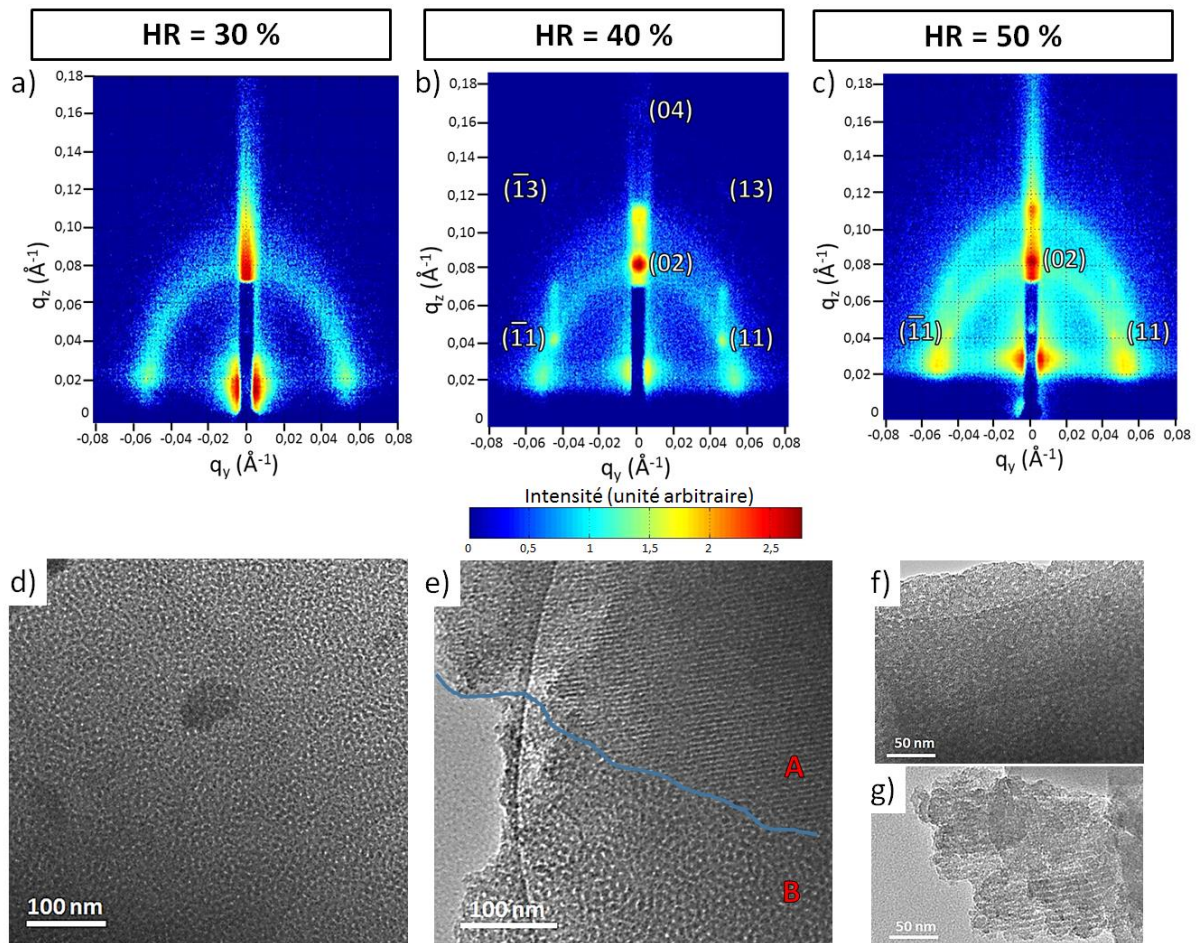


Figure 38 – Clichés GISAXS et MET de réseaux de microplots imprimés pour une encre Az10% à des humidités relatives de 30 % (a & d), de 40 % (b & e) ou 50 % (c, f & g)

**Pour un taux d'humidité de 40%**, le cliché GISAXS (Figure 38-b) montre l'apparition de taches de diffusion, caractéristiques d'une orientation préférentielle des micelles cylindriques, et qui s'avère être la phase rectangulaire centrée. Ceci est déduit de la position des taches de diffusion, qui correspondent aux taches (02) et (11) très visibles. Un faible anneau de diffusion est présent et de large épaisseur, ce qui dénote la présence de la phase vermiculaire, mais en plus faible proportion par rapport à l'échantillon à 30% d'humidité relative. Les analyses MET de l'échantillon à 40% d'humidité relative ont confirmé cela, avec sur toute la grille d'observation une présence en proportions sensiblement similaires de la phase rectangulaire centrée (zone **A**, Figure 38-e) et de la phase vermiculaire (zone **B**, Figure 38-e). **Pour un taux d'humidité de 40%, les deux phases de structuration, la phase rectangulaire centrée et la phase vermiculaire, sont présentes en proportions similaires.**

Concernant l'échantillon imprimé avec **un taux d'humidité de 50%**, le cliché GISAXS (Figure 38-c) montre un anneau de diffusion large et très intense en comparaison de l'échantillon 40%, ainsi que les taches de diffusion (11) et (02) de la structure rectangulaire centrée. Ceci amène à conclure sur une proportion plus faible de phase rectangulaire centrée



et une proportion majoritaire de phase vermiculaire au niveau de cet échantillon avec 50% d'humidité, par rapport à l'échantillon à 40% d'humidité. Ceci est confirmé par les analyses MET qui montrent une majorité de zones de type vermiculaire (Figure 38-f) et quelques rares zones de type rectangulaire centré (Figure 38-g). **L'échantillon avec 50% d'humidité relative présente donc les deux types de structures rectangulaire centrée et vermiculaire, mais avec une proportion plus faible de phase rectangulaire centrée par rapport à l'échantillon avec 40% d'humidité.**

Il existe donc des différences de structuration en fonction du taux d'humidité, qui peuvent être liées aux cinétiques d'évaporation lors du mécanisme d'auto-assemblage. Tout d'abord, Cagnol *et al.* ont montré que **pour une faible humidité relative (HR = 20%), l'eau et l'éthanol s'évaporent en même temps, laissant une couche de faible épaisseur** [19]. En revanche, **avec une humidité relative plus forte, l'évaporation de l'éthanol est privilégiée et l'eau s'évapore en dernier.** Il existe également des mouvements convectifs à l'intérieur de la goutte, une fois celle-ci déposée sur le substrat [59].

Pour l'échantillon imprimé à une humidité relative de 30%, comme décrit par Cagnol *et al.*, il est possible que l'évaporation soit très rapide, **en figeant le système en une structuration désordonnée** (Figure 39, étape 1), **à savoir la phase vermiculaire.** Pour un taux d'humidité de 40% et 50%, l'évaporation de l'eau se ferait de façon moins rapide, le système aurait alors plus de temps pour se réorganiser. La recirculation convective au sein de la goutte permettrait ainsi la formation des domaines formés par les micelles cylindriques, qui viendraient ensuite s'aligner aux interfaces pour donner la phase rectangulaire centrée.

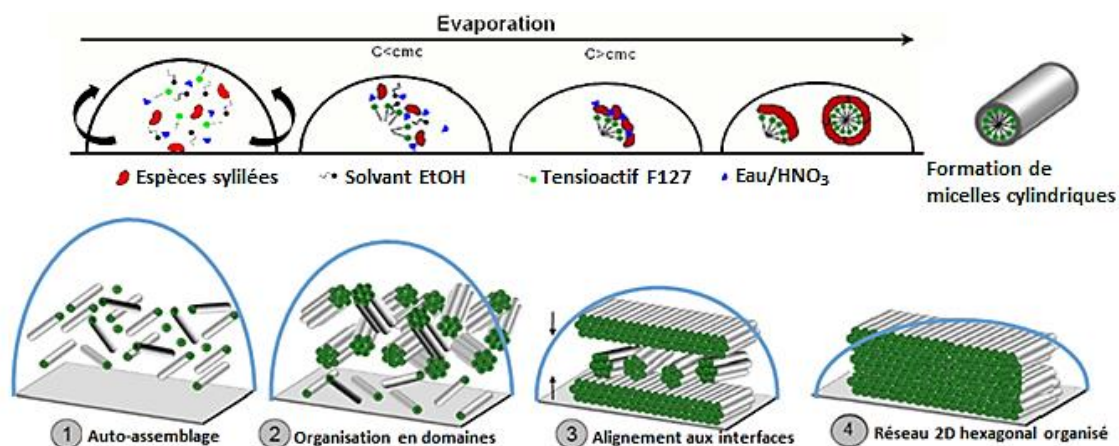


Figure 39 – Illustration du mécanisme d'auto-assemblage par évaporation (EISA)

Il y a cependant une différence de comportement entre 40% et 50% d'humidité relative. **L'augmentation de l'humidité relative traduit un rapport Eau/EtOH plus important lorsque l'humidité relative augmente.** Aussi, la différence observée pourrait s'expliquer par la différence de tension de surface entre ces deux solvants, à savoir une tension de surface



de 72,8 mN/m pour l'eau, qui est beaucoup plus forte que celle de l'éthanol, d'une valeur de 22,27 mN/m. **Cette augmentation de la tension de surface pourrait être à l'origine d'une formation plus lente des domaines formés par les micelles** (Figure 39, étape 2), qui résulterait par la suite en une proportion de domaines plus faibles et un alignement des domaines qui ne serait pas privilégié. **Ceci pourrait alors expliquer que la phase rectangulaire centrée est moins présente pour une humidité relative de 50% que pour une humidité relative de 40%.**

**Il existe donc un optimum de structuration autour de 40% d'humidité relative, qui favorise la présence de la phase rectangulaire centrée.** Dans la suite de l'étude, concernant la recherche de l'influence des différents paramètres sur la structuration de la mésoporosité, il s'agira de se mettre dans des conditions qui permettent d'avoir les deux structururations, à savoir un taux d'humidité d'environ 40 à 50%. En effet, s'il n'y a présence que d'un seul type de structuration, cela ne permet pas de conclure sur l'influence des paramètres à tester. **Le taux d'humidité privilégié pour l'étude de l'influence des paramètres sera donc fixé entre 40% et 50% d'humidité relative. Par ailleurs, un taux d'humidité plus important n'est pas conseillé car pourrait conduire à une décourbure des micelles, et entraîner l'apparition de phases lamellaires plus fragiles mécaniquement.**

### II.5.2. Incidence du type de réseau (carré, hexagonal) sur la structuration

Le mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation est beaucoup influencé par les cinétiques de séchage du solvant. Au niveau du procédé, il existe diverses façons de faire varier ces cinétiques, par une multitude de facteurs comme **le type de réseau utilisé : carré ou hexagonal**. Le type de réseau utilisé jusqu'alors dans les études précédentes était uniquement le réseau carré, mais il est également possible de déposer les plots suivant un réseau hexagonal. La Figure 40 montre la différence entre ces deux types de réseau, les flèches rouges symbolisant **l'espace entre les plots (noté E)**, dont la valeur a été renseignée au niveau de l'équipement pour la fabrication voulue.

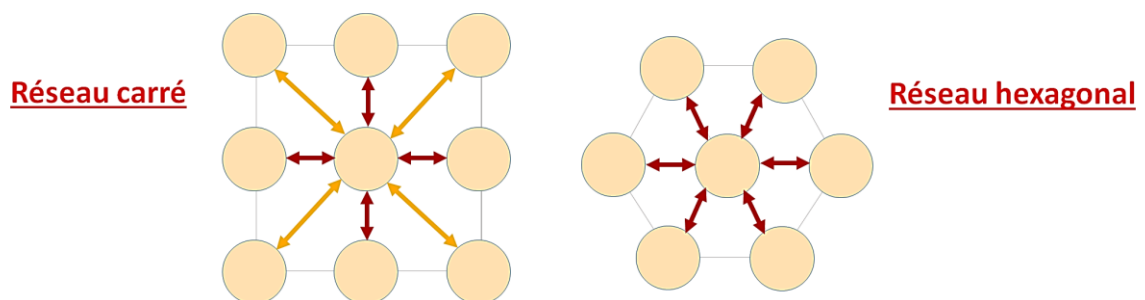


Figure 40 – Différence de conformation géométrique entre un réseau carré et un réseau hexagonal. Les flèches rouges représentent l'espace E entre les plots, renseigné au niveau de l'équipement.



Concernant l'application en tant que biocapteur, il peut être fortement souhaitable de maximiser le nombre de plots sur la surface imprimée pour augmenter la sensibilité. Aussi, **le réseau hexagonal semble beaucoup plus pertinent pour maximiser ce nombre de plots en surface des substrats.**

Afin d'étudier l'influence du réseau sur la structuration de la mésoporosité, des facteurs ont été gardés constants : une encre avec 10% d'AzPTES et 2,5% de TFTS, imprimée à 48 h de vieillissement sur lamelles de verre avec un **espacement fixe entre les plots de  $E = 40 \mu\text{m}$**  (flèches rouges en Figure 40, suivant le type de réseau), une humidité relative d'environ 42% ( $\pm 2\%$ ). Les échantillons ont été consolidés en étuve à 130 °C après impression, puis caractérisés en GISAXS (Figure 41).

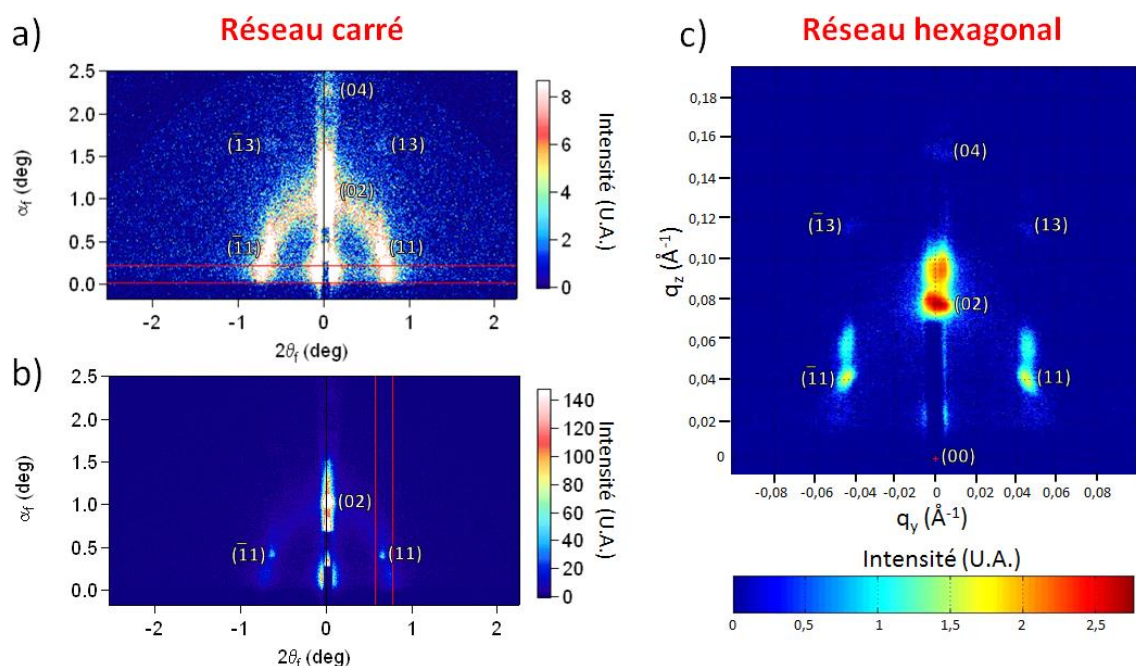


Figure 41 – Clichés GISAXS d'un réseau carré (a)(b) ou d'un réseau hexagonal (c) imprimé à partir du sol avec 10% d'AzPTES

D'après l'analyse GISAXS (Figure 41), le réseau carré présente une proportion importante de phase vermiculaire (Figure 41-a), visible par la forte intensité de l'anneau de diffusion. La phase rectangulaire centrée est également présente, mais en plus faible proportion. Ceci est visible par la présence des taches (13) et (04), les taches (11) et (02) n'étant pas très visibles à cause de la forte intensité de l'anneau de diffusion, mais qui sont bien présentes et visibles lorsque l'échelle d'intensité est modifiée (Figure 41-b).

Pour l'échantillon imprimé selon un réseau hexagonal, le cliché GISAXS (Figure 41-c) révèle qu'il n'y a pas d'anneau de diffusion visible et des taches de diffusion (11) et (02) très intenses, ainsi que la présence des taches (13) et (04) de la structure rectangulaire centrée. Ceci semble donc orienter vers le fait que **seule la structure rectangulaire centrée est présente pour l'échantillon imprimé avec un réseau hexagonal, tandis que l'échantillon**



imprimé avec un réseau carré présente les deux structurations vermiculaire et rectangulaire centrée. Pour vérifier cela, des analyses MET ont été effectuées sur des éclats de microplots des mêmes échantillons (Figure 42).

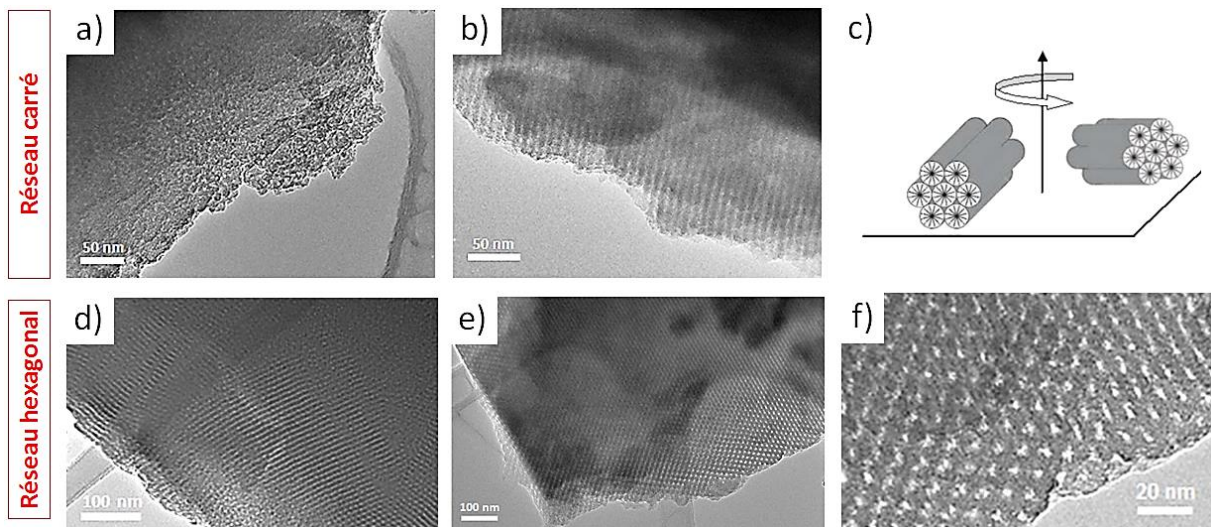


Figure 42 – Images MET d'échantillons imprimés à partir du sol Az10% avec un vieillissement de 48 h, selon un réseau carré (a)(b) ou hexagonal (d)(e)(f) et orientations possibles des micelles (c)

Les observations effectuées sur l'échantillon imprimé suivant un réseau carré ont mis en évidence la phase vermiculaire (Figure 42-a) ainsi que la phase rectangulaire centrée (Figure 42-b), pour laquelle les pores cylindriques semblent être vus selon leur longueur, étant donné que l'orientation des micelles est différente en fonction de la direction d'observation (illustré en Figure 42-c).

Pour l'échantillon imprimé selon un réseau hexagonal, il y a présence de larges zones organisées de la phase rectangulaire centrée sur quelques centaines de nanomètres (Figure 42-d). Ces analyses ont aussi permis de voir la structure rectangulaire centrée « de face » révélant la contraction de la maille hexagonale (Figure 42-e et Figure 42-f).

**Les analyses MET sont donc en accord avec les études en GISAXS. L'échantillon imprimé selon un réseau carré présente les deux structurations, vermiculaire en forte proportion et rectangulaire centrée en plus faible proportion, tandis que l'échantillon imprimé selon un réseau hexagonal présente uniquement la phase rectangulaire centrée avec des domaines très bien organisés de grande taille (quelques 100 nm).**

Cette différence de structuration observée pour ces deux échantillons, peut s'expliquer par la configuration géométrique du réseau, à savoir le nombre de plus proches voisins en termes de plots, en lien avec les cinétiques d'évaporation. Le solvant évaporé reste localement au niveau de la zone imprimée. Dans le cas du réseau hexagonal, le nombre de plus proches voisins est plus important que pour un réseau carré, et les plots voisins sont tous à égale





distance (Figure 40). Par conséquent, **les vapeurs de solvant des plots sont globalement plus concentrées dans le cas du réseau hexagonal que dans le cas du réseau carré. Ceci explique que le solvant s'évapore moins rapidement dans le cas du réseau hexagonal, ce qui donne davantage de temps aux gouttes déposées de réaliser le mécanisme d'auto-assemblage, permettant d'avoir une structuration mieux organisée.**

Par la suite, il est donc plus pertinent de travailler avec un réseau hexagonal, ceci afin de **maximiser le nombre de microplots déposés sur une surface**, mais aussi pour **assurer un caractère homogène à l'organisation de la structuration de la porosité. Dans la suite de l'étude, le réseau de type hexagonal sera donc privilégié.**

### II.5.3. Incidence de l'espacement entre les plots sur la structuration

Après avoir opté pour le réseau hexagonal, une autre façon de modifier la densité de plots concerne le choix de l'espacement entre les plots. Il peut être intéressant de chercher une valeur minimale d'espacement qui maximise le nombre de plots, tout en évitant le phénomène de coalescence des plots. Afin de déterminer la tendance au niveau de la structuration lorsque l'espacement diminue (l'espacement « standard » sans coalescence étant de 40  $\mu\text{m}$ ), c'est le raisonnement inverse qui a été mis en œuvre, à savoir augmenter l'espacement entre les plots et voir comment se comporte la structuration. **Pour cela, plusieurs espacements ont été testés : 40  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$ .**

Afin de déterminer l'influence de l'espacement sur la structuration, les autres paramètres ont été fixés : une encre avec 10% d'AzPTES et 2,5% de TFTS, imprimée à 48 h de vieillissement sur lamelles de verre pour 5 couches, une humidité relative d'environ 42% ( $\pm 2\%$ ). La fréquence d'éjection est fixée à 1000 Hz, et pour respecter l'espacement fixé (40, 70 ou 100  $\mu\text{m}$ ), la vitesse de déplacement du support de tête a varié linéairement (respectivement 140, 170 et 200 mm/s) avec une impression en mode continu. De plus le motif d'impression n'a pas varié mais le **temps de séchage entre couches a varié entre les échantillons, tout en restant suffisant pour ne pas gêner l'auto-assemblage (temps > 8 min)**, respectivement de 13 min, 11 min et 9 min pour des espacements de 40, 70 et 100  $\mu\text{m}$ . Les échantillons imprimés ont ensuite été consolidés en étuve sous air à 130 °C, puis caractérisés en GISAXS et MET (Figure 43).

Comme énoncé précédemment, **l'échantillon avec 40  $\mu\text{m}$  d'espacement en maille hexagonale présentait uniquement la phase rectangulaire centrée** (cf. II.5.2). D'autre part, **pour un espacement entre plots de 70  $\mu\text{m}$** , le cliché GISAXS montre un anneau de diffusion peu intense, ainsi que les taches de diffusion caractéristiques de la structure rectangulaire centrée (Figure 43-b). Ceci a été confirmé en MET, par observation de larges zones de type vermiculaire désordonnée et quelques larges zones de type rectangulaire centrée « vue de



dessus » (Figure 43-f). Enfin, **pour un espacement entre plots de 100  $\mu\text{m}$** , le cliché GISAXS (Figure 43-c) montre un anneau de diffusion d'intensité encore plus intense, caractéristique d'une **plus forte proportion de phase vermiculaire**. Les taches de diffusion (11), (02), (13) et (04), caractéristiques de la phase rectangulaire centrée sont aussi présentes. Ceci a été vérifié par analyses MET, avec une forte proportion de phase vermiculaire (Figure 43-g) et très peu de zones de structuration rectangulaire centrée (Figure 43-h).

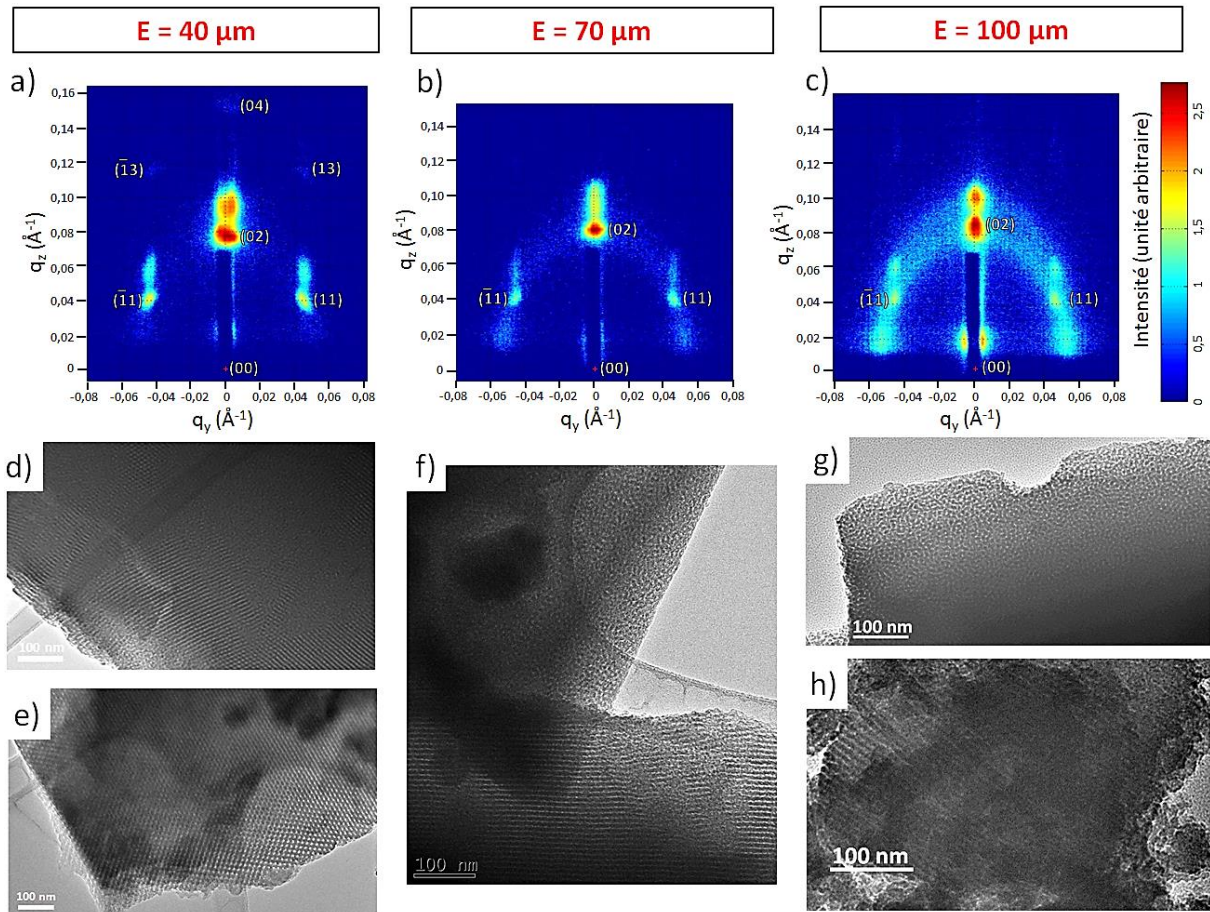


Figure 43 – Clichés GISAXS et MET obtenus pour un réseau hexagonal et un espacement entre plots de 40  $\mu\text{m}$  (a)(d)(e), 70  $\mu\text{m}$  (b)(f) ou 100  $\mu\text{m}$  (c)(g)(h), à partir d'un sol avec 10% d'AzPTES

**L'augmentation de l'espacement entre les plots favorise ainsi la présence de la phase vermiculaire, dont la proportion augmente, par rapport à la proportion de phase rectangulaire centrée. A contrario, un faible espacement permet de maintenir la phase rectangulaire centrée.**

Ceci peut s'expliquer une fois de plus par les vitesses d'évaporation du solvant lors du mécanisme d'auto-assemblage, juste après impression de la goutte. En effet, lorsque l'espacement entre les plots augmente, la concentration des vapeurs de solvant diminue, ce qui explique que **le solvant s'évapore plus rapidement quand l'écartement entre plots augmente**. Les micelles cylindriques n'ont alors pas le temps de s'organiser en domaines et



la structure se fige de plus en plus en une structure désordonnée vermiculaire. **Ainsi, un faible espacement entre les plots favorise la phase rectangulaire centrée, tandis qu'un fort écartement favorise la phase vermiculaire.**

**Une analyse plus poussée permet de déduire que le type de réseau (carré ou hexagonal) a une plus forte influence sur la structuration de la mésoporosité que le paramètre de l'espacement entre les plots.** En effet, ceci peut être démontré à partir de l'échantillon du réseau hexagonal avec un espacement de 70  $\mu\text{m}$  (Figure 43-b), comparativement à un échantillon du réseau carré avec un espacement de 40  $\mu\text{m}$  (Figure 41-a). En effet, l'échantillon imprimé suivant le réseau hexagonal avec  $E = 70 \mu\text{m}$  présente moins de désordre (phase vermiculaire moins prononcée en raison de l'anneau de diffusion moins intense, Figure 43-b) que celui qui est imprimé suivant le réseau carré avec  $E = 40 \mu\text{m}$  (phase vermiculaire davantage prononcée avec un anneau intense, Figure 41-a). Or, pour l'échantillon imprimé selon le réseau carré avec un espacement de 40  $\mu\text{m}$ , il y a davantage de plots et ils sont plus proches que pour le réseau hexagonal avec  $E = 70 \mu\text{m}$ . En effet, pour le réseau carré, chaque plot possède 4 premiers voisins situés à  $E = 40 \mu\text{m}$  de distance, et 4 seconds voisins situés à  $E\sqrt{2}$  de distance, soit à environ 56  $\mu\text{m}$  de distance. **Ceci montre donc bien que le type de réseau a une plus forte influence sur la structuration que le paramètre d'espacement entre les plots.**

Pour plus de reproductibilité, les échantillons peuvent donc être imprimés avec le réseau hexagonal, afin d'améliorer l'homogénéité d'évaporation du solvant (plus proches voisins équidistants). Par ailleurs, **il est possible de favoriser la structure vermiculaire en augmentant l'espacement entre les plots, ou bien la structure rectangulaire centrée en diminuant l'espacement entre les plots**, tout en évitant la coalescence.

**Pour la suite de l'étude, il sera important de pouvoir définir des conditions qui permettent d'obtenir exclusivement l'une ou l'autre des structurations pour une même densité de plots, c'est-à-dire pour un même espacement.** Ceci devra servir, notamment par rapport à l'étape de fonctionnalisation, à savoir si la fonctionnalisation se déroule mieux en présence d'une porosité de structure vermiculaire ou bien rectangulaire centrée. Afin d'obtenir l'une ou l'autre des structurations pour une même densité de plots (même espacement), différentes stratégies de dépôt ont été testées.



#### II.5.4. Incidence de la stratégie de dépôt (en continu ou en plusieurs fois)

L'équipement jet d'encre permet d'imprimer des plots de façon ajustable. Il existe notamment deux stratégies intéressantes : la **stratégie « libre » ou continue**, qui est la stratégie utilisée par défaut et la **stratégie « trapèze »**, qui consiste à imprimer 1 plot sur 2, et 1 ligne sur 2 (Figure 44). L'intérêt de cette 2<sup>nd</sup>e stratégie est de pouvoir transposer les résultats obtenus précédemment à propos de la maille hexagonale et de l'influence de l'espacement. En effet, en raison de l'ordre de dépôt pour cette stratégie trapèze (Figure 44), chaque passage de la tête se comporte comme s'il imprimait une maille hexagonale d'un espacement équivalent à la somme de deux fois l'espacement et une fois le diamètre des plots. Par exemple, pour  $E = 40 \mu\text{m}$  et un diamètre de plots renseigné de  $100 \mu\text{m}$ , la maille trapèze équivalente à un passage de la tête est une maille d'espacement  $180 \mu\text{m}$ .

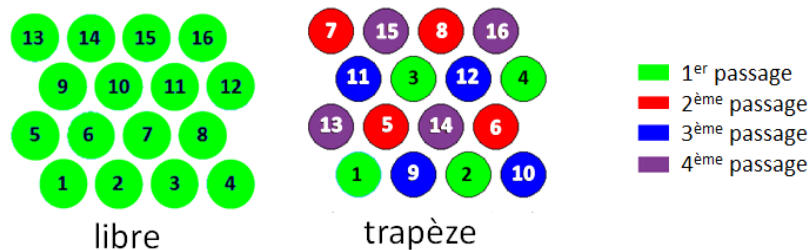


Figure 44 – Illustrations des modes de stratégies libre/continue et trapèze.  
Pour chaque stratégie, les plots sont imprimés selon l'ordre indiqué.

Le but recherché ici est de pouvoir imprimer deux échantillons de même configuration (même densité de plots et même nombre de couches) dans des conditions différentes afin d'obtenir les deux types de structuration (vermiculaire ou rectangulaire centrée). Pour cela, la méthode utilisée consiste à trouver des conditions d'impression qui permettent d'avoir une structuration rectangulaire centrée en mode libre, puis d'utiliser le même espacement en stratégie trapèze et voir si la structuration obtenue est vermiculaire ou non. Afin de pouvoir caractériser, par spectroscopie infrarouge, ces échantillons une fois fonctionnalisés, les dépôts ont été réalisés sur des wafers de silicium (Sil'tronix), orientés selon le plan cristallographique (100) dopés p au bore, avec une couche native de silice en surface.

Les conditions d'impression testées sont les suivantes : une encre avec 10% d'AzPTES et 2,5% de TFTS, imprimée à 48 h de vieillissement selon un réseau hexagonal de plots de 5 couches espacés de  $40 \mu\text{m}$ , et une humidité relative d'environ 40% ( $\pm 5\%$ ). La fréquence d'éjection est fixée à 1000 Hz. Dans le cas de la stratégie libre (ou continue), la vitesse du support de tête est de 140 mm/s pour un temps de séchage entre couches de 13 min. En revanche pour la stratégie trapèze, la vitesse de déplacement du support de tête est de 240 mm/s, pour un temps de séchage entre couches de 15 min. Les échantillons ont ensuite été consolidés en étuve à  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  puis caractérisés en AFM et GISAXS (Figure 45).



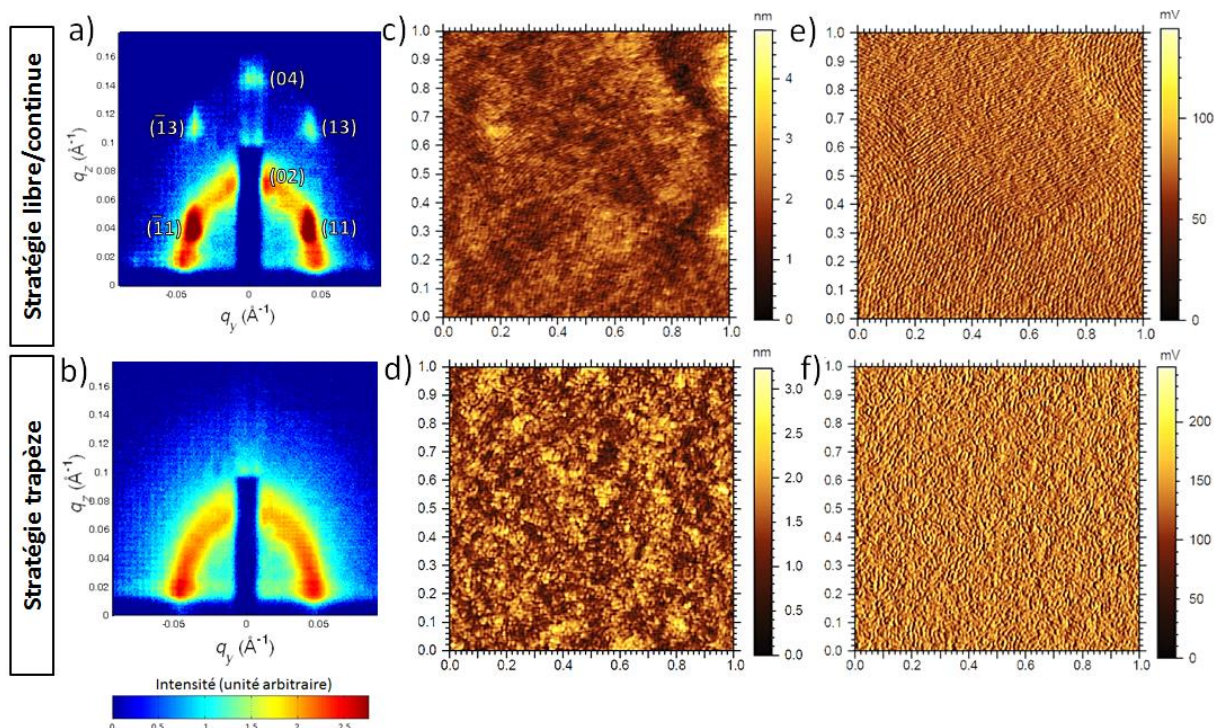


Figure 45 – Clichés GISAXS (a)(b) et images AFM de topographie (c)(d) ou de phase (e)(f), obtenus dans le cas d'une stratégie libre ou trapèze, pour un sol avec 10% d'AzPTES. L'image de phase est obtenue en enregistrant le déphasage lié à l'oscillation de la pointe.

La première observation concerne l'échantillon imprimé en mode libre, qui présente une phase rectangulaire centrée, apparaissant sur le cliché GISAXS (Figure 45-a) par la présence des taches de diffusion (11), (02), (13) et (04). Cette structure a également été mise en évidence par des scans AFM (Figure 45-c et e) qui ont révélé la présence d'une **phase rectangulaire centrée sur toute la surface de l'échantillon** (sommets, mi-rayon et bord), visible par de larges zones de canaux localement parallèles et correspondant, lors de l'EISA, à l'organisation des micelles cylindriques sous forme de domaines. Néanmoins, cet échantillon imprimé en mode libre présente également une phase vermiculaire, détectée sur le cliché GISAXS par un anneau de diffusion large et intense.

Pour l'échantillon imprimé en mode trapèze, *i.e.* un plot sur deux et une ligne sur deux, seul un anneau de diffusion est observé sur le cliché GISAXS (Figure 45-b). Ceci confirme bien que seule la phase vermiculaire est présente sur cet échantillon imprimé en mode trapèze, ce qui a été vérifié par des scans AFM de surface qui ont systématiquement montré la phase vermiculaire (Figure 45-d et f).

Ainsi, **l'utilisation de la stratégie de dépôt en mode trapèze permet d'obtenir en surface exclusivement la phase vermiculaire, là où la stratégie libre conduit à la présence de la phase rectangulaire centrée.** Ceci rejoint ce qui a été rapporté au paragraphe II.5.3, car le réseau imprimé en mode trapèze est équivalent à un réseau

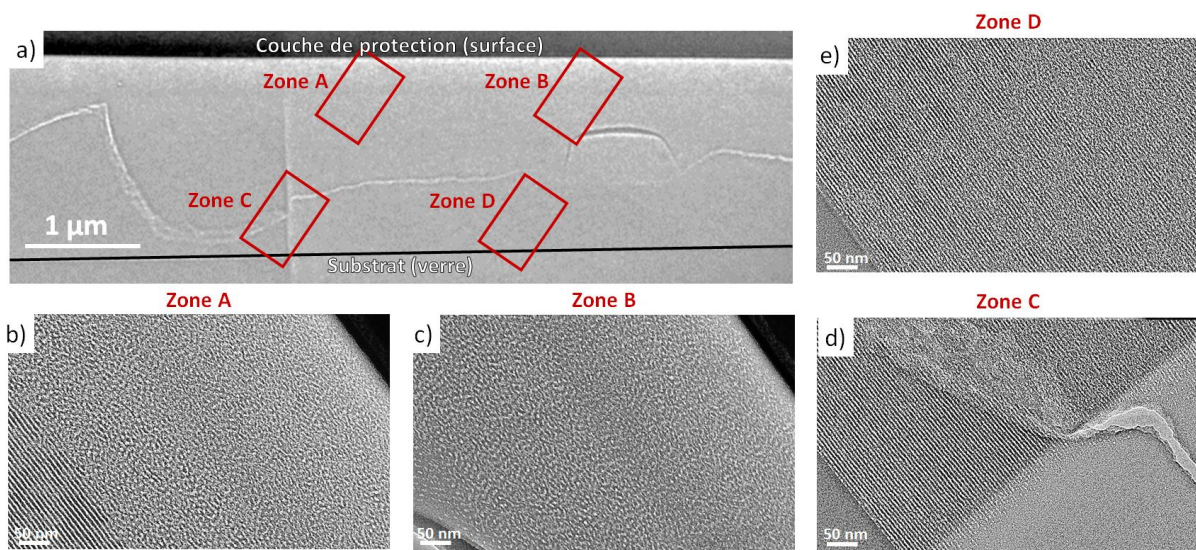


hexagonal d'espacement 180  $\mu\text{m}$  qui serait imprimé en mode libre. L'augmentation de l'espacement entre deux microplots successifs permet donc une évaporation des solvants beaucoup plus rapide, ce qui fige la structure, les micelles cylindriques n'ayant pas le temps de se regrouper en domaines lors de l'auto-assemblage. **Il est donc possible d'obtenir les deux types de structuration en surface, pour une même configuration (densité de plots, nombre de couches, etc.) en adaptant la stratégie de dépôt des microplots.**

Il est ensuite intéressant de déterminer quelle est la structuration en surface de plots suivant le nombre de couches.

### II.5.5. Incidence du nombre de couches

L'évolution de la structuration avec le nombre de couches est inconnue pour le sol avec 10% d'AzPTES et 2,5% de TFTS. Cependant, des échantillons sur substrat verre, imprimés en mode continu sous forme de plots de 5 couches, espacés de 40  $\mu\text{m}$  selon un réseau hexagonal, présentent les deux types de structuration. **La préparation d'une lame mince par FIB a permis de montrer que les 3 premières couches imprimées présentent une structuration de type rectangulaire centrée, orientée parallèlement à l'interface avec le substrat, et les 2 dernières couches présentent la structure vermiculaire (Figure 46).**



*Figure 46 – Observation en MET de la section d'un plot déposé sur substrat lamelle de verre (a), permettant d'observer la structuration proche de la surface externe (b)(c) ou proche du substrat (d)(e)*

**Afin d'étudier l'évolution de la structuration suivant le nombre de couches, des échantillons ont été préparés avec 10 couches, pour les comparer aux échantillons de 5 couches, et ont été fabriqués dans les mêmes conditions (réseau hexagonal, espacement entre plots de 40  $\mu\text{m}$ , impression en mode continu). Après consolidation en étuve, les échantillons ont été caractérisés par GISAXS et sur des éclats de plots en MET (Figure 47).**



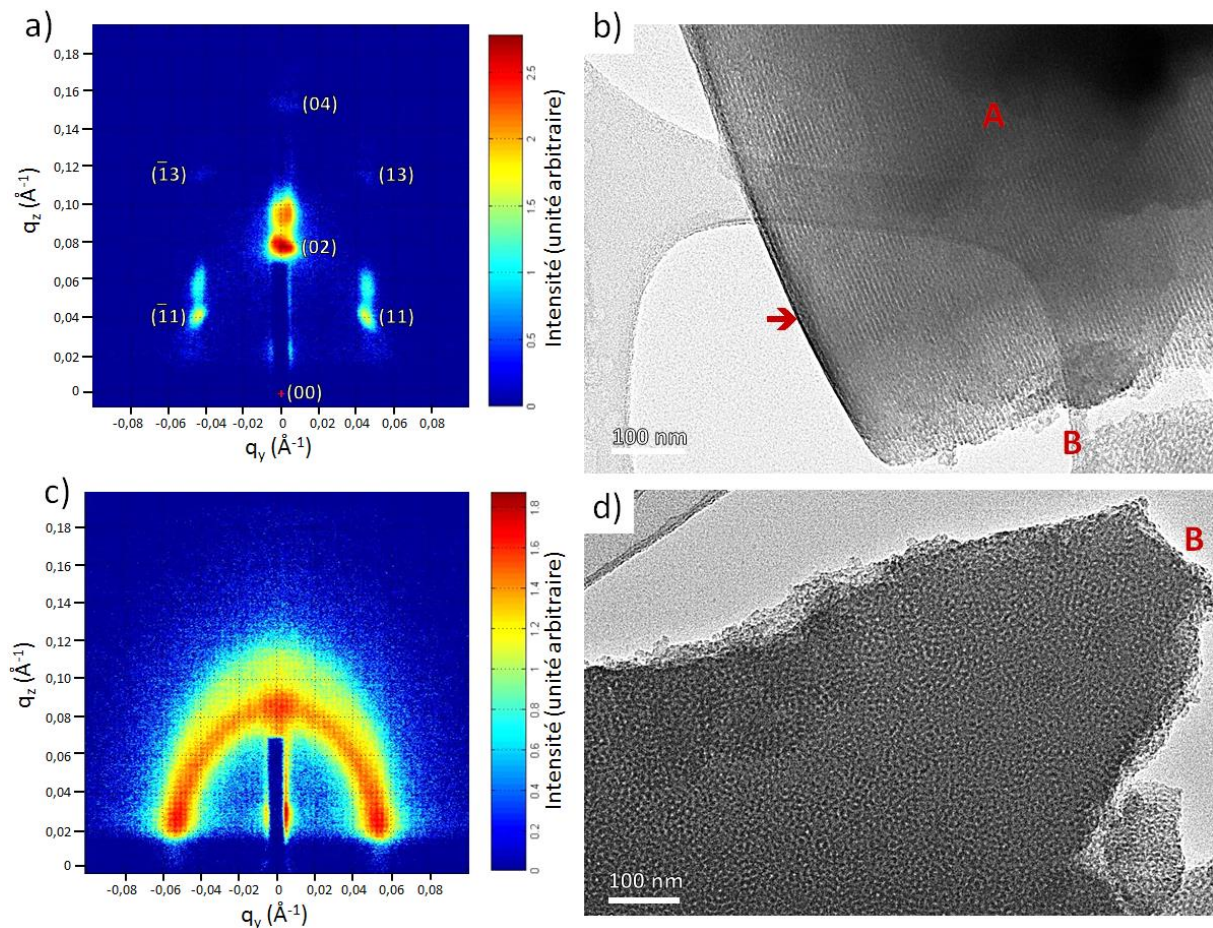


Figure 47 – Clichés GISAXS et images MET de microplots de 5 couches (a)(b) et 10 couches (c)(d)

Comme montré précédemment sur des échantillons analogues, **l'échantillon de 5 couches imprimé dans ces conditions est globalement rectangulaire centré**, comme le montre le cliché GISAXS (Figure 47-a), avec la présence des taches de diffusion (11), (02), (13) et (04), ainsi que l'absence d'un anneau de diffusion de forte intensité. Ceci a été confirmé par les analyses MET, avec la présence de grandes zones rectangulaires centrées (zone A, Figure 47-b). **La structure vermiculaire est cependant présente** sur cet échantillon (zone B, Figure 47-b).

D'autre part, **l'échantillon de 10 couches ne présente que la structure vermiculaire**, déduite du cliché GISAXS par la présence d'un large anneau de diffusion intense et de l'absence de taches de diffusion (Figure 47-c), ce qui a aussi été confirmé en MET par l'observation de larges zones vermiculaires et l'absence totale de structure rectangulaire centrée (Figure 47-d). **Un échantillon de 5 couches est donc majoritairement rectangulaire centré (avec un peu de structuration vermiculaire parfois), tandis qu'un échantillon de 10 couches ne présente que la structuration vermiculaire.**

**L'augmentation du nombre de couches est donc défavorable pour l'organisation de la structuration, et ce malgré un temps de séchage entre couches très conséquent.**



**L'augmentation du nombre de couches vient donc détruire la structuration organisée des premières couches.** Ce phénomène avait déjà été observé auparavant pour des sols ne contenant ni TFTS, ni AzPTES, dont l'organisation diminue par augmentation du nombre de couches, et qui **serait attribué à une accumulation de solvant à partir d'un certain nombre de couches** [9]. Cependant, avec l'ajout de TFTS à hauteur de 5%, les études précédentes avaient montré une moins bonne structuration des dépôts monocouches mais une meilleure structuration pour les dépôts multicouches (5 couches) [9]. Ceci peut être dû au caractère hydrophobe du sol contenant du TFTS, qui expliquerait une moins bonne structuration pour un dépôt monocouche, due à une moins bonne interaction avec le substrat hydrophile. Pour des dépôts multicouches, le caractère hydrophobe du sol permettrait de limiter les interactions entre couches, et expliquerait ainsi une meilleure structuration générale.

Le sol avec 2,5% de TFTS et 10% d'AzPTES a un caractère plus hydrophile, et il est alors normal de retrouver un comportement similaire au sol sans TFTS et sans AzPTES, qui présente une bonne structuration de la première couche et une moins bonne structuration pour 5 couches [9]. **Il semble donc que cette structuration progressive des couches les unes par rapport aux autres soit déterminée par le caractère hydrophile/hydrophobe du sol et donc par le rapport AzPTES/TFTS** (pour un taux de TEOS fixé). Il est alors raisonnable de penser que **la formulation du sol a une influence plus importante sur la structuration de la mésoporosité par rapport au facteur que représente le nombre de couches.**

Aussi, la conclusion tirée de l'échantillon de 10 couches (Figure 47), à savoir la possibilité que l'augmentation du nombre de couches dégrade la structuration des premières couches, met en évidence que **la structuration des premières couches n'est pas figée**, malgré un très bon arrangement des micelles sous forme de domaines lors du mécanisme d'auto-assemblage. Ceci a également été observé pour des films minces obtenus par *dip coating* avec le système CTAB/TEOS, montrant que la structuration des films passe par un état d'équilibre pendant lequel le réseau de silice n'a pas encore gélifié et n'est donc pas cohésif [60]. **Ceci pourrait être évité, en figeant la structuration de chaque couche avant le dépôt de la couche suivante, ce qui est possible grâce à l'équipement jet d'encre, par l'utilisation de recuit par infrarouge, UV ou recuit photonique, bien que cette dernière étape soit encore en développement (cf. résultats §II.8.2).** Ces différentes voies pourront être envisagées dans des études futures.

Le nombre de couches est donc fixé arbitrairement à 5 couches, car c'est celui qui permet le mieux d'étudier l'influence des autres facteurs sur la structuration. En vue de l'application, il est nécessaire de savoir quelle serait l'influence du taux d'AzPTES sur la structuration de la mésoporosité.





## II.6. Influence du taux d'AzPTES sur la structuration de la porosité

Le taux d'AzPTES introduit détermine le taux de fonctions azotures présentes au sein du matériau, et conditionne son potentiel de fonctionnalisation. **Il est envisageable de maximiser le taux d'AzPTES, jusqu'à un taux limite de 17,5%, pour maximiser le nombre de molécules ensuite greffées lors des étapes de fonctionnalisation post-impression.** Pour l'application envisagée, il s'agit de protéines d'environ 4,0 nm [51], greffées à l'intérieur de pores d'environ 5,4 nm, compte tenu de l'utilisation du tensioactif F127. Une seule protéine viendrait alors se greffer dans les pores en surface des microplots, ce qui **excluerait une fonctionnalisation en volume, au profit d'une fonctionnalisation de surface par ces protéines.** Il ne serait alors pas nécessaire d'avoir un nombre de fonctions azotures important dans les pores. Par ailleurs, pour un taux d'AzPTES de 10% avec une structuration rectangulaire centrée en surface, il apparaît que la répartition des protéines est inhomogène et se fait sous forme d'amas [36]. Ceci peut résulter d'une saturation locale de la surface en protéines greffées, à cause d'un taux d'azotures trop fort, ou bien d'une mauvaise accessibilité de l'intérieur des pores à cause de la structuration rectangulaire centrée. De ce point de vue, **il est alors intéressant de tester des taux d'AzPTES plus bas afin de ne pas saturer la surface et aussi de tester si le greffage est meilleur avec une structuration vermiculaire.**

Pour cette raison, **l'influence du taux d'AzPTES sur la structuration de la mésoporosité a été étudiée, pour 2,5% de TFTS et différents taux d'AzPTES : 0% (référence), 1%, 5%, 10%, 15% et 17,5%.** Un temps de vieillissement de 48 h a été observé pour tous les sols fonctionnalisés azotures (24 h pour le sol de référence avec 0% d'AzPTES). Le réseau a été maintenu constant, à savoir un réseau de type hexagonal, de microplots de 5 couches espacés entre eux de 40  $\mu\text{m}$  et imprimés en mode continu sur substrat lamelles de verre. La fréquence d'éjection et la vitesse du support de tête ont été maintenues constantes, respectivement à 1000 Hz et 140 mm/s.

### II.6.1.1. Etude de la structuration en fonction du taux d'AzPTES

Après impression, et afin de caractériser complètement les échantillons, des analyses par GISAXS, AFM et MET ont été réalisées sur les échantillons imprimés selon les mêmes paramètres, pour les différents taux d'AzPTES (Figure 48).

D'après ces résultats, il apparaît que les échantillons avec **0, 1 et 5% d'AzPTES présentent la phase rectangulaire centrée**, visible par les taches de diffusion spécifiques. Par ailleurs, **les échantillons avec 10% d'AzPTES ont tous montré la structure vermiculaire** et une absence totale de structure rectangulaire centrée. **L'échantillon avec 17,5% d'AzPTES présente aussi uniquement la phase vermiculaire.** Les différentes techniques d'analyse utilisées convergent toutes vers ces mêmes résultats.



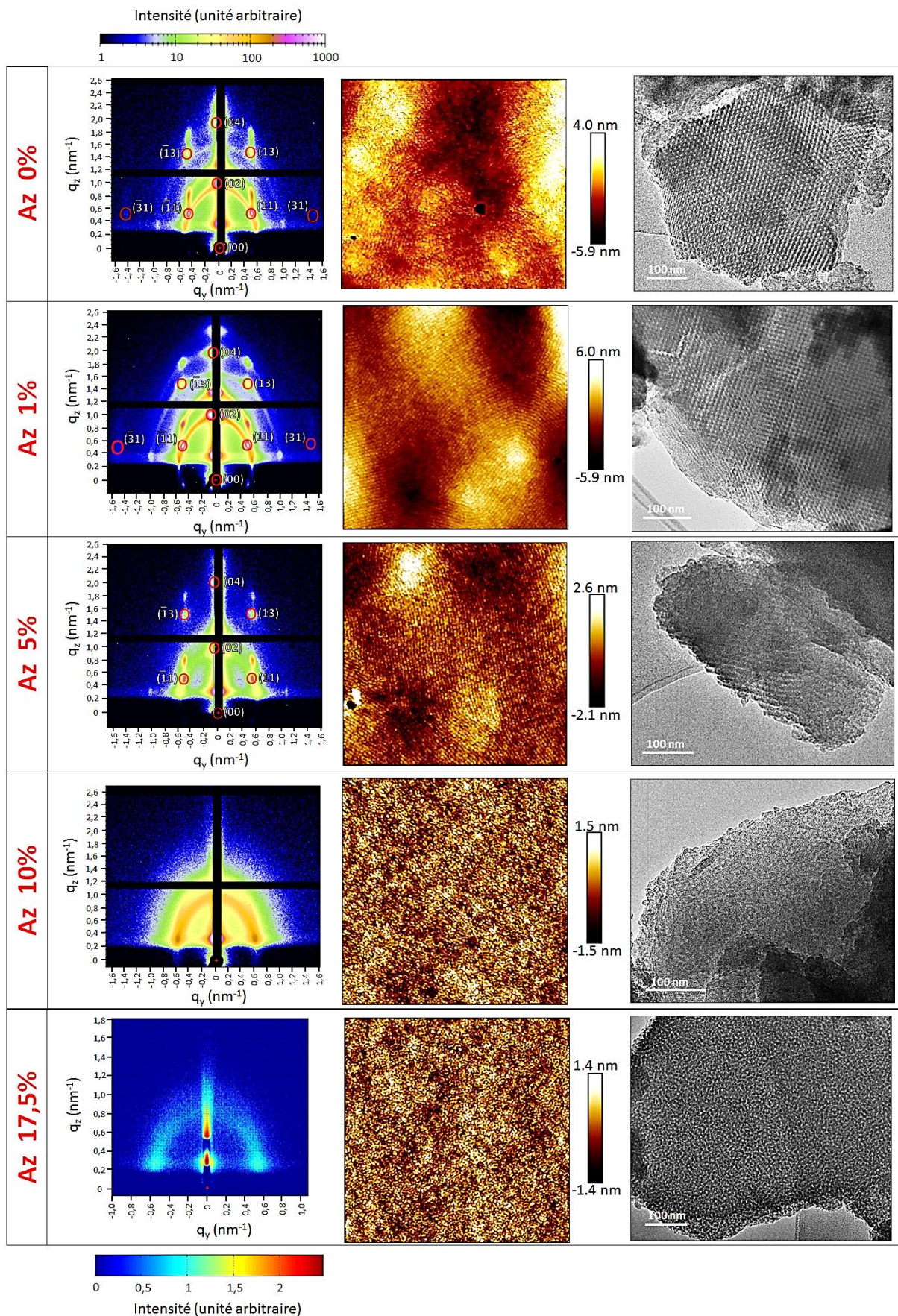


Figure 48 – Clichés GISAXS, AFM (1 x 1  $\mu\text{m}$ ) et MET de réseaux de microplots imprimés avec des sols contenant 2,5% de TFTS et respectivement 0%, 1%, 5%, 10%, et 17,5% d'AzPTES



De plus, lorsqu'il est imprimé en **mode trapèze** (Figure 49-b et c), l'échantillon avec **5% d'AzPTES** ne montre qu'une faible proportion de vermiculaire, par rapport à un échantillon imprimé avec **10% d'AzPTES** qui donne une structuration uniquement vermiculaire dans les mêmes conditions (cf. Figure 45, page 76). Ceci montre que **pour un taux d'AzPTES de 5%, le sol est moins sensible à la stratégie de dépôt, i.e. aux cinétiques d'évaporation du solvant, et indique une organisation rapide des micelles cylindriques sous forme de domaines, lors du mécanisme d'auto-assemblage**. C'est aussi pour 5% d'AzPTES que l'anneau de diffusion est d'intensité la plus faible en GISAXS, ce qui dénote une bonne organisation, et une structuration dans une direction préférentielle, par rapport aux échantillons avec 0% et 1% d'AzPTES, qui présentent des domaines de structuration rectangulaire centrée dans des directions totalement aléatoires (visible par la forte intensité de l'anneau de diffusion).

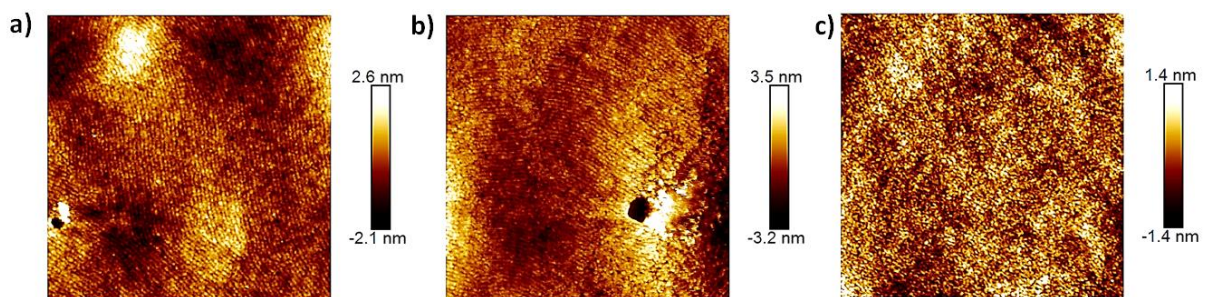


Figure 49 – Illustration de la structuration observée par AFM ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ) sur un échantillon avec un taux d'AzPTES de 5% imprimé en mode libre (a) ou en mode trapèze (b)(c)

De plus, l'échantillon avec 15% d'AzPTES n'a pas été caractérisé, mais étant intermédiaire entre 10% et 17,5% d'AzPTES qui donnent tous deux une structuration vermiculaire, **il est alors fort probable que la structuration des échantillons avec 15% d'AzPTES soit vermiculaire**.

Ainsi, **la structuration de la porosité semble dictée majoritairement par la formulation, c'est-à-dire le taux d'AzPTES introduit, par rapport à d'autres paramètres liés au procédé**. D'après les études antérieures [36], **le passage de la structure rectangulaire centrée à la structure vermiculaire, qui intervient autour de 10% d'AzPTES, serait liée au caractère hydrophile de l'AzPTES, en influant sur la courbure des interfaces**.



## II.6.1.2. Etude des paramètres du réseau poreux en fonction du taux d'AzPTES

Il est possible que le taux d'AzPTES ait une influence sur la morphologie des pores. Les analyses GISAXS ne permettent pas de déduire la taille des pores, surtout lorsque la structure est complexe, avec par exemple des orientations de pores très diverses malgré une structure localement ordonnée, comme c'est le cas pour certains échantillons. Néanmoins, les analyses GISAXS, contrairement aux observations MET, permettent d'**estimer les distances caractéristiques au sein du réseau poreux, et d'estimer le désordre au sein de la structure**. En effet, un anneau de diffusion large permet de montrer une structuration de type vermiculaire désordonnée, la largeur de l'anneau étant liée à une disparité importante au niveau des distances entre deux pores, dans la direction considérée. Par ailleurs, un anneau de diffusion moins large est observé dans le cas d'un échantillon avec 0% ou 1% d'AzPTES (cf. Figure 48, page 81), qui met en évidence une structuration de type rectangulaire centrée dont l'orientation des domaines n'est pas préférentielle.

De plus, il est possible d'estimer le désordre de la structure dans le plan du substrat et hors du plan du substrat, en réalisant des coupes qui permettent d'estimer les coordonnées  $q_y$  et  $q_z$  du vecteur de diffusion, relatives à l'interception de l'anneau avec les axes vertical et horizontal (illustré en Figure 50). Il est à noter que, dans le cas de la présence d'une structuration rectangulaire centrée, l'interception de l'anneau de diffusion avec l'axe vertical correspond simplement à la position de la tache (02). La première tache intense sur la coupe horizontale (Figure 50-c) correspond à la réflexion sur le verre du faisceau incident de rayons X, due à leur très faible incidence, proche de l'angle critique de réflexion totale. Ce faisceau induit également un dédoublement des taches (02) et (04).

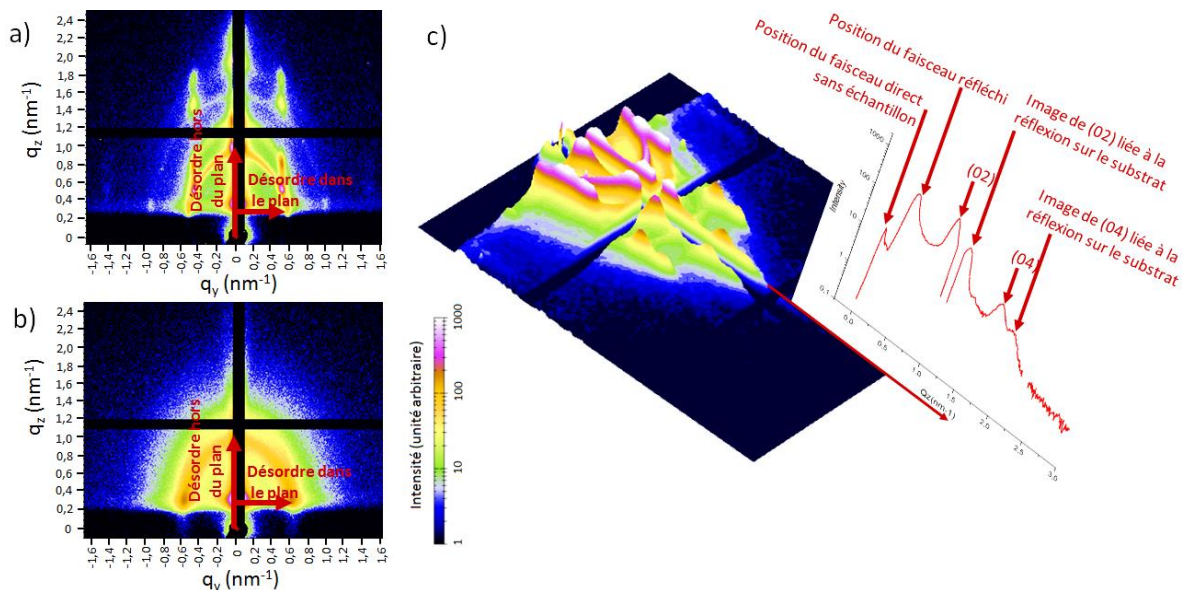


Figure 50 – Coupes effectuées afin d'estimer le désordre hors du plan et dans le plan pour les échantillons, comme ici pour Az 0% (a) et Az 10% (b). Coupe verticale obtenue pour Az 0% (c). Le dédoublement des taches observé est dû à la réflexion du faisceau incident sur le substrat.



Par ailleurs, l'analyse des coupes horizontales et verticales permet de déduire les distances moyennes du réseau poreux, correspondant au désordre observé dans le plan et hors du plan, inversement proportionnelles aux coordonnées  $q_y$  et  $q_z$  du vecteur de diffusion  $q$  ( $d_y = \frac{2\pi}{q_y}$  et  $d_z = \frac{2\pi}{q_z}$ ), afin de comparer le réseau obtenu suivant le taux d'AzPTES (Tableau 8).

Tableau 8 – Interception des coupes avec l'anneau de diffusion et distances entre pores correspondantes : «  $d_y$  » distance dans le plan du substrat et «  $d_z$  » suivant la normale au substrat

	Désordre dans le plan (intersection de l'anneau avec l'horizontale)			Désordre hors du plan (intersection de l'anneau avec l'axe $q_z$ )		
	$q_y$ (nm <sup>-1</sup> )	$d_y$ (nm)	Ecart relatif ( $d_y$ )	$q_z$ (nm <sup>-1</sup> )	$d_z$ (nm)	Ecart relatif ( $d_z$ )
<b>Az 0 % (référence)</b>	0,538	11,68	/	0,868	7,24	/
<b>Az 1%</b>	0,558	11,26	- 3,6%	0,880	7,14	- 1,4%
<b>Az 5%</b>	0,596	10,54	- 9,8%	0,910	6,90	- 4,7%
<b>Az 10%</b>	0,615	10,22	- 12,5%	1,000	6,28	- 13,3%
<b>Az 17,5%</b>	0,556	11,30	- 3,3%	0,842	7,46	+ 3,1%

D'après l'étude de ces résultats, il est à remarquer que, **hormis pour 17,5% d'AzPTES (cas particulier qui sera traité après), lorsque le taux d'AzPTES augmente, la distance entre deux pores diminue, que ce soit dans le plan du substrat ( $d_y$ ) ou bien dans la direction normale au substrat ( $d_z$ ).**

Cette diminution de la distance entre pores pourrait résulter de deux phénomènes antagonistes :

- (i) la taille des pores diminue avec le taux d'AzPTES
- (ii) l'épaisseur des murs de silice augmente avec le taux d'AzPTES

Le premier phénomène s'expliquerait par le fait que la courbure des micelles est majoritairement dictée par la nature du tensioactif, *i.e.* le ratio entre les chaînes hydrophiles et hydrophobes ( $n_{EO}/n_{PO}$ ) du tensioactif considéré [24]. Elle est aussi dictée par le rapport « tensioactif/Si » [21], [61], [62], car **la courbure des micelles augmente lorsque la quantité de silice totale augmente, *i.e.* quand le taux d'AzPTES augmente. L'augmentation de la courbure des micelles se traduit alors inversement par une diminution faible de la taille des pores.**



Par ailleurs, concernant la seconde hypothèse, il est possible que la taille des murs de silice soit plus élevée lorsque le taux d'AzPTES augmente. En effet, la RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$  a permis de montrer que **la condensation des oligomères est favorisée lorsque le taux d'AzPTES augmente** (cinétique  $Q_2 \rightarrow Q_3$  plus rapide pour 15% d'AzPTES par rapport à 10% d'AzPTES, page 61), **ce qui donne des oligomères de plus grande taille et une augmentation de la fraction volumique occupée par la silice** [60]. Il en résulterait alors **une augmentation de la taille des murs de silice**.

Il est aussi à noter que lors du traitement de consolidation thermique, les murs de silice subissent une contraction qui intervient suivant l'axe normal au substrat [9]. La variation observée pour la distance entre les pores fait donc intervenir en parallèle les deux phénomènes de façon compétitive : la diminution de la taille des pores et l'augmentation de l'épaisseur des murs de silice avec le taux d'AzPTES.

En considérant les taux d'AzPTES de 0%, 1% et 5%, il est possible de noter une contraction plus importante dans le plan (respectivement -3,6% et -9,8%) plutôt que hors du plan (respectivement -1,4% et -4,7%), qui se traduit par une diminution de la taille des pores plus importante par rapport à l'augmentation de l'épaisseur des murs de silice. **En revanche, pour 10% d'AzPTES la tendance s'inverse** : la contraction est plus importante hors du plan (-13,3%) plutôt que dans le plan (-12,5%), qui traduirait alors que la diminution de la taille des pores n'intervient plus et que seule intervient la contraction de l'épaisseur des murs suivant l'axe normal au substrat. Ces comportements sont illustrés en Figure 51.

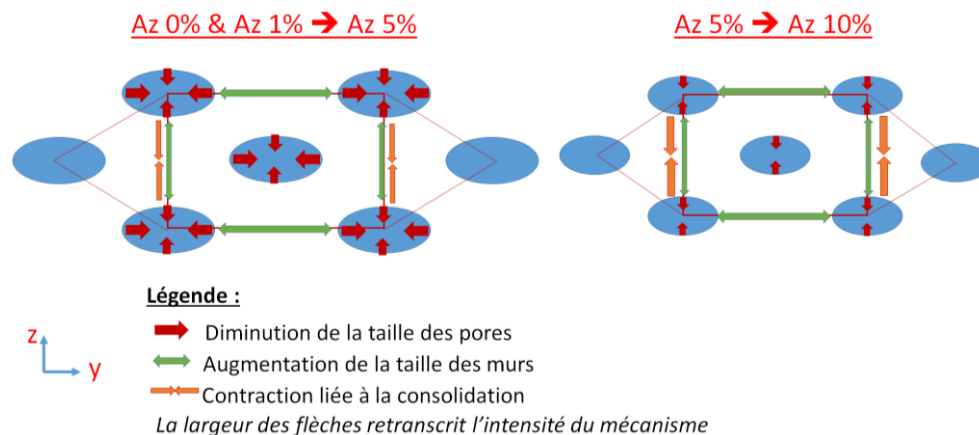


Figure 51 – Schéma décrivant les phénomènes mis en jeu par augmentation du taux d'AzPTES, entre 0, 1 et 5% (a) et le passage de 5% à 10% (b)

Concernant le cas particulier du taux d'AzPTES de 17,5%, par comparaison avec le sol possédant 0% d'AzPTES, il y a une contraction dans le plan du substrat, liée à la diminution de la taille des pores, mais qui est plus faible pour 17,5% d'AzPTES (-3,3%) par rapport aux autres taux d'AzPTES, comme par exemple pour 10% d'AzPTES (-12,5%). De plus, il y a une **dilatation hors du plan du substrat (+3,1%), qui pourrait s'expliquer par**



**une épaisseur des murs bien plus importante pour le sol avec 17,5% d’AzPTES.** Ceci expliquerait notamment pourquoi la contraction est plus faible dans le plan du substrat, malgré des pores plus petits à fort taux d’AzPTES (du fait de la diminution du rapport F127/Si).

Cette hypothèse concernant une taille de murs bien plus importante pour le sol Az17,5% est à mettre en regard avec les résultats mis en avant dans le cadre de l’étude par RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$ . Ces résultats avaient montré une forte condensation initiale du sol possédant 17,5% d’AzPTES, notamment au niveau des espèces  $T_n$ , avec un risque que plusieurs molécules d’AzPTES aient co-condensé ensemble (cf. §II.4.1.1.3, page 62). La présence d’espèces  $T_n$  co-condensées expliquerait qu’il se produise un changement dans la morphologie des oligomères, à savoir **une taille d’oligomères plus importante et une condensation des oligomères plus « longitudinale » que réticulaire**, et qui se traduirait alors par une augmentation importante de la taille des murs de silice dans le mésoporeux.

### **II.6.1.3. Conclusion sur l’organisation de la structuration en fonction du taux d’AzPTES**

En conclusion, l’augmentation du taux d’AzPTES entraîne une disparition de la phase rectangulaire centrée au profit d’une proportion de phase vermiculaire plus importante. Il semblerait y avoir un point d’équilibre autour de 10% d’AzPTES, du fait de la présence des deux structurations parfois obtenues, mais avec une forte dépendance vis-à-vis du taux d’humidité pour ce taux d’AzPTES. Un taux de 5% d’AzPTES semble idéal pour stabiliser la phase rectangulaire centrée, qui présente alors moins de désordre que des échantillons imprimés avec un taux d’AzPTES inférieur.

L’étude a permis de montrer que **l’augmentation du taux d’AzPTES a une influence sur la courbure des micelles lors du mécanisme d’auto-assemblage et résulte en deux phénomènes singuliers : une diminution de la taille des pores, du fait d’un rapport tensioactif/Si moins important, mais aussi une augmentation de l’épaisseur des murs de silice, du fait d’une forte condensation des oligomères de silice du système.** Ceci s’illustre très bien pour les taux d’AzPTES de 0 à 10%.

En revanche, **pour un taux d’AzPTES de 17,5%, la structure est singulière et présente une dilatation importante de la structure par rapport au sol de référence, qui dénote en réalité une épaisseur des murs de silice beaucoup plus importante pour 17,5% d’AzPTES.**

**La structuration de la porosité est donc fortement influencée par le taux d’AzPTES, mais est aussi influencée par d’autres facteurs.** L’étude de tests croisés permet de déterminer la prédominance de facteurs par rapport à d’autres, dans la détermination de cette structuration de la porosité.



## II.7. Importance relative des différents facteurs sur la structuration : tests croisés

D'après l'étude de l'influence des facteurs réalisée, ainsi que grâce à des tests croisés supplémentaires, la prédominance de certains facteurs sur d'autres a été observée :

- **Le taux d'AzPTES a une plus forte influence que le taux d'humidité** : ceci a été montré sur un échantillon avec **5% d'AzPTES**, qui donne une structuration globalement rectangulaire centrée, malgré un **taux d'humidité bas, de 35%**. En effet, un faible taux d'humidité aurait tendance à favoriser plutôt la structuration vermiculaire, mais ce n'est pas le cas pour 5% d'AzPTES.
- **Le taux d'AzPTES a une plus forte influence que l'effet du nombre de couches, l'espacement entre les plots ou la stratégie de dépôt (libre ou trapèze)** : en effet, un échantillon avec **1% d'AzPTES** imprimé avec **10 couches** en **mode trapèze** (avec un espacement de 40  $\mu\text{m}$  et une humidité relative de 42%) a toujours montré la structuration rectangulaire centrée en surface (Figure 52-a). D'autre part, **un échantillon avec 17,5% d'AzPTES imprimé avec 2 couches en mode libre et avec un espacement entre plots de 30  $\mu\text{m}$ , donne uniquement la structuration vermiculaire** (Figure 52-b), alors que les paramètres d'impression favoriseraient une structure rectangulaire centrée.

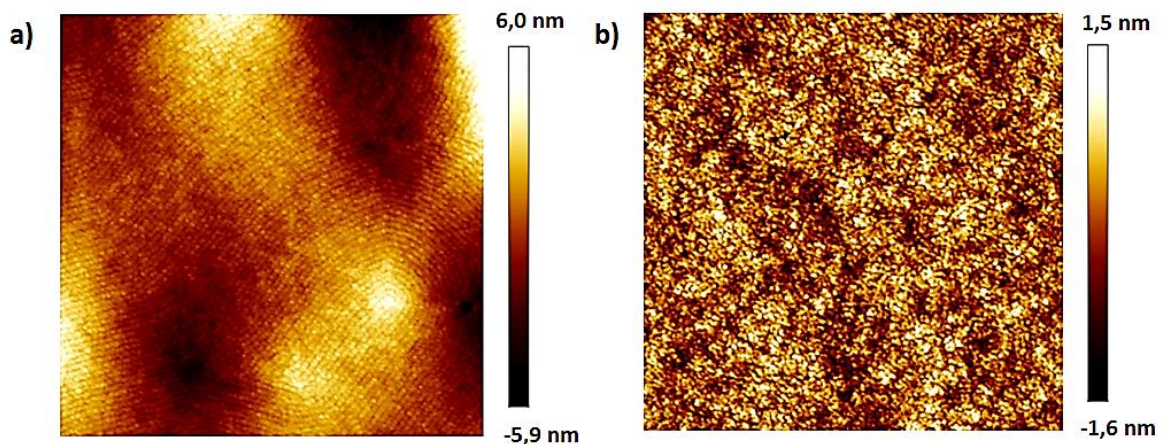


Figure 52 – Scans AFM ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ) de la surface d'un microplot imprimé sur lamelle de verre dans les conditions suivantes : Az1%, N10, trapèze, E40, HR42% (a) et Az17,5%, N2, libre, E30, HR37% (b)

Ainsi, il a été montré qu'en-dessous de 5% d'AzPTES, la structuration est majoritairement rectangulaire centrée. Au-dessus de 10%, la structuration est majoritairement vermiculaire. L'étude de la prédominance des autres facteurs n'a ainsi pu être mise en évidence que pour un taux d'AzPTES de 10%.





**Pour 10% d'AzPTES**, la prédominance des facteurs s'exprime de la façon suivante :

- **Le type de réseau a une plus forte influence que l'espacement entre les plots** (paragraphe II.5.2, page 69) : démontré par comparaison entre un **réseau hexagonal avec un espacement de 70  $\mu\text{m}$**  (structuration rectangulaire centrée) et un **réseau carré avec un espacement de 40  $\mu\text{m}$**  (structuration vermiculaire). Cette conclusion découle indirectement de la concentration en solvant lors de l'évaporation : les vapeurs sont plus condensées pour un réseau hexagonal que pour un réseau carré, ce qui explique une structuration rectangulaire centrée favorisée dans le cas du réseau hexagonal par rapport au réseau carré.
- **Le nombre de couches a une plus forte influence que l'espacement entre les plots** : ceci est déduit indirectement du fait que **la structuration change très brusquement entre des nombres de couches de 5 et 10** (paragraphe II.5.5, Figure 47, page 78), tandis que **la structuration ne change que très peu pour des espacements entre plots de 40, 70 et 100  $\mu\text{m}$**  (paragraphe II.5.3, Figure 43, page 73). De plus, quel que soit l'espacement, et dans des conditions d'hygrométrie favorables, les premières couches déposées ont toujours été très bien organisées, parallèlement au substrat.

**En conclusion, la prédominance des facteurs a permis de classer ces paramètres par ordre d'importance décroissante, ceci afin de prédire la structuration obtenue en fonction des paramètres choisis, et de garantir une reproductibilité du procédé en vue de son industrialisation.**

**La classification avec les facteurs par ordre d'importance décroissante est :**

- **Le taux d'AzPTES**
- **Le nombre de couches**
- **Le type de réseau (hexagonal ou carré centré)**
- **L'espacement entre les plots et la stratégie de dépôt (libre ou trapèze)**

Des tests complémentaires permettraient de déterminer comment classer le paramètre de l'humidité relative, afin éventuellement de pouvoir s'en affranchir d'un point de vue industriel.



## II.8. Vers une étape de pré-industrialisation : influence du traitement de consolidation

L'étape de recuit post-impression est importante pour la résistance du matériau, car cette étape fige la structuration de la porosité et vise à garantir une bonne tenue mécanique des microplots. Néanmoins, une casse des microplots est observée après fonctionnalisation, qui peut être liée à des contraintes mécaniques internes apparaissant lors de la consolidation. En effet, les données GISAXS ont permis de montrer qu'une contraction intervient suivant la normale au substrat [9], c'est-à-dire que les plots sont en compression suivant la normale au substrat. Il en résulterait alors des forces de traction tangentielle, le long de la surface des plots. Ce sont ces forces qui peuvent expliquer la casse des plots, telle qu'observée en MEB (Figure 53).

La morphologie des plots cassés montre une casse qui est intervenue au centre du plot, sans que les fissures ne touchent les bords. **Ce sont donc bien des forces de traction le long de la surface des plots, du centre du plot vers l'extérieur, qui sont à l'origine de la casse observée.**

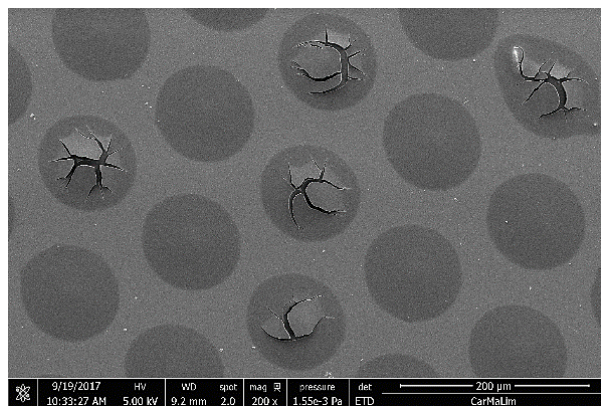


Figure 53 – Casse des plots observée au MEB

Dans un objectif d'industrialisation du procédé, il est évident que la casse des microplots doit être évitée à tout prix, afin que des morceaux ne restent pas à l'intérieur du patient, lors d'une observation endoscopique avec la sonde imprimée de plots. Il y a donc nécessité d'adapter le traitement thermique, qui engendre les contraintes thermo-mécaniques au niveau des microplots.

D'autre part, en vue de l'industrialisation, il serait intéressant de pouvoir mettre directement en consolidation des échantillons fraîchement imprimés, plutôt que d'attendre quelques jours avant consolidation. C'est pourquoi, **l'impact du temps de séchage avant consolidation sur le réseau poreux et la structure de la mésoporosité sera étudié.**

Le traitement de consolidation en étuve est également long, à une échelle de production industrielle (64h de traitement). **Un nouveau procédé de recuit, le recuit photonique (cf. Annexe 8), pourrait permettre de réduire ces temps de traitement et sera donc étudié.**



## II.8.1. Influence du temps de séchage avant recuit sur la structuration de la porosité

Dans un but d'industrialisation du procédé, il est intéressant de pouvoir diminuer au maximum tous les délais liés au procédé, et donc de réduire le temps entre l'impression des échantillons et leur consolidation, qui est habituellement de 2 à 3 jours.

Dans les conditions usuelles, **les échantillons sont imprimés à 48h de vieillissement et consolidés 3 jours après impression. D'autres conditions ont été testées, à savoir une impression au bout de 24 h de vieillissement, pour une consolidation 3 jours après impression ou 1 heure après.** Ceci a été réalisé avec un sol présentant 10% d'AzPTES et 2,5% de TFTS, imprimé selon des conditions dites « standards » : un réseau hexagonal de plots de 5 couches espacés de 40  $\mu\text{m}$ , imprimés en mode continu et avec une humidité relative autour de 40%. Ces échantillons ont ensuite été caractérisés par GISAXS et AFM (Figure 54).

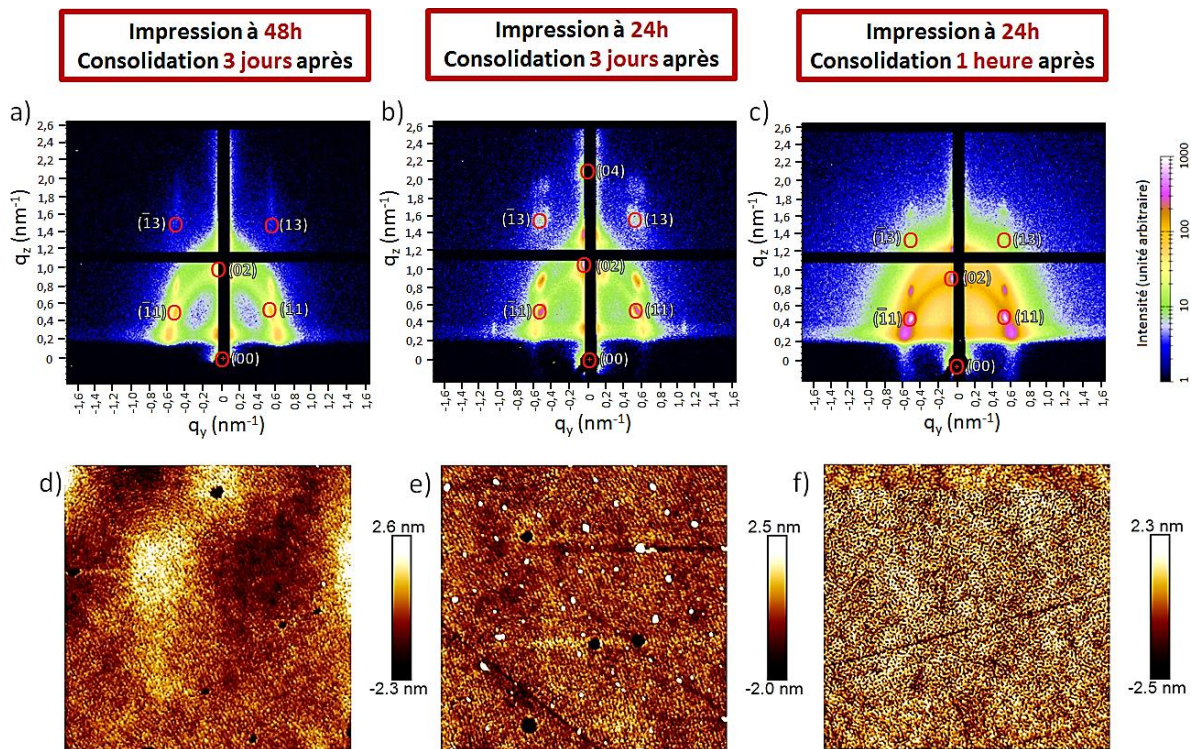


Figure 54 – Clichés GISAXS et scans AFM ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ) d'échantillons imprimés avec un sol Az10% imprimé : à 48 h de vieillissement et consolidé 3 jours après (a), à 24 h de vieillissement et consolidé 3 jours après (b) et à 24 h de vieillissement et consolidé directement après impression (c)

Comme observé précédemment, **l'échantillon imprimé à 48 h de vieillissement et consolidé 3 jours après impression** montre la présence de la phase rectangulaire centrée, visible à la fois sur le cliché GISAXS par les taches de diffusion (11), (02), et (13), mais aussi par l'analyse de surface en AFM (Figure 54-a et Figure 54-d). **Cet échantillon présente très peu de désordre dans sa structure, ce qui est visible à la fois par un anneau de diffusion de faible intensité, ainsi qu'une zone (un « halo ») entre l'anneau et le faisceau réfléchi qui est d'intensité très faible** (intensité < 10, Figure 54-a).



D'autre part, **l'échantillon imprimé après 24 h de vieillissement et consolidé 3 jours après impression présente également la structure rectangulaire centrée**, comme le montre le cliché GISAXS et le scan AFM en surface également (Figure 54-b et Figure 54-e). Par ailleurs, **cet échantillon est plus organisé que l'échantillon imprimé à 48 h de vieillissement et consolidé 3 jours après, en raison d'une intensité plus importante des taches de diffusion, synonyme d'une proportion de phase rectangulaire centrée plus importante**. Il est à noter que **la phase rectangulaire centrée de ces deux échantillons présente néanmoins un réseau poreux similaire**, les taches de diffusion étant aux mêmes positions ( $q_y$  ;  $q_z$ ) pour ces deux échantillons.

Enfin, **l'échantillon imprimé à 24 h de vieillissement et consolidé directement après impression** montre aussi la présence de la phase rectangulaire centrée, par une intensité forte des taches de diffusion (11) et (02). Néanmoins, **cet échantillon présente également une structure très désordonnée**, visible sur le scan AFM par l'apparition en surface de la phase vermiculaire (Figure 54-f), mais également sur le cliché GISAXS par un anneau de diffusion intense, et une **intensité importante de part et d'autre de cet anneau de diffusion** (un « halo » d'intensité d'environ 100, Figure 54-c). **Ceci traduit une disparité forte au niveau des distances entre deux pores**. D'autre part, les taches (11) et (02) sont situées aux mêmes positions en  $q_y$  par rapport aux deux autres échantillons, mais avec des valeurs de  $q_z$  moins importantes. Cela revient à dire que **les pores sont espacés de la même façon dans le plan du substrat, mais que selon la normale au substrat il y a une contraction moins forte**, par rapport à des échantillons consolidés 3 jours après impression.

Le désordre généré ainsi que la contraction plus faible s'expliquent alors par le fait que **l'échantillon mis directement en consolidation a subi un traitement brutal**. En effet, l'échantillon a été mis directement à 130 °C, sans qu'il n'y ait de rampe de montée en température, ce qui a ainsi figé la structure et explique aussi la grande disparité observée au niveau des distances caractéristiques du réseau poreux (*i.e.* un anneau de diffusion très étalé et de forte intensité). Ceci a néanmoins permis de montrer qu'**il est possible d'obtenir la phase vermiculaire en surface par ce moyen, tout en conservant une phase rectangulaire centrée qui serait localisée au cœur du microplot**.

**Néanmoins, cette méthode n'est pas utilisable industriellement car génère trop de disparités dans les distances entre deux pores, ce qui ne serait pas reproductible au niveau des échantillons préparés. Dans le cadre d'un traitement de consolidation en étuve, il faut donc maintenir un temps d'attente de 2 à 3 jours entre l'impression et la consolidation**. Un autre mode de recuit, le recuit photonique, présenterait l'avantage de réduire la durée de consolidation.



## II.8.2. Influence du type de recuit : essais par recuit photonique

Le recuit photonique (cf. Annexe 8) est un nouveau type de recuit qui consiste à exposer les échantillons à un flash lumineux de haute intensité, de faible durée (de l'ordre de quelques millisecondes) et sur une large plage de longueurs d'onde, du fait de l'utilisation d'une lampe Xénon. Ce type de recuit s'avère **particulièrement intéressant pour le traitement post-impression de dépôts réalisés par impression jet d'encre** [63]. Cette technique possède l'avantage de dissiper la chaleur rapidement au niveau du substrat, grâce à des pulses de très faibles durées, permettant de traiter des matériaux sur de nombreux supports, (verres, plastiques, etc). Néanmoins, du fait d'une forte énergie appliquée, des problèmes de décollement des dépôts peuvent parfois être observés, liés à l'adhésion des dépôts sur le substrat [63].

**Dans cette partie, les échantillons considérés ont été imprimés à partir d'un sol contenant 17,5% d'AzPTES et 2,5% de TFTS**, imprimés sur lamelles de verre avec un temps de vieillissement de 48 h selon un réseau hexagonal. Les plots sont constitués de 5 couches et sont imprimés en stratégie libre avec un espacement entre plots de 40  $\mu\text{m}$ .

### II.8.2.1. Tests préliminaires de recuit et caractérisation par microscopie

Des premiers tests ont été réalisés sur un équipement X-1100 de la société Xenon sur des échantillons imprimés le jour-même (HR = 45%). Ces premiers tests ont consisté en une étude exploratoire, avec un contrôle visuel de la tenue mécanique, en effleurant la surface avec un outil. Lorsque l'échantillon n'était pas consolidé, la tension a été progressivement augmentée, puis le nombre de pulses, jusqu'à avoir des échantillons cohésifs. Les conditions retenues pour consolider les plots sont : **une tension maximale de 3000 V appliquée, un pulse de durée 1 ms, répété 5 fois avec un temps d'attente de 500  $\mu\text{s}$  entre chaque pulse.**

Les échantillons ont été observés en microscopie optique et en MEB afin de voir si ce traitement avait généré de la casse au niveau des microplots. Une opacification légère de l'échantillon a été observée, ainsi que l'apparition de dendrites (Figure 55-a). L'analyse par contraste chimique (mode CBS, Figure 55-b) a permis de voir que les dendrites sont de même nature chimique que celle du substrat. L'explication de ce phénomène est donc liée à une **augmentation locale de la température au niveau des plots, qui est ensuite transmise au substrat. Cet échauffement de température provoque alors la cristallisation du substrat** (lamelles de verre) à partir des plots, suivant une croissance dendritique dans le plan du substrat. C'est d'ailleurs cette cristallisation du substrat qui explique son opacification. **Afin de s'affranchir de cette cristallisation, il faut alors augmenter le temps d'attente entre les pulses**, ce qui devrait permettre une meilleure dissipation d'énergie avant l'application du flash suivant, et ainsi éviter une accumulation locale de chaleur.



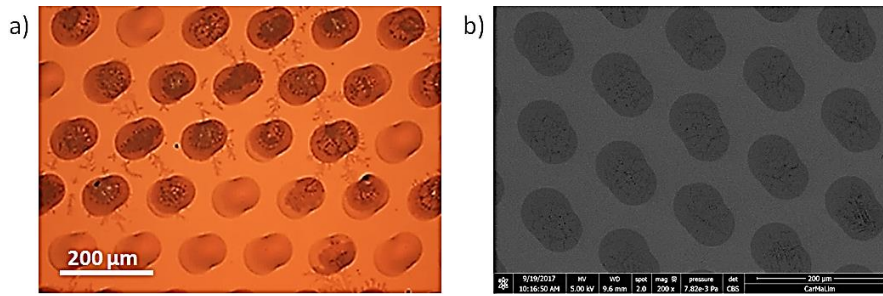


Figure 55 – Essais préliminaires de recuit photonique montrant une cristallisation type dendritique du substrat (a), et observation MEB en mode CBS (d).

Des tests supplémentaires ont alors été réalisés sur un autre équipement mis à disposition par la société Ceradrop, équipée de cette technologie pour le recuit de matériaux réalisés par impression jet d'encre. Afin d'étudier l'influence du recuit sur la fonctionnalisation ultérieure, les dépôts ont été réalisés sur des wafers de silicium et des lamelles de verre. Afin d'éviter la cristallisation du substrat, le temps d'attente entre pulses a été fortement augmenté à 6 secondes (contre 500 μs auparavant), toujours pour une tension appliquée de 3000 V, un pulse de 1 ms, répété 5 ou 15 fois. La microscopie optique n'a alors montré aucune cristallisation des substrats. Par ailleurs, l'étalement des plots sur le substrat est plus important en utilisant le recuit photonique (Figure 56). Ceci peut s'expliquer par une diminution de la viscosité du dépôt, en lien avec une augmentation locale de température. En effet, le système n'est pas figé après impression et les dépôts sont libres de s'étaler davantage sur le substrat.

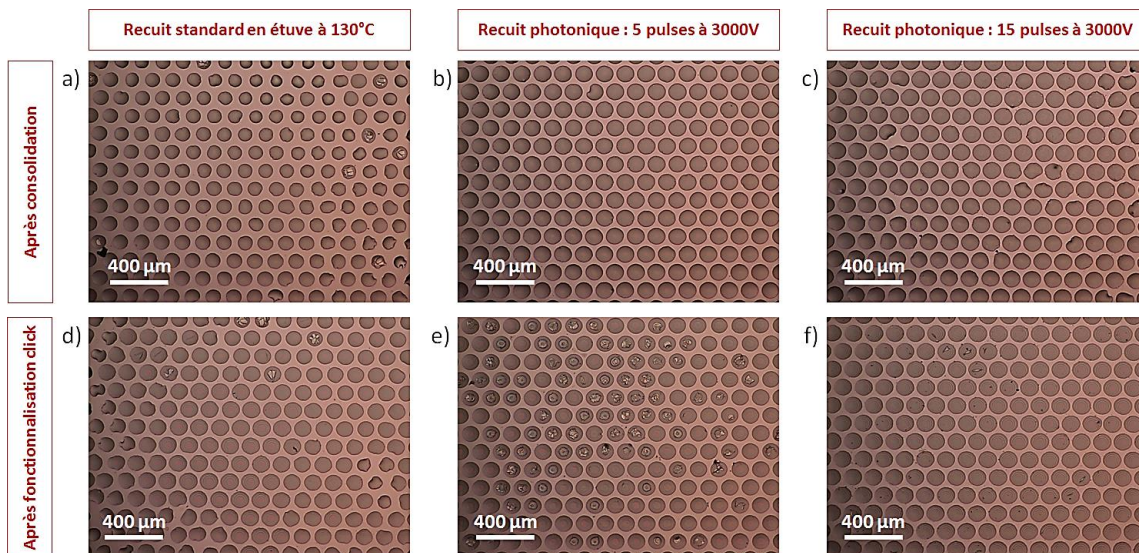


Figure 56 – Images en microscopie optique d'échantillons consolidés 1 h après impression : par recuit en étuve à 130 °C (a)(d), par recuit photonique avec 5 pulses (b)(e) ou par recuit photonique avec 15 pulses (c)(f), après consolidation et après fonctionnalisation

**Après consolidation**, il est possible d'observer qu'il y a de la casse sur les échantillons recuits en étuve à 130 °C (Figure 56-a), alors qu'il n'y en a presque pas sur les échantillons qui ont subi le recuit photonique (Figure 56-b et c).



**Après fonctionnalisation par chimie *click*** (cf. Chapitre III), où les échantillons sont immergés dans des solvants chauds durant 24 à 48 h, de la casse est observée. **L'échantillon consolidé en étuve présente une casse plus importante qu'après consolidation, bien que dans des proportions acceptables (< 10%).** En revanche, **un échantillon consolidé par recuit photonique avec 5 pulses présente beaucoup de casse des plots (> 40%),** bien que celle-ci ne génère pas de décollement de morceaux de plots, mais uniquement une fissuration du centre des plots. Ceci peut être dû à une rigidité trop faible du réseau poreux, ainsi qu'à des contraintes internes trop fortes. Celles-ci seraient alors relâchées par fissuration sous l'effet du solvant et des forces capillaires importantes, lorsque les échantillons sont sortis du milieu *click*. Par contre, **un échantillon consolidé par recuit photonique avec 15 pulses montre une bonne intégrité de la structure des plots, avec une faible casse (< 5%)** et pas de décollement de morceaux de plots.

**L'échantillon consolidé par recuit photonique avec 15 pulses a donc été mieux consolidé que les deux autres échantillons.** Ceci pourrait s'expliquer par une consolidation plus aboutie sur des échantillons traités par recuit photonique, lorsque la puissance de recuit est suffisante, conduisant à une meilleure tenue mécanique des murs de silice et par conséquent à une meilleure rigidité de la structure poreuse.

### **II.8.2.2. Influence du recuit photonique sur la structuration de la mésoporosité**

**L'intégrité de la porosité doit être étudiée,** car il est possible que le recuit photonique engendre un phénomène de bouchage des pores et mette en défaut la fonctionnalisation du matériau, qui est conditionnée par l'accessibilité des pores. Dans ce but, des échantillons ont été caractérisés après recuit en AFM et GISAXS (Figure 57).

Les clichés GISAXS montrent que la structuration est vermiculaire pour tous les échantillons. En revanche, **les échantillons consolidés par recuit photonique présentent un anneau de diffusion dont l'amplitude en  $q_z$  est plus faible** comparativement à ceux traités en étuve. **Ceci correspond à un réseau poreux plus dilaté selon la normale au substrat,** car le recuit photonique aurait tendance à figer le système. Ce phénomène est plus marqué pour l'échantillon recuit avec 5 pulses, mais sa rugosité de surface est assez différente de celle des deux autres échantillons (Figure 57-b). Ceci suggère que le recuit n'est pas tout à fait terminé, ce qui serait en accord avec une casse accentuée sur ces échantillons lors des traitements post-consolidation (Figure 56-e). Pour l'échantillon recuit avec 15 pulses, il semble qu'il soit bien consolidé, avec un état de surface similaire aux échantillons recuits en étuve, comme le montre l'utilisation d'une échelle de couleur adaptée en AFM (Figure 57-a et c).

**La porosité est donc maintenue avec le recuit photonique, et les échantillons ne subissent pas de contraction aussi élevée que dans le cas du recuit en étuve.**



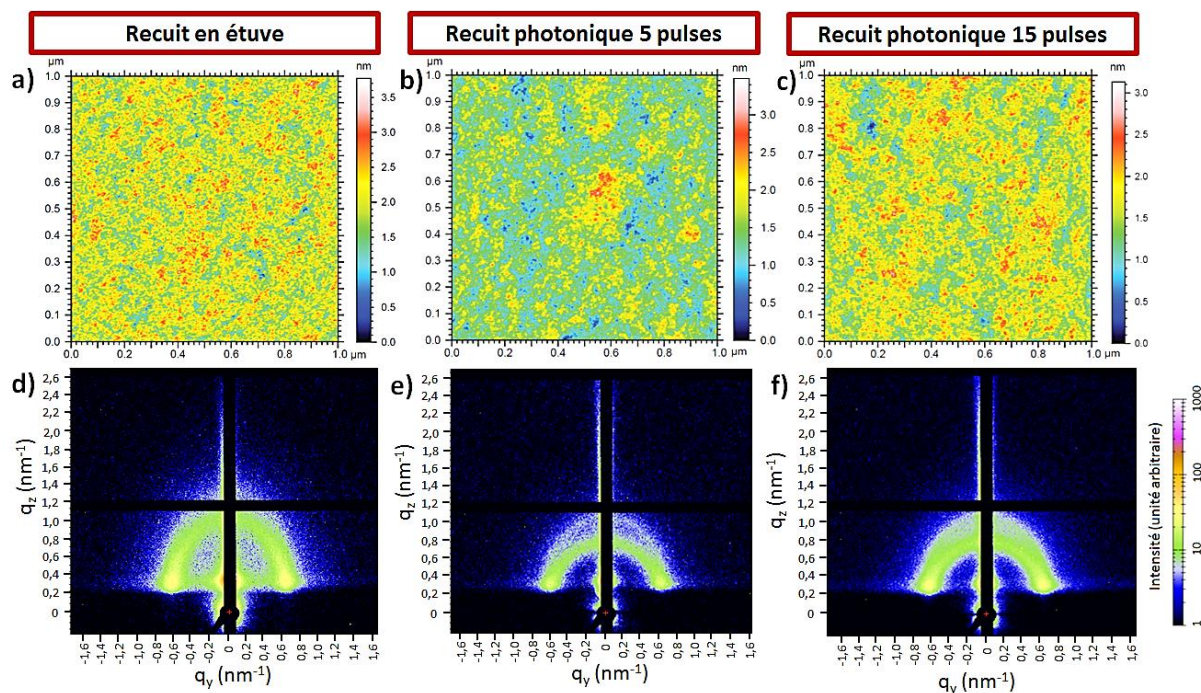


Figure 57 – Images AFM ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ) et clichés GISAXS d'un échantillon consolidé : par recuit standard en étuve (a)(d), par recuit photonique avec 5 pulses (b)(e) ou 15 pulses (c)(f)

### II.8.2.3. Influence du recuit photonique sur la chimie du matériau et sur la fonctionnalisation

Concernant la signature chimique des dépôts, il est possible que la chaleur appliquée au cours du recuit photonique altère les fonctions organiques, notamment les fonctions azotures ( $-\text{N}_3$ ) qui permettent la fonctionnalisation post-impression des dépôts. Les échantillons imprimés sur wafers de silicium ont alors été caractérisés par infrarouge en transmission (FTIR). Les spectres ont été normalisés par rapport à l'aire totale (Figure 58). Des différences sont notables au niveau de la signature de ces trois échantillons.

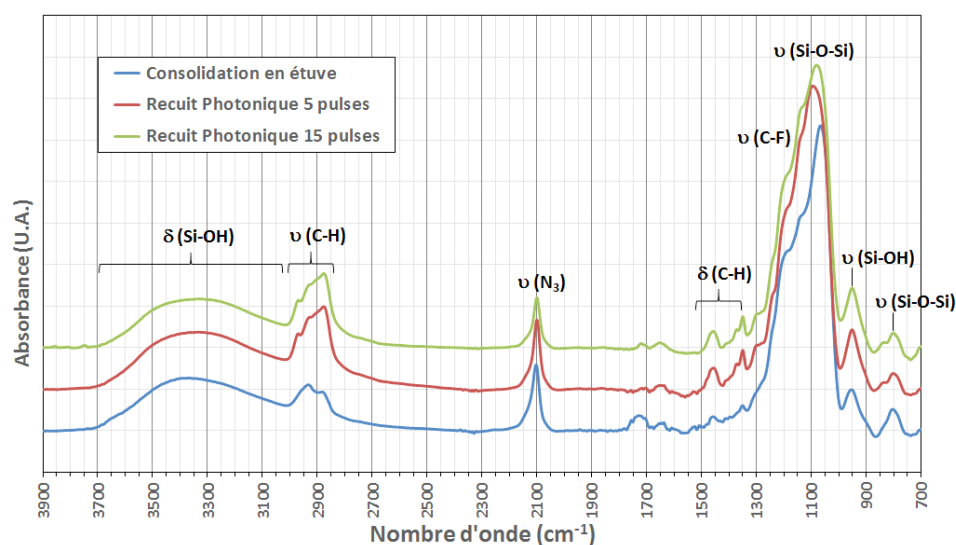


Figure 58 – Spectres infrarouge d'un échantillon consolidé en recuit standard en étuve, par recuit photonique avec 5 pulses ou bien par recuit photonique avec 15 pulses





**La bande azoture à 2100 cm<sup>-1</sup> est toujours présente sur les 3 spectres**, mais est d'intensité plus faible pour le recuit avec 15 pulses, signe qu'une altération des fonctions azotures a lieu lors de l'utilisation du recuit photonique, bien qu'elle soit faible.

D'autre part, les échantillons ayant subi un recuit photonique montrent des liaisons plus fortes entre 3000 et 2800 cm<sup>-1</sup>, mais aussi l'apparition de deux bandes à 1470 et 1380 cm<sup>-1</sup>, et entre 1300 et 1000 cm<sup>-1</sup> une enveloppe du spectre (ensemble de bandes) d'intensité plus importante. **Le recuit photonique a donc une influence sur la chimie des dépôts.** Il est possible que les variations observées soient dues à des altérations des liaisons -CH<sub>2</sub> et -CH<sub>3</sub>, majoritairement présentes au niveau du tensioactif F127. **Il est donc possible que le tensioactif F127, en tant que polymère, subisse une altération sous l'effet d'une trop forte température, qui modifie sa chimie.** En effet, l'intensité des bandes d'intérêt diminue fortement après lavage de la porosité et *click* (cf. Figure 59).

Enfin, il semblerait que la condensation soit incomplète dans le cas des échantillons recuits photonique. En raison d'une variation des bandes entre 1300 et 1000 cm<sup>-1</sup>, il n'est pas possible de raisonner directement sur la bande Si-O-Si située à 1100 cm<sup>-1</sup>. Cependant la bande des liaisons Si-O-Si à 800 cm<sup>-1</sup> est moins importante et la bande Si-OH située à 946 cm<sup>-1</sup> est plus importante pour les échantillons recuits photonique, par rapport à l'échantillon recuit en étuve. **Ces éléments traduisent une condensation incomplète [64].**

#### II.8.2.4. Influence du recuit photonique sur la fonctionnalisation par chimie *click*

En ce qui concerne le potentiel de fonctionnalisation, des échantillons recuits par photonique et recuits en étuve ont été *clickés* (cf. Chapitre III) par le pentynoate de NHS (Figure 59), après lavage de la porosité, et ont été caractérisés par infrarouge en transmission (Figure 60).

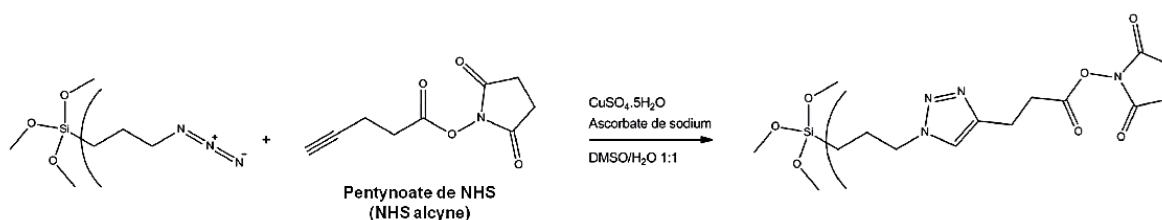


Figure 59 – Réaction *click* azotures-alcynes du pentynoate de NHS



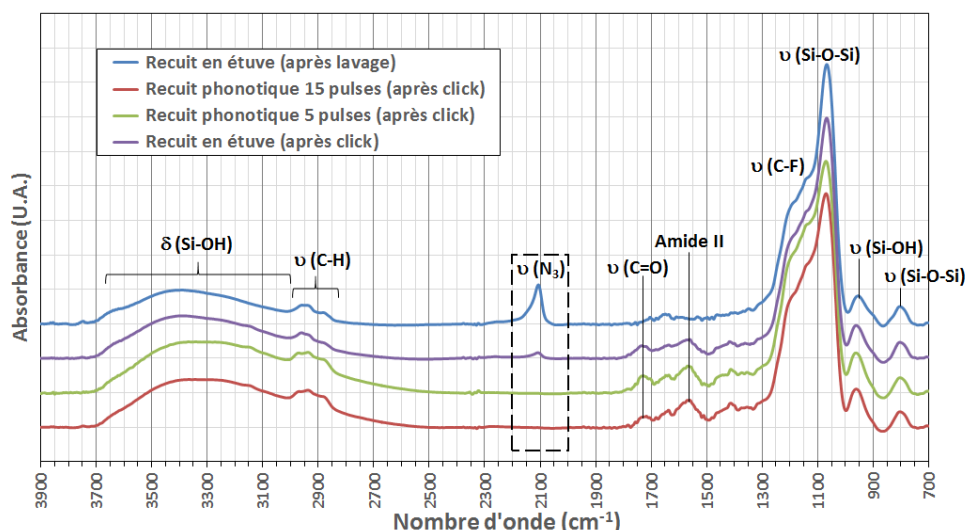


Figure 60 – Spectres infrarouge d'échantillons après réaction click pour différentes conditions de recuit. Spectre infrarouge d'un échantillon lavé mais non-clické pour comparaison.

La diminution observée pour la bande azotures à  $2100\text{ cm}^{-1}$  et l'apparition des bandes spécifiques du groupement NHS, notamment la bande de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  ester à  $1734\text{ cm}^{-1}$  ainsi que les amides aromatiques II autour de  $1570\text{ cm}^{-1}$ , témoignent de la réaction de fonctionnalisation spécifique des azotures ( $-\text{N}_3$ ) avec les alcynes (liaison terminale  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) du pentynoate de NHS. **L'atténuation de la bande azotures est plus importante pour les échantillons ayant subi un recuit photonique par rapport aux échantillons recuits en étuve, ce qui traduit une fonctionnalisation plus efficace grâce au recuit photonique.** Cette meilleure fonctionnalisation des échantillons recuits par photonique s'expliquerait par une meilleure accessibilité des fonctions azotures situées dans les pores, du fait d'une structure plus dilatée, comme l'ont montré les résultats GISAXS (cf. §II.8.2.2, page 94).

### II.8.2.5. Conclusions sur le recuit photonique

Il apparaît donc que **le recuit photonique permet de consolider les microplots de silice, sans donner lieu à une contraction forte du matériau, comme dans le cas d'une consolidation thermique en étuve.** L'intégrité des microplots semble meilleure avec un nombre élevé de pulses (15 pulses par exemple ont été testés), car de la casse est par exemple présente pour 5 pulses, du fait de l'immersion des échantillons dans la solution *click*. Par ailleurs, **les fonctions azotures sont maintenues et permettent une meilleure fonctionnalisation du matériau, grâce à des pores plus accessibles.**

Ces travaux ont permis de démontrer **l'intérêt certain d'utiliser le recuit photonique pour la consolidation des réseaux mésoporeux imprimés par impression jet d'encre.** Cette technologie présente un intérêt fort en vue de l'industrialisation du procédé car elle permettrait de réduire considérablement les temps de traitement consacrés à la consolidation.



## II.9. Conclusions générales sur la structuration de la mésoporosité

L'étude de l'influence des paramètres liés au procédé d'impression jet d'encre a permis de mieux comprendre leur incidence sur la structuration de la mésoporosité et de garantir une reproductibilité à une échelle industrielle. Par ailleurs, des contrôles au niveau des échantillons sont inenvisageables dans une optique de suivi en cours de fabrication, de par le coût engendré. **Aussi, l'étude de l'influence des paramètres liés au procédé a permis de déterminer une stratégie pour obtenir systématiquement la structuration recherchée.**

Quel que soit le type de structuration de la mésoporosité retenu (vermiculaire ou rectangulaire centrée), il est important de **maximiser la densité de plots** en vue de pouvoir fonctionnaliser au mieux le matériau lors des étapes post-impression. Ceci impose d'opter pour un **réseau de type hexagonal avec un espacement le plus petit possible**, tout en évitant la coalescence des plots entre eux (typiquement 40  $\mu\text{m}$ ). **Le facteur le plus déterminant sur l'organisation de la structuration est le taux d'AzPTES introduit dans l'encre.** Il existe un taux d'AzPTES entre 5 et 10% qui garantit l'existence des deux types de structurations (vermiculaire et rectangulaire centrée). Toujours afin de fonctionnaliser au mieux le matériau après impression, **il faut garantir un taux d'AzPTES maximum par rapport à la structuration recherchée.** En effet, à ce stade une question subsiste, qui est de savoir si l'un des types de structuration permet ou non une meilleure fonctionnalisation par chimie *click* et un meilleur greffage de biomolécules, comme envisagé pour l'application.

**Si la structure de type rectangulaire centrée est recherchée**, cela impose les conditions suivantes : un taux d'AzPTES inférieur à 10%, un taux d'humidité relative d'environ 40%, pour un mode d'impression en stratégie libre et un faible nombre de couches (de 1 à 5).

**Si la structuration de la mésoporosité de type vermiculaire est recherchée**, les paramètres devront être ajustés de la façon suivante : un taux d'AzPTES supérieur à 10% et inférieur à 17,5% (qui correspond au taux limite de fonctions et a montré un comportement difficile à contrôler). Idéalement, un taux de 15% d'AzPTES pourrait être envisagé, car ce taux permet un comportement sol-gel analogue au comportement à 10% d'AzPTES. Il est possible que la structuration soit toujours vermiculaire pour ce taux, ou bien si ce n'est pas le cas, des conditions favoriseraient son obtention : un taux d'humidité de 30% ou supérieur à 60%, une stratégie de dépôt de type trapèze pour favoriser l'évaporation rapide du solvant et éviter la formation de domaines organisés lors du mécanisme d'auto-assemblage.

Le recuit photonique a montré son utilité pour gagner un temps considérable dans la consolidation des échantillons. Enfin, **il reste à savoir quel type de structuration est le plus favorable du point de vue des étapes de fonctionnalisation post-impression (chimie *click* et greffage de protéines).** Cet aspect est développé dans le chapitre suivant.



## Sources – Chapitre 2

---

- [1] A. Gaddari, « Nouvelle méthode d'élaboration par voie sol-gel des couches minces de dioxyde d'étain : Applications à la détection à température ambiante d'ozone et d'ammoniac ». Thèse d'Université, Université de Franche-Comté, 2013.
- [2] D. Chateau, « Etude de l'influence de la structure et de la composition de matériaux hybrides monolithiques sur les propriétés optiques (luminescence et absorption non-linéaire) ». Thèse d'Université, Université de Lyon, 2013.
- [3] B. Mickael, « Elaboration et caractérisation d'un vernis antireflet sol-gel innovant pour application dans les systèmes d'écrans embarqués en aéronautique ». Thèse d'Université, Université Pierre et Marie Curie, 2014.
- [4] D. Kumar *et al.*, « Hydrophobic sol-gel coatings based on polydimethylsiloxane for self-cleaning applications », *Materials & Design*, vol. 86, p. 855-862, déc. 2015.
- [5] J.-P. Bonino, E. Xuereb, J. Esteban, et F. Ansart, *Les revêtements sol-gel pour l'anticorrosion*, vol. 99. 2011.
- [6] N. Posseme, « Etude de l'intégration des matériaux à très faible permittivité diélectrique dans une structure damascène pour les filières technologiques CMOS ». Thèse d'Université, Université Joseph Fourier de Grenoble, 2005.
- [7] C. Viazzi, « Elaboration par le procédé sol-gel de revêtements de zircone yttrée sur substrats métalliques pour l'application barrière thermique ». Thèse d'Université, Université de Toulouse III Paul Sabatier, 2007.
- [8] G. J. Owens *et al.*, « Sol-gel based materials for biomedical applications », *Progress in Materials Science*, vol. 77, p. 1-79, avr. 2016.
- [9] M. Mougnot, « Réalisation par un procédé d'impression jet d'encre de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2007.
- [10] I. M. Hutchings et G. D. Martin, « Introduction to Inkjet Printing for Manufacturing », 2012, p. 1-20.
- [11] C. J. Brinker, « Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure », *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 100, n° 1, p. 31-50, mars 1988.
- [12] P. Boch et J.-C. Nièpce, *Ceramic Materials: Processes, Properties and Applications*. iSTE Ltd, 2017.
- [13] E. J. A. Pope et J. D. Mackenzie, « Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst », *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 87, n° 1, p. 185-198, oct. 1986.
- [14] M. Niederberger et N. Pinna, *Metal oxide nanoparticles in organic solvents : synthesis, formation, assembly and application*. Dordrecht : Springer, 2009.
- [15] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, et J. S. Beck, « Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism », *Nature*, vol. 359, p. 710, oct. 1992.



- [16] G. J. de A. A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau, et J. Patarin, « Chemical Strategies To Design Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures », *Chem. Rev.*, vol. 102, n° 11, p. 4093-4138, nov. 2002.
- [17] Q. Huo *et al.*, « Organization of Organic Molecules with Inorganic Molecular Species into Nanocomposite Biphase Arrays », *Chem. Mater.*, vol. 6, n° 8, p. 1176-1191, août 1994.
- [18] J. S. Beck *et al.*, « A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, n° 27, p. 10834-10843, déc. 1992.
- [19] F. Cagnol, D. Grosso, G. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, F. Babonneau, et H. Amenitsch, *Humidity-Controlled Mesostructuring in CTAB-Templated Silica Thin Film Processing. The Existence of a Modulable Steady State*, vol. 13. 2003.
- [20] A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois, F. Cagnol, D. Grosso, C. Sanchez, et J. Rivory, *An in situ study of mesostructured CTAB-silica film formation using infrared ellipsometry: evolution of water content*, vol. 455-456. 2004.
- [21] D. Grosso *et al.*, « Fundamentals of Mesostructuring Through Evaporation-Induced Self-Assembly », *Advanced Functional Materials*, vol. 14, n° 4, p. 309-322, avr. 2004.
- [22] P. T. Tanev et T. J. Pinnavaia, « A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular Sieves », *Science*, vol. 267, n° 5199, p. 865, févr. 1995.
- [23] M. Kruk, M. Jaroniec, C. H. Ko, et R. Ryoo, « Characterization of the Porous Structure of SBA-15 », *Chem. Mater.*, vol. 12, n° 7, p. 1961-1968, juill. 2000.
- [24] G. Wanka, H. Hoffmann, et W. Ulbricht, « Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions », *Macromolecules*, vol. 27, n° 15, p. 4145-4159, juill. 1994.
- [25] A. Stein, B. J. Melde, et R. C. Schroden, « Hybrid Inorganic–Organic Mesoporous Silicates—Nanoscopic Reactors Coming of Age », *Advanced Materials*, vol. 12, n° 19, p. 1403-1419, oct. 2000.
- [26] X. S. Zhao et G. Q. Lu, « Modification of MCM-41 by Surface Silylation with Trimethylchlorosilane and Adsorption Study », *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, n° 9, p. 1556-1561, févr. 1998.
- [27] C. P. Tripp et M. L. Hair, « An infrared study of the reaction of octadecyltrichlorosilane with silica », *Langmuir*, vol. 8, n° 4, p. 1120-1126, avr. 1992.
- [28] C.-H. Lee, T.-S. Lin, et C.-Y. Mou, « Mesoporous materials for encapsulating enzymes », *Nano Today*, vol. 4, n° 2, p. 165-179, avr. 2009.
- [29] F. Cagnol, D. Grosso, et C. Sanchez, « A general one-pot process leading to highly functionalised ordered mesoporous silica films », *Chemical Communications*, vol. 10, p. 1742-1743, 2004.
- [30] A. Gibaud *et al.*, *Influence of Functional Organic Groups on the Structure of CTAB Templated Organosilica Thin Films*, vol. 14. 2004.
- [31] B. Alonso, A. R. Balkenende, P.-A. Albouy, H. Amenitsch, M.-N. Rager, et F. Babonneau, « Hybrid 3D Ordered Mesoporous Thin Films Made from Organosiloxane



Precursors », *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 26, n° 1, p. 587-591, janv. 2003.

[32] F. Babonneau, L. Leite, et S. Fontlupt, « Structural characterization of organically-modified porous silicates synthesized using CTA+ surfactant and acidic conditions », *J. Mater. Chem.*, vol. 9, n° 1, p. 175-178, 1999.

[33] P. N. Minoofar, R. Hernandez, S. Chia, B. Dunn, J. I. Zink, et A.-C. Franville, « Placement and Characterization of Pairs of Luminescent Molecules in Spatially Separated Regions of Nanostructured Thin Films », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, n° 48, p. 14388-14396, déc. 2002.

[34] V. Goletto, V. Dagry, et F. Babonneau, *One-Pot Synthesis Of A Cubic Silicate Phase Functionalized With Phenyl Groups*, vol. 576. 2011.

[35] B. Fousseret, « Fonctionnalisation in situ de réseau de microplots de silice mésoporeuse réalisés par un procédé d'impression jet d'encre ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2010.

[36] O. De Los Cobos, « Capteurs biologiques multifonctionnels (bio-puces) mis en forme par impression jet d'encre ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2013.

[37] H. Fan, S. Reed, T. Baer, R. Schunk, G. P. López, et C. J. Brinker, « Hierarchically structured functional porous silica and composite produced by evaporation-induced self-assembly », *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 44-45, p. 625-637, avr. 2001.

[38] H. Zhang *et al.*, « Mesoporous material grafted with luminescent molecules for the design of selective metal ion chemosensor », *Journal of Luminescence*, vol. 117, n° 1, p. 68-74, mars 2006.

[39] S. Bourg, J.-C. Broudic, O. Conocar, J. J. E. Moreau, D. Meyer, et M. Wong Chi Man, « Tailoring of Organically Modified Silicas for the Solid-Liquid Extraction of Actinides », *Chem. Mater.*, vol. 13, n° 2, p. 491-499, févr. 2001.

[40] N. Brun *et al.*, « Eu<sup>3+</sup>@Organo-Si(HIPE) Macro-Mesocellular Hybrid Foams Generation: Syntheses, Characterizations, and Photonic Properties », *Chem. Mater.*, vol. 20, n° 22, p. 7117-7129, nov. 2008.

[41] O. De Los Cobos *et al.*, « Tunable Multifunctional Mesoporous Silica Microdots Arrays by Combination of Inkjet Printing, EISA, and Click Chemistry », *Chem. Mater.*, vol. 24, n° 22, p. 4337-4342, nov. 2012.

[42] J. L. Bartels, P. Lu, A. Walker, K. Maurer, et K. D. Moeller, « Building addressable libraries: a site-selective click-reaction strategy for rapidly assembling mass spectrometry cleavable linkers (Supporting Information) », *Chem. Commun.*, n° 37, p. 5573-5575, 2009.

[43] X. Cattoën *et al.*, « Click approaches in sol-gel chemistry », *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 70, n° 2, p. 245-253, mai 2014.

[44] D. Grosso, A. R. Balkenende, P. A. Albouy, A. Ayrat, H. Amenitsch, et F. Babonneau, « Two-Dimensional Hexagonal Mesoporous Silica Thin Films Prepared from Block Copolymers: Detailed Characterization and Formation Mechanism », *Chem. Mater.*, vol. 13, n° 5, p. 1848-1856, mai 2001.



- [45] D. Grosso, A. R. Balkenende, P. A. Albouy, et F. Babonneau, « Structural analysis of hexagonal mesoporous silica films produced from triblock-copolymer-structuring sol-gel », in *Studies in Surface Science and Catalysis*, vol. 129, A. Sayari et M. Jaroniec, Éd. Elsevier, 2000, p. 673-682.
- [46] H. Fan *et al.*, « Rapid prototyping of patterned functional nanostructures », *Nature*, vol. 405, p. 56, mai 2000.
- [47] J.-I. Jung, J. Y. Bae, et B.-S. Bae, « Characterization and mesostructure control of mesoporous fluorinated organosilicate films », *J. Mater. Chem.*, vol. 14, n° 13, p. 1988-1994, 2004.
- [48] Q. Wei, Z. Nie, Y. Hao, Z. Chen, J. Zou, et W. Wang, *Direct synthesis of thiol-ligands-functionalized SBA-15: Effect of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane concentration on pore structure*, vol. 59. 2005.
- [49] M. Klotz *et al.*, « The True Structure of Hexagonal Mesophase-Templated Silica Films As Revealed by X-ray Scattering: Effects of Thermal Treatments and of Nanoparticle Seeding », *Chem. Mater.*, vol. 12, n° 6, p. 1721-1728, juin 2000.
- [50] B. Fousseret *et al.*, « Inkjet-Printing-Engineered Functional Microdot Arrays Made of Mesoporous Hybrid Organosilicas », *Chem. Mater.*, vol. 22, n° 13, p. 3875-3883, juill. 2010.
- [51] J. Deisenhofer, « Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution », *Biochemistry*, vol. 20, n° 9, p. 2361-2370, avr. 1981.
- [52] A. K. Trilling, J. Beekwilder, et H. Zuilhof, « Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview », *Analyt.*, vol. 138, n° 6, p. 1619-1627, 2013.
- [53] H. Xu, J. R. Lu, et D. E. Williams, « Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin », *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n° 4, p. 1907-1914, févr. 2006.
- [54] R. Noguéra, « Développement d'un procédé de prototypage rapide de type impression ». Thèse d'Université, Université de Limoges, 2004.
- [55] M. Lejeune, R. Noguéra, T. Chartier, et M. Oudjedi, « Procédé de fabrication d'un composant multimatériaux tridimensionnel par impression du type jet d'encre », Brevet Européen EP 1 660 306 B1.
- [56] L. Delattre, « Caractérisation structural des étapes d'élaboration par voie sol-gel de matériaux hybrides organiques-inorganiques ». Thèse d'université, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 1996.
- [57] V. Gualandris, « Oxycarbures de silicium à partir de polysiloxanes préparés par voie sol-gel : caractérisation par résonance magnétique nucléaire ». Thèse d'université, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 1998.
- [58] N. Massad-Ivanir *et al.*, « Porous Silicon-Based Biosensors: Towards Real-Time Optical Detection of Target Bacteria in the Food Industry », *Scientific Reports*, vol. 6, p. 38099, nov. 2016.
- [59] H. Hu et R. G. Larson, « Analysis of the Effects of Marangoni Stresses on the Microflow in an Evaporating Sessile Droplet », *Langmuir*, vol. 21, n° 9, p. 3972-3980, avr. 2005.



- [60] M. Matheron, « Films mésoporeux hybrides organiques-inorganiques : synthèse, organisation des pores et application en optique ophtalmique ». Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique, 2005.
- [61] S. Besson, T. Gacoin, C. Ricolleau, C. Jacquiod, et J.-P. Boilot, « Phase diagram for mesoporous CTAB–silica films prepared under dynamic conditions », *J. Mater. Chem.*, vol. 13, n° 2, p. 404-409, 2003.
- [62] D. Grosso *et al.*, « An in Situ Study of Mesostructured CTAB–Silica Film Formation during Dip Coating Using Time-Resolved SAXS and Interferometry Measurements », *Chem. Mater.*, vol. 14, n° 2, p. 931-939, févr. 2002.
- [63] E. Drahi, « Impression de silicium par procédé jet d'encre : des nanoparticules aux couches minces fonctionnelles pour applications photovoltaïques ». Thèse d'Université, Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2013.
- [64] A. Letailleur *et al.*, *Sol–Gel Derived Hybrid Thin Films: The Chemistry behind Processing*, vol. 23. 2011.







## Chapitre III. Fonctionnalisation des microplots de silice mésoporeuse pour du diagnostic de cancers précoces .....107

III.1. Etat de l'art : Chimie <i>click</i> et CuAAC .....	107
III.1.1. Principe de la chimie <i>click</i> .....	107
III.1.2. Réaction <i>click</i> azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC).....	108
III.1.3. Principaux systèmes catalytiques utilisés .....	110
III.1.4. Chimie <i>click</i> et applications en biologie.....	111
III.2. Travaux antérieurs sur la fonctionnalisation de microplots de silice par chimie <i>click</i> catalysée au cuivre (I), suivie du greffage de biomolécules.....	112
III.2.1. Evacuation du tensioactif F127 .....	112
III.2.2. Premiers tests de réaction <i>click</i> réalisés avec des alcynes modèles.....	112
III.2.3. Tests de <i>click</i> en vue d'une fabrication de biocapteur : <i>click</i> d'éthynyl ferrocène .....	113
III.2.4. Tests de <i>click</i> pour du diagnostic de cancers : <i>click</i> du pentynoate de NHS .....	114
III.2.5. Greffage de biomolécules pour la détection de marqueurs cancéreux.....	115
III.3. Objectifs de l'étude, moyens mis en œuvre et conditions expérimentales .....	116
III.3.1. Objectifs de l'étude et démarche adoptée.....	116
III.3.2. Conditions expérimentales pour la préparation des échantillons.....	118
III.3.2.1. Lavage de la porosité.....	118
III.3.2.2. Protocoles de la réaction <i>click</i> du pentynoate de NHS .....	118
III.3.2.3. Protocoles de greffage des protéines et des anticorps sur les microplots... ..	119
III.3.3. Moyens mis en œuvre et techniques .....	120
III.4. Optimisation de l'étape de réaction <i>click</i> du pentynoate de NHS.....	121
III.4.1. Etude du lavage préliminaire de la porosité .....	121
III.4.1.1. Différents modes de lavages : soxhlet, bain marie, ultrasons .....	121
III.4.1.2. Utilisation de différents solvants pour le lavage de la porosité.....	122
III.4.2. Synthèse et conditions d'utilisation du pentynoate de NHS .....	123
III.4.2.1. Synthèse et contrôles du produit .....	123
III.4.2.2. Effet du vieillissement du NHS et des conditions de stockage.....	124
III.4.3. Optimisation des conditions de la réaction <i>click</i> du pentynoate de NHS .....	125
III.4.3.1. Tests de différents systèmes catalytiques .....	125
III.4.3.2. Ajustement du protocole.....	126
III.4.3.3. Ajustement des quantités utilisées .....	128
III.4.3.4. Ajustement du temps de réaction et tests croisés.....	129
III.4.4. Potentiel de fonctionnalisation en fonction de différents paramètres du matériau .....	131
III.4.4.1. Influence de l'étape de lavage de la porosité.....	131
III.4.4.2. Influence du taux d'AzPTES et de la structuration de la porosité.....	131
III.4.4.3. Influence du nombre de couches .....	132
III.4.5. Fiabilisation des étapes de lavages après réaction <i>click</i> .....	134
III.4.6. Conclusions sur l'étape de fonctionnalisation par chimie <i>click</i> .....	135
III.5. Etude du greffage des biomolécules sur des échantillons clickés .....	137
III.5.1. Vérification du greffage spécifique des protéines sur les microplots fonctionnalisés azotures.....	138
III.5.1.1. Greffage de protéines non marquées en fluorescence .....	138
III.5.1.2. Greffage de protéines marquées par un fluorochrome .....	140



III.5.2. Optimisation des protocoles de greffage de protéines G marquées .....	144
III.5.2.1. Maîtrise du taux de greffage (DOL) .....	145
III.5.2.2. Variation de la concentration en protéines et du temps de greffage .....	147
III.5.3. Incidence de paramètres matériaux sur l'efficacité du greffage des protéines ..	149
III.5.3.1. Etude du greffage des protéines par spectroscopie infrarouge en transmission .....	149
III.5.3.2. Etude du greffage des protéines par spectroscopie Raman et AFM.....	152
III.5.4. Mise en évidence du greffage des anticorps anti-TrkB sur les protéines G .....	155
III.5.5. Conclusions sur la biofonctionnalisation des échantillons mésoporeux.....	158
III.6. Vers un dispositif pré-industriel pour la détection par voie fibrée .....	160
III.6.1. Validation du dispositif développé pour l'excitation et la récupération du signal de fluorescence.....	160
III.6.2. Adaptation des protocoles pour la préparation des fibres et montages annexes .....	164
III.6.2.1. Impression jet d'encre de microplots sur fibres optiques .....	164
III.6.2.2. Lavage de la porosité et <i>click</i> du pentynoate de NHS .....	165
III.6.2.3. Biofonctionnalisations : montage plaque à puits et fonctionnalisation en goutte .....	165
III.6.3. Ajustement des techniques utilisées pour la caractérisation des fibres fonctionnalisées .....	166
III.6.4. Détection de cancers <i>in situ</i> sur différents modèles vivants ou prélèvements ...	169
III.6.4.1. Tests réalisés sur un modèle vivant <i>in situ</i> : modèle CAM de poulet .....	169
III.6.4.2. Autres campagnes réalisées et voies d'amélioration du dispositif .....	172
III.6.5. Recherche d'une optimisation de la sensibilité de détection du dispositif.....	174
III.6.5.1. Couples de fluorochromes utilisés et données de fluorescence .....	174
III.6.5.2. Test préliminaire avec le couple de fluorochromes AF594-AF647.....	175
III.6.5.3. Comparaison des couples AF488-AF594 et AF546-AF594 en voie liquide.	176
III.6.5.4. Etude des conditions de marquage des fluorochromes sur les biomolécules et des conditions d'accroche entre les protéines et les anticorps .....	178
III.6.5.5. Etude de l'orientation des anticorps en surface des réseaux de microplots	180
III.6.5.6. Conclusions sur les tests avec différents couples de fluorochromes .....	181
III.6.6. Test du couple de fluorochromes AF488-AF594 sur modèle vivant (souris) .....	182
III.6.7. Conclusions et perspectives .....	184
Sources – Chapitre 3.....	186



## Chapitre III. Fonctionnalisation des microplots de silice mésoporeuse pour du diagnostic de cancers précoces

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la fonctionnalisation des microplots peut être réalisée par voie *one-pot*, en incorporant les éléments fonctionnels directement dans le sol. Néanmoins, à chaque élément correspond un comportement sol-gel différent, ce qui complexifie l'étude dans le cas de différentes fonctionnalisations. La fonctionnalisation par silylation peut se révéler utile pour ne pas devoir réétudier le comportement de multiples sols de compositions différentes. **Une autre voie est cependant possible, et qui présente l'intérêt d'avoir une très grande adaptabilité : la fonctionnalisation post-impression par chimie *click*.**

Les dépôts étant réalisés avec des fonctions azotures ( $-N_3$ ), comme vu au chapitre II, ils vont présenter le grand avantage de **pouvoir être fonctionnalisés par une multitude de molécules présentant des fonctions alcynes ( $R-C\equiv CH$ )**, comme dans le cas du pentynoate de NHS.

### III.1. Etat de l'art : Chimie *click* et CuAAC

#### III.1.1. Principe de la chimie *click*

Le concept de chimie « *click* » ou « *click chemistry* » a été introduit à l'occasion des travaux de l'équipe du Pr. Sharpless [1]. Ce concept désigne globalement un ensemble de réactions modulables, à rendement élevé, spécifiques (pas de sous-produits ou facilement séparables) et faciles de mise en œuvre.

Plusieurs types de réactions *click* ont été définis (Figure 61) :

- Les **cycloadditions d'espèces insaturées**, notamment la réaction de **cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC)** et de Diels-Alder.
- Les **substitutions nucléophiles**, notamment les réactions d'ouvertures d'hétérocycles contraints, comme les époxydes, les aziridines, les sulfates cycliques etc.
- La **chimie des carbonyles non-aldol**, comme la formation d'urées, de thiourées, d'hétérocycles aromatiques, d'oximes et éthers, d'hydrazones et d'amides.
- Les **additions sur liaisons multiples C-C**, *i.e.* les réactions d'oxydation, d'époxydation, de dihydroxylation, d'aziridations et certaines additions de Michaël.



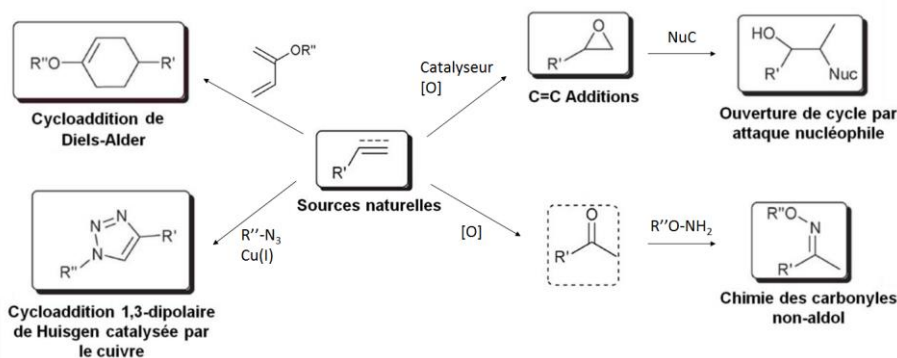


Figure 61 – Réactions types de chimie click [2]

En particulier, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen est une réaction entre un dipolarophile (alcène, alcyne, carbonyle, nitrile, ...) et un composé 1,3-dipolaire (azoture, oxyde de nitrile, diazo-alcane) qui conduit à la formation d'un hétérocycle à 5 atomes. Néanmoins, **cette réaction nécessite des températures élevées ( $T > 100\text{ °C}$ ) et n'est pas stéréospécifique**. En effet, la cycloaddition (2+3) entre un azoture et un alcyne conduit à un mélange d'isomères 1,4 et 1,5 du cycle triazole [3] (Figure 62).

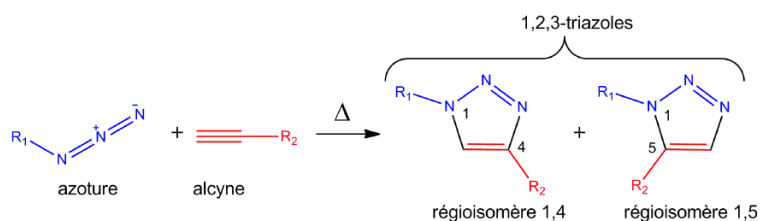


Figure 62 – Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un azoture et un alcyne terminal [3]

C'est en 2002 que Tornøe *et al.* [4] ont utilisé des sels de cuivre (I) afin de catalyser cette réaction, **la réaction *click* azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) ou CuAAC**.

### III.1.2. Réaction *click* azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC)

Par rapport à la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, qui est une réaction thermo-activée, la CuAAC présente l'avantage de pouvoir s'affranchir du chauffage et possède **une propriété de régio-sélectivité en ne donnant que le régioisomère 1,4** (Figure 63).

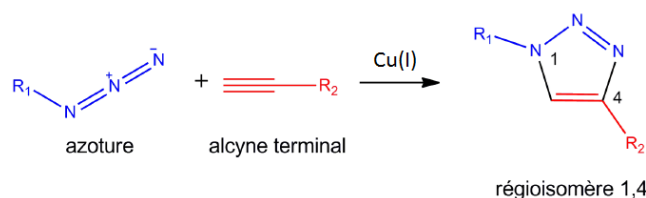


Figure 63 – Cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) : CuAAC

Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de la formation du triazole. Un premier modèle a été proposé par Rostovtsev en 2002 [5] pour expliquer cette réaction (Figure 64).



Dans un premier temps, il y aurait formation d'un complexe cuivre-alcyne (**2**), suivi d'un complexe azoture-cuivre-alcyne (**3**). Celui-ci forme un cycle intermédiaire (**4**) avant de former un triazole (**5**) qui va donner le triazole final de la réaction, par scission de la liaison Cu-C.

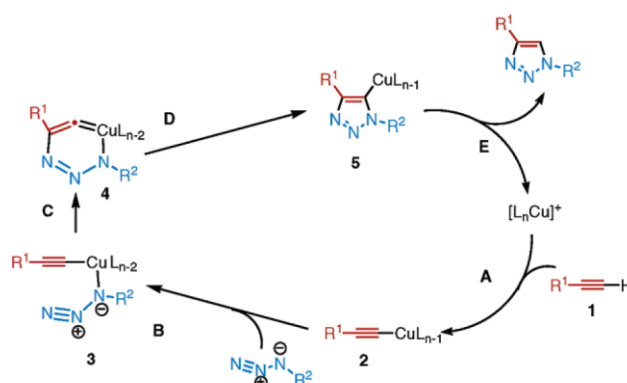


Figure 64 – Mécanisme proposé par Sharpless *et al.* en 2002 pour expliquer la CuAAC [5], [6]

Cette proposition de mécanisme a été longuement débattue et revue plusieurs fois depuis sa version initiale, notamment en tenant compte de davantage d'éléments. En effet, Rodionov *et al.* ont proposé en 2005 la participation d'un deuxième atome de cuivre [7], mais c'est en 2006 que Meldal et Tornøe ont proposé un mécanisme plus complet et tenant compte de deux voies possibles (Figure 65) [8] : l'intervention d'un complexe de cuivre bi-nucléaire **A** ou tri-nucléaire **B**, après formation du complexe cuivre-alcyne. Selon eux, le composé **3B** serait le seul composé pouvant expliquer clairement la régio-sélectivité absolue de la réaction [8]. Cependant, les travaux plus récents de Worrell *et al.* [9] et Jin *et al.* [10] donnent plus de crédibilité à un mécanisme impliquant deux atomes de cuivre.

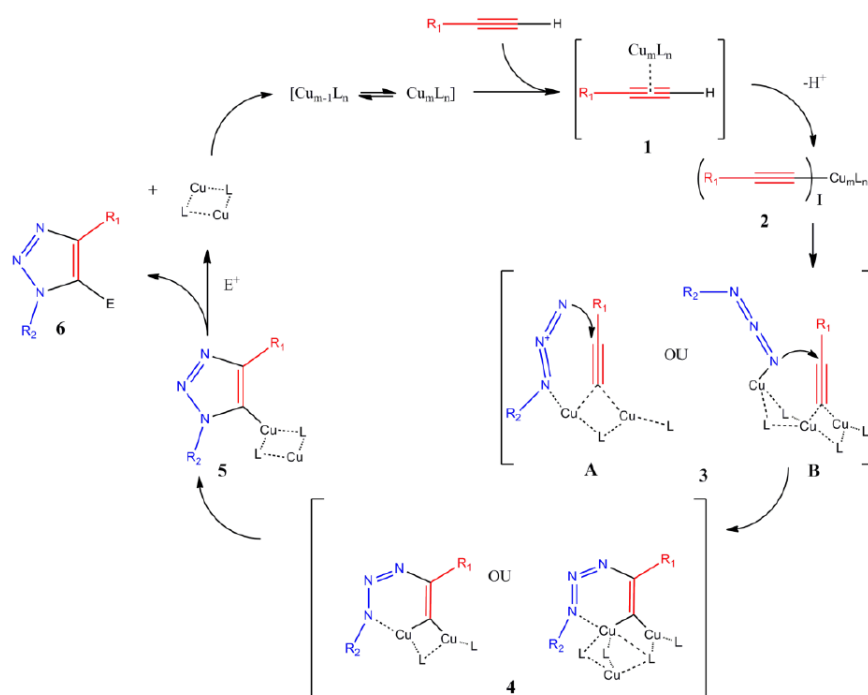


Figure 65 – Mécanisme proposé par Meldal *et al.* en 2006 pour la CuAAC



Les espèces réactives dans ces mécanismes ne sont pas clairement identifiées. Cela vient du fait que le cuivre peut former des complexes polynucléaires, de même que le ligand qui peut échanger facilement avec les centres de cuivre. **Le mélange réactionnel contient ainsi de nombreuses espèces organo-cuivres en équilibre, bien que la contribution majeure soit accordée au composé cuivre-alcyne**, dont sa nature lui permet de s'adapter à une large gamme de milieux réactionnels [11].

### III.1.3. Principaux systèmes catalytiques utilisés

Comme toute réaction *click*, la CuAAC est très adaptable et peut se produire dans des milieux réactionnels très divers, ce qui permet facilement de **modifier les solvants ou la source de cuivre utilisés**. Il est par exemple possible de travailler directement avec des sels de cuivre (I), mais cela nécessite d'utiliser une base – qui peut être mise en excès pour maximiser le rendement –, surtout en milieu organique, afin de faciliter la formation du complexe cuivre-alcyne [12]. Une source de cuivre (II) peut aussi être utilisée en présence d'un agent réducteur, très souvent l'ascorbate de sodium, introduit en excès [6].

**Selon la source de cuivre utilisée, il est envisageable de travailler uniquement en milieu aqueux [13], ou uniquement en milieu organique [14].** Il y a aussi moyen de recourir à des co-solvants (DMSO, THF, DMF, ...) afin de solubiliser des réactifs délicats ou sensibles [15].

Meldal et Tornøe ont proposé en 2008 une revue [8], qui répertorie les principaux systèmes catalytiques utilisés pour la CuAAC entre 2001 et 2008 (Tableau 9).

Tableau 9 – Récapitulatif des systèmes catalytiques les plus utilisés en CuAAC [8]

N.O. du cuivre	Sels ou métaux	Agent réducteur	Base/sel	Solvant
0	Copeaux, Tournures, Nanoclusters, Nanopoudres	Aucun	Chlorure de triéthylammonium	<i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O (1 :1), EtOH/H <sub>2</sub> O (1 :1), H <sub>2</sub> O
I	CuI, Cu(CH <sub>3</sub> CN) <sub>4</sub> PF <sub>6</sub> , CuBr, CuBr(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , CuIP(OEt) <sub>3</sub>	Aucun	Triéthylamine, 2,6-lutidine, DIPEA, PMDETA, HMTETA	THF, DMF, DMSO, Dichlorométhane, Toluène, Acétonitrile, H <sub>2</sub> O
II	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, Cu(OAc) <sub>2</sub>	Ascorbate de sodium, Cuivre O	Aucune	<i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O (1 :1), EtOH/H <sub>2</sub> O (1 :1), DMSO/H <sub>2</sub> O (1 :1), H <sub>2</sub> O



### III.1.4. Chimie *click* et applications en biologie

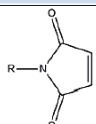
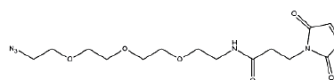
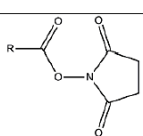
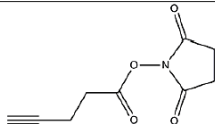
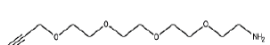
Pour des utilisations impliquant des modèles vivants, un des problèmes engendré par la CuAAC est la **cytotoxicité du cuivre** utilisé lors de la réaction. Ceci est tout particulièrement délicat avec l'utilisation de cellules ou de matériel biologique, et peut également dénaturer des protéines ou encore dégrader l'ADN [16]. Ceci peut être évité en privilégiant une réaction de substitution sans cuivre, comme la **cycloaddition azoture-alcyne promue par cycle tendu (SPAAC)** ou la **réaction de Staudinger** [17].

Une autre alternative est l'**utilisation de ligands stabilisant le cuivre, comme le TBTA, le THPTA [15], le BTES [18] ou le BTAA [19]**, qui protègent contre les perturbations induites par les ions cuivre, en plus d'accélérer la cinétique de la réaction *click*. Enfin, après réaction et en vue d'éliminer le cuivre, il est possible de **complexer le cuivre avec du diéthyl-dithiocarbamate de sodium** ( $\text{NaS}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ), le complexe fortement coloré ainsi formé permet de mettre en évidence si le cuivre est totalement éliminé ou non.

Une fois la cytotoxicité du cuivre maîtrisée et les conditions choisies, il est alors possible de **travailler avec des biomolécules par l'utilisation d'espaceurs** [20], molécules intermédiaires clickées, qui possèdent des fonctions azotures ou alcynes à une extrémité et à l'autre extrémité des fonctions susceptibles d'interagir avec les biomolécules.

Une biomolécule de type peptidique ou protéine est constituée d'une séquence linéaire spécifique d'acides aminés, reliés par des liaisons peptidiques  $-\text{[C=O-NH]}-$ . Par exemple, 149 acides aminés sont répertoriés pour le séquençage de protéines [21]. Certains possèdent des fonctions réactives, comme la cystéine qui a des fonctions thiols (SH) réagissant avec des fonctions maléimides, ou encore la lysine qui a des fonctions amines ( $\text{NH}_2$ ) réagissant avec des fonctions NHS. **La chimie *click* permet alors la fonctionnalisation spécifique préalable au greffage de biomolécules particulières** (Tableau 10).

Tableau 10 – Méthodes de fonctionnalisation d'une biomolécule selon les fonctions ciblées

Acides aminés	Fonction dans la protéine	Fonction réactive	Structure	Espaceur
Cystéine	Thiols (SH)	Maléimide		
Lysine	Amine ( $\text{NH}_2$ )	N-hydroxy-succinimide ester (NHS ester)		
-	Acide ( $\text{COOH}$ )	Amine	$\text{R-NH}_2$	





## III.2. Travaux antérieurs sur la fonctionnalisation de microplots de silice par chimie *click* catalysée au cuivre (I), suivie du greffage de biomolécules

### III.2.1. Evacuation du tensioactif F127

Afin d'améliorer la réactivité des fonctions azotures, il est souhaitable de libérer au maximum la porosité en éliminant le tensioactif F127 qui occupe les pores du matériau. Pour cela, deux voies ont été testées au cours des précédents travaux, à savoir *(i)* une dégradation par traitement thermique ou *(ii)* une élimination par lavage en soxhlet (Figure 66).

Concernant l'élimination par traitement thermique, des analyses ATD/ATG ont montré que le F127 est éliminé à partir de 200 °C sous atmosphère air [22]. Des tests de recuits réalisés à 400-450 °C ont permis d'éliminer le tensioactif des pores, mais avec une casse importante, très probablement liée à des contraintes thermomécaniques au sein du matériau.

Par ailleurs, l'élimination du tensioactif par lavage en soxhlet a été réalisée avec différents solvants [23] (éthanol pur ou bien éthanol avec 1, 5 ou 10% volumique d'acide chlorhydrique). L'efficacité du lavage a été quantifiée en infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), par diminution de l'aire des bandes entre 2850 et 2960  $\text{cm}^{-1}$ , qui sont caractéristiques des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  majoritairement présentes dans le tensioactif. Le solvant retenu est un mélange d'éthanol avec 5% volumique d'acide chlorhydrique (HCl 37% dans de l'eau), jugé suffisamment efficace pour éliminer le tensioactif, bien que de la casse persiste.

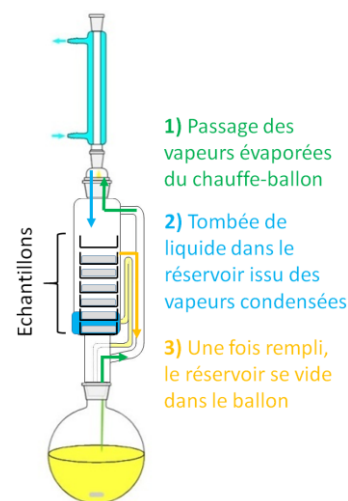


Figure 66 – Principe de fonctionnement d'un montage à reflux type soxhlet

### III.2.2. Premiers tests de réaction *click* réalisés avec des alcynes modèles

Les premiers tests de réaction *click* ont porté sur des alcynes modèles [23], à savoir l'alcool propargylique (MW = 56,1 g/mol) et le pent-4-ynoate de méthyle (MW = 112 g/mol) (Figure 67), ces deux composés présentant une structure très simple ainsi que des fonctions chimiques spécifiques facilement identifiables (alcool et ester).

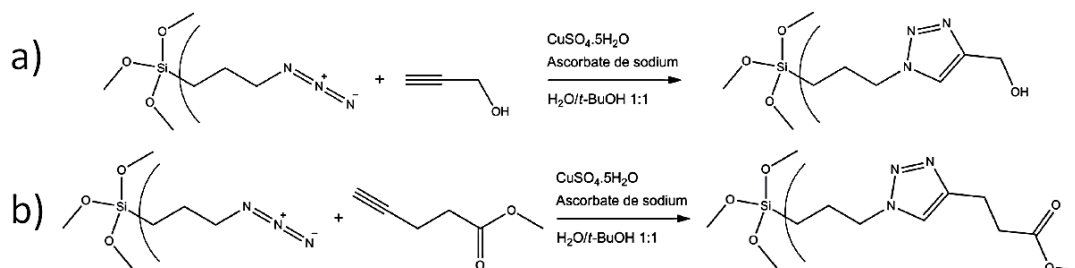


Figure 67 – Réaction *click* de greffage de l'alcool propargylique (a) ou du pent-4-ynoate de méthyle (b)



Le protocole de *click* fait intervenir des quantités en équivalents molaires, par rapport à une mole d'azotures : 100 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté dans de l'eau distillée, 200 équivalents d'ascorbate de sodium dans de l'eau distillée et 30 équivalents d'alcynes dans du tert-butanol. Ces solutions sont ajoutées et le tout est mis en contact avec les échantillons durant 24 h sur une plateforme d'agitation (70 rpm) à température ambiante.

Des caractérisations FTIR ont été réalisées sur des échantillons clickés et montrent l'atténuation nette de la bande azoture, donc un très bon taux de conversion de la réaction, qui semble très peu dépendant de la structuration de la porosité, comme le montrent les tests réalisés avec différents sols (Figure 68). Cependant, ces résultats n'ont pas été obtenus pour un unique type de sol, car le taux de TFTS a varié. Il faudrait alors le vérifier pour un unique sol qui permette d'obtenir les deux types de structuration. De plus, les résultats présentent de légères différences en fonction du type d'alcyne utilisé, ce qui peut être lié à la taille de la molécule et sa diffusion dans les pores du matériau (l'alcool propargylique est plus petit que l'ester pent-4-ynoate de méthyle ce qui expliquerait une « meilleure » diffusion dans les pores).

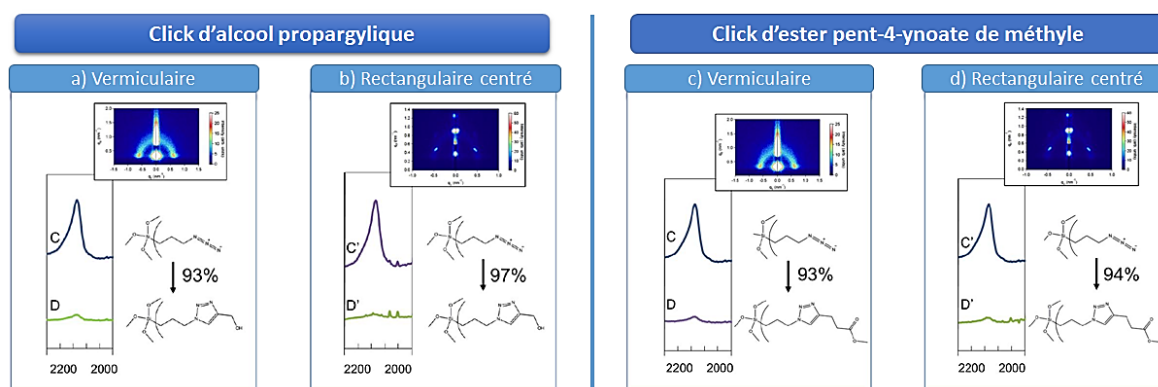


Figure 68 – Résultats des clics d'alcool propargylique et d'ester pent-4-ynoate de méthyle réalisées sur un sol  $TTf_{0,05}AZ_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$  donnant une structuration vermiculaire (a)(c) et sur un sol  $TTf_{0,025}AZ_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$  donnant une structuration rectangulaire centrée (b)(d) [23]

### III.2.3. Tests de *click* en vue d'une fabrication de biocapteur : *click* d'éthynyl ferrocène

Le ferrocène est utilisé pour son intérêt dans la réalisation de biocapteurs enzymatiques [24], ADN [25] ou immunocapteurs [26], [27], et a déjà été intégré dans des biocapteurs réalisés par sol-gel [28] ou avec de la silice mésoporeuse [29]. Le principe de détection repose sur un changement de potentiel électrochimique par interaction d'oxydo-réduction entre un analyte à détecter et un enzyme. Les travaux précédents [23] ont porté sur des tests de *click* de l'éthynyl ferrocène sur un réseau de microplots azotures (Figure 69).

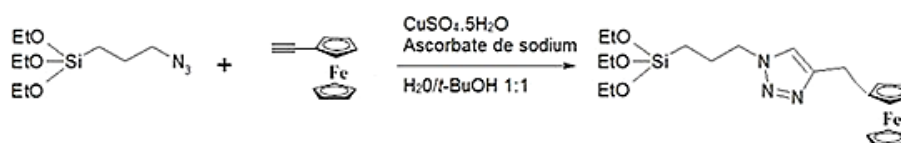


Figure 69 - Réaction *click* entre l'AzPTES et l'éthynyl ferrocène (MW = 210,05 g/mol)



Le protocole consiste à mélanger 100 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté et 200 équivalents d'ascorbate de sodium dans de l'eau distillée, avec 30 équivalents d'éthynil ferrocène dans du tert-butanol. La réaction *click* dure 24 h sous agitation (70 rpm) à l'ambiante.

Des caractérisations par spectroscopie Raman (Figure 70), réalisées sur un sol avec 10% d'AzPTES et 5% de TFTS, ont permis de valider la réaction *click* de l'éthynil-ferrocène, grâce à la bande présente à 1600  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des cycles cyclopentadiényles du ferrocène [30]. **La réaction *click* de l'éthynil-ferrocène selon les conditions décrites a donc été validée.** Ce résultat a permis d'étendre l'étude à d'autres types de capteurs biochimiques.

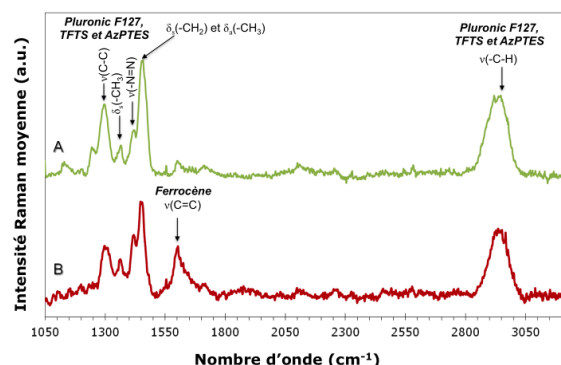


Figure 70 – Spectres Raman d'un microplot de 5 couches (TTf<sub>0,05</sub>AZ<sub>10</sub>F<sub>0,006</sub>E<sub>5</sub>Et<sub>20</sub>) : après libération de la porosité (A) et après réaction *click* avec l'éthynyl-ferrocène (B) [30]

#### III.2.4. Tests de *click* pour du diagnostic de cancers : *click* du pentynoate de NHS

Les études antérieures [23] ont permis d'entreprendre la réalisation de capteurs biologiques pour du diagnostic de cancers, en fonctionnalisant les échantillons par des protéines, qui possèdent un grand nombre de fonctions amines (-NH<sub>2</sub>). Pour cela, il est nécessaire de fonctionnaliser le matériau avec des fonctions NHS grâce à une molécule espaceur, le pentynoate de NHS (MW = 195 g/mol) (Figure 71).

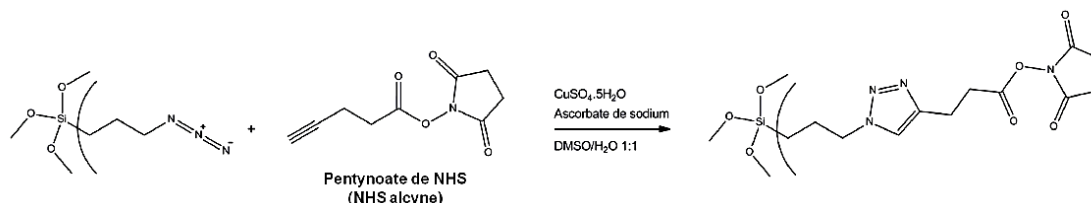


Figure 71 – Réaction *click* permettant le greffage du pentynoate de NHS

Le protocole consiste à ajouter 100 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté et 200 équivalents d'ascorbate de sodium dans de l'eau distillée, avec 30 équivalents de pentynoate de NHS dans du DMSO, le tout sous agitation (70 rpm) à température ambiante durant 24 à 48 h.

**Le succès de cette réaction n'a cependant pas été vérifié par spectroscopie** et il n'y a pas eu de quantification du taux de conversion de la réaction. Cela est d'autant plus important à vérifier que le solvant a été modifié (solubilisation de l'alcyne dans du DMSO au lieu du tert-butanol comme précédemment).



### III.2.5. Greffage de biomolécules pour la détection de marqueurs cancéreux

Les échantillons clickés par le pentynoate de NHS ont été greffés par des protéines G et des anticorps anti-TrkB, ciblant le récepteur TrkB surexprimé sur les cellules cancéreuses, selon le protocole décrit en Annexe 9. L'accroche des protéines et des anticorps a été validée par AFM grâce aux valeurs de hauteurs, bien que **les biomolécules semblent faire des agrégats en surface des microplots** (Figure 72). Cependant, **la réaction de greffage n'a pas été validée chimiquement** (ce qui est possible par spectroscopie par exemple).

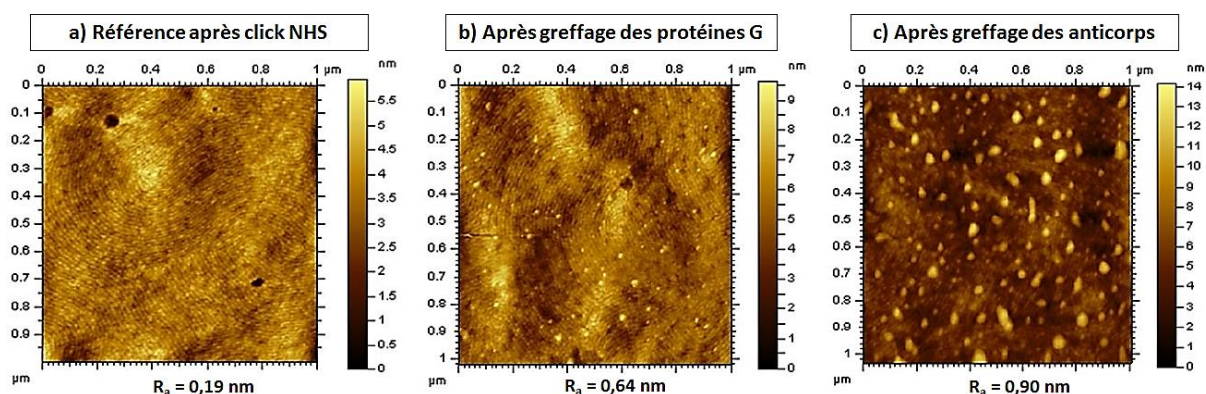


Figure 72 – Images AFM de la surface de microplots, après click du pentynoate de NHS (a), après greffage des protéines G (b) et après greffage de l'anticorps anti-TrkB (c) [23]

La microscopie confocale (cf. Annexe 10) a aussi montré l'accroche des protéines et des anticorps, lorsqu'ils sont marqués en fluorescence par des fluorochromes (Figure 73-a). Des tests de détection ont aussi été réalisés en mettant en présence une protéine BSA non-spécifique et l'antigène TrkB. **La détection est validée de façon spécifique en présence de l'antigène TrkB, occasionnant un transfert d'énergie de FRET** (Figure 73-c).

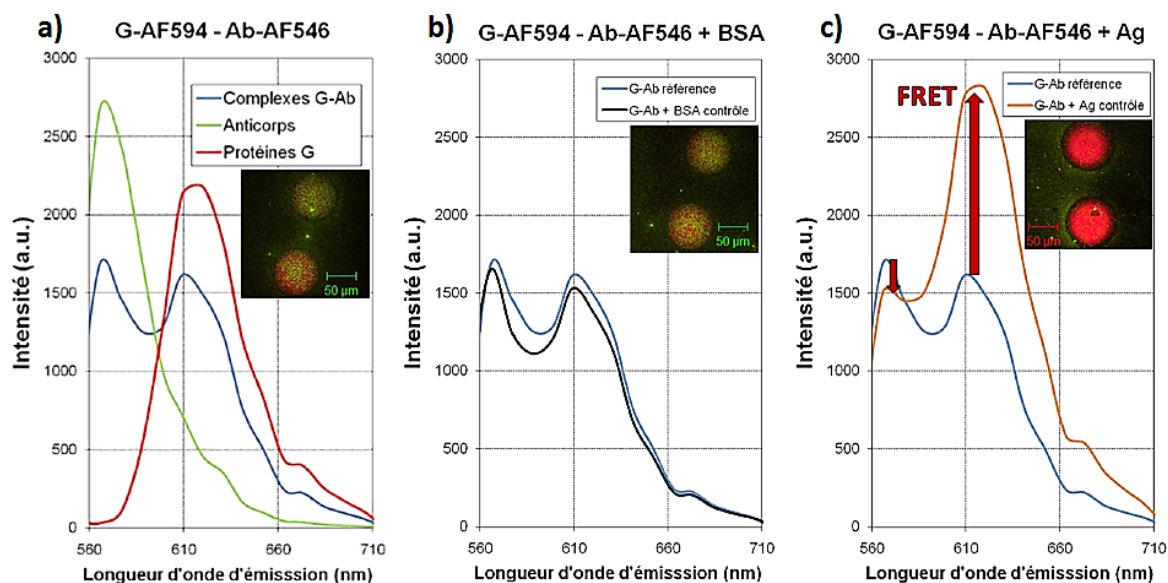


Figure 73 – Images et spectres d'émission moyennés sur un microplot, obtenus en microscopie confocale pour des échantillons fonctionnalisés par la protéine G marquée avec l'Alexa Fluor 594 et des anticorps marqués avec l'Alexa Fluor 546 : pour le signal de référence (a), en présence d'une protéine BSA non-spécifique (b) et en présence du marqueur TrkB (c) [23]



### III.3. Objectifs de l'étude, moyens mis en œuvre et conditions expérimentales

#### III.3.1. Objectifs de l'étude et démarche adoptée

Au vu de l'application visée (Figure 13), il faut chercher à **maximiser le taux de greffage des biomolécules à la surface des microplots**. Par conséquent, il est impératif d'avoir un **maximum de fonctions NHS à la surface des pores** et de garantir leur accessibilité pour le greffage des biomolécules.

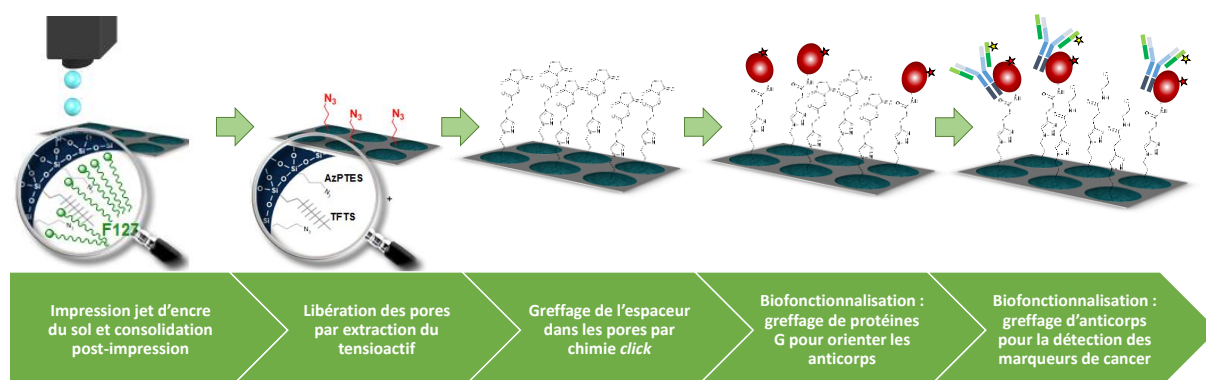


Figure 74 – Fonctionnalisation des sondes dans le cas du diagnostic

La partie III.4 de ce chapitre vise à optimiser la réaction *click* du pentynoate de NHS avec les fonctions azotures, ce qui impose de **fiabiliser l'étape de lavage de la porosité**, pour garantir une bonne évacuation du tensioactif et l'accessibilité des fonctions azotures, ainsi que de **fiabiliser la réaction *click* du pentynoate de NHS** pour des questions de reproductibilité, tout en **améliorant le rendement de la réaction**.

Pour optimiser le lavage de la porosité, plusieurs voies ont été étudiées, dont le **mode de lavage** (bain marie, ultrasons, soxhlet) ou encore le **choix du type de solvant** pour maximiser l'évacuation du tensioactif, tout en minimisant la casse des microplots durant cette étape. Une fois le tensioactif F127 éliminé de la porosité, les fonctions azotures, apportées par l'AzPTES, sont alors accessibles pour la fonctionnalisation par chimie *click*.

Afin d'optimiser la réaction *click* du pentynoate de NHS, différentes voies ont été testées, parmi lesquelles : le choix du **système catalytique**, de la **source de cuivre utilisée**, l'utilisation éventuelle de **ligands**, la **variation des quantités utilisées**, ainsi que **l'amélioration de la cinétique par des facteurs comme le temps, la température** ou les **conditions d'homogénéisation**. L'influence de différentes conditions du matériau (nombre de couches, structuration de la porosité, etc.) a aussi été étudiée.

Une fois la réaction *click* réalisée, les échantillons doivent subir un **lavage post-réaction**, car ils ont résidé dans une solution contenant diverses espèces organiques de cuivre (toxique vis-à-vis de cellules biologiques), de réducteur, d'alcyne. Pour cela, plusieurs pistes



ont été testées : **l'utilisation ou non de diéthylthiocarbamate de sodium** pour complexer et éliminer le cuivre, de **différents solvants** pour solubiliser le diéthylthiocarbamate de sodium, et de **différents protocoles de lavages post-réaction** qui seront détaillés ultérieurement. Les échantillons clickés avec le pentynoate de NHS sont par la suite destinés à être fonctionnalisés par des protéines et des anticorps marqués en fluorescence (Figure 13).

**La partie III.5 de ce chapitre vise à optimiser les conditions de greffage des protéines et des anticorps en surface des échantillons, afin de maximiser la sensibilité de détection du système.** Pour cela, certains aspects ont retenu une attention particulière, comme la **validation des protocoles de marquage des biomolécules par les fluorochromes**, l'étude de la **variation de concentration des biomolécules lors du greffage** ou **le temps d'incubation** pour espérer diminuer le temps de traitement en vue de l'industrialisation des protocoles de fonctionnalisation. D'autres aspects au niveau du matériau ont aussi été étudiés, dont notamment **l'influence de la structuration de la porosité ou du taux d'azotures sur le greffage des protéines et des anticorps**. Différentes conditions matérielles, déterminées au cours du chapitre II, ont ainsi été testées afin de dégager des conditions optimales pour la préparation des échantillons.

Les échantillons biofonctionnalisés doivent assurer par la suite une **détection accrue des marqueurs cancéreux**, c'est-à-dire une très grande **sensibilité de détection du dispositif envisagé**. Il faut également pouvoir **quantifier cette sensibilité** par une méthode rigoureuse, en tenant compte d'éventuelles normalisations, en vue de pouvoir comparer les résultats obtenus pour différentes configurations testées par rapport au matériau (comme la structuration de la porosité, le nombre de couches, la densité de microplots, etc.). Aussi, **des tests de détection seront réalisés pour estimer cette sensibilité**, sur modèle *in vitro* grâce à l'utilisation d'antigènes recombinants, mais aussi *in situ* sur différents modèles vivants.

Enfin, **la partie III.6 de ce chapitre vise à tester le dispositif et les sondes préparées dans des conditions les plus proches de celles de l'application finale**. Pour cela, le savoir-faire est transféré sur fibres optiques, au lieu des lamelles de verre ou des wafers de silicium. Il faut alors vérifier qu'il est possible de transposer les résultats obtenus sur les autres substrats, comme par exemple ceux démontrés pour la structuration de la porosité ou l'efficacité des étapes de greffage. **Cette partie vise notamment à montrer la preuve de concept pour ce mode de fonctionnalisation sur fibres optiques**, par rapport à la détection de cellules cancéreuses qui a été démontrée jusqu'à présent sur lamelles de verre uniquement.



### III.3.2. Conditions expérimentales pour la préparation des échantillons

Les échantillons décrits dans cette partie ont été réalisés par impression de microplots fonctionnalisés azotures, comme étudié dans le chapitre II. Ces échantillons vont alors subir les étapes de lavage de la porosité, de *click* et de greffage des protéines et anticorps.

#### III.3.2.1. Lavage de la porosité

Le lavage de la porosité peut se faire en bain marie, en soxhlet ou en cuve à ultrasons :

→ **En soxhlet** (Figure 75-a), les échantillons sont empilés dans des paniers individuels. Le thermostat du chauffe-ballon est gardé constant (thermostat 4-5) pour assurer le même nombre de cycles de reflux par échantillon, soit environ 2000 cycles pour 24 h.

→ **En bain marie** (Figure 75-b), les échantillons sont déposés individuellement dans des piluliers qui contiennent un volume d'une dizaine de millilitres du solvant de lavage. Chaque pilulier est fermé hermétiquement pour éviter l'évaporation du solvant et tous les piluliers sont mis en bain-marie à 50 °C sur plaque chauffante pendant 24 h.

→ **Le lavage en cuve à ultrasons** (Figure 75-c) où les échantillons sont dans des piluliers individuels avec un volume d'une dizaine de millilitres de solvant, et fermés hermétiquement, puis placés dans la cuve à ultrasons durant 24 h.

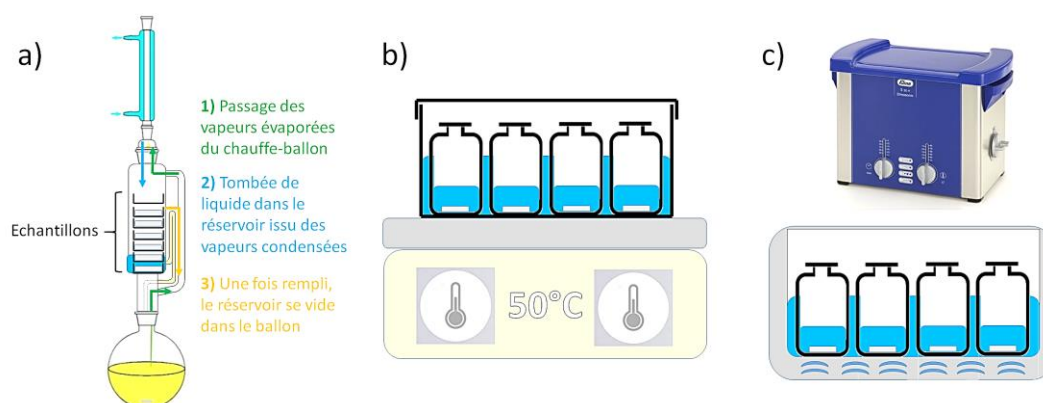


Figure 75 – Protocole de lavage en soxhlet (a), en bain marie (b) ou en cuve à ultrasons (c)

#### III.3.2.2. Protocoles de la réaction *click* du pentynoate de NHS

Afin de réaliser la réaction *click* du pentynoate de NHS, dont la synthèse est explicitée en Annexe 11, **plusieurs protocoles ont été testés** (Figure 76) :

- **Protocole 1** : tous les constituants sont solubilisés en une fois et la réaction se fait à température ambiante sous agitation. Ce protocole a été envisagé pour simplifier la préparation de la solution, en vue de l'industrialisation du procédé.
- **Protocole 2** : solubilisation préalable du pentynoate de NHS dans le DMSO et réaction en chauffant à 50 °C pour favoriser la thermodynamique du système. Ce protocole a



été envisagé pour avoir des conditions intermédiaires entre les protocoles 1 et 3 et ces conditions sont proches de celles des premiers tests de *click* du pentynoate de NHS [23].

- **Protocole 3** : solubilisation individuelle des réactifs, pour se rapprocher des conditions de préparation des études antérieures, mais en chauffant la solution à 50 °C. Ce protocole est proche des conditions de *click* de l'alcool propargylique et du pent-4-ynoate de méthyle (Figure 67, §III.2.2).

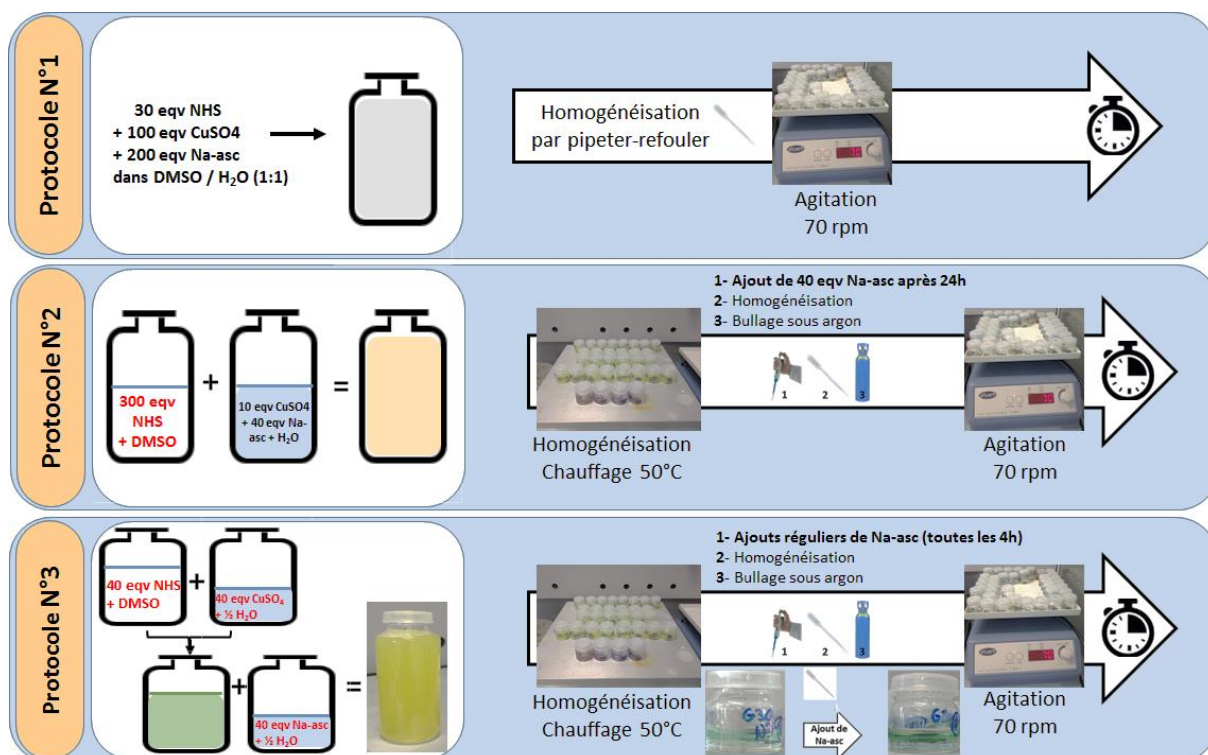


Figure 76 – Protocoles envisagés : **N°1** ajout de tous les réactifs en une fois, **N°2** dissolution préalable du pentynoate NHS dans du DMSO et chauffage, **N°3** dissolution individuelle pour chaque réactif et chauffage

Concernant l'optimisation des étapes de lavage post-réaction *click*, les conditions utilisées lors de ces tests seront explicitées ultérieurement.

### III.3.2.3. Protocoles de greffage des protéines et des anticorps sur les microplots

Les protocoles de marquages des protéines et des anticorps par les fluorochromes sont détaillés en Annexes 12 et 13. Les biomolécules ainsi marquées sont ensuite mises au contact des microplots selon le protocole explicité en Annexe 9.

Ces étapes de biofonctionnalisation sont réalisées par les biologistes du laboratoire Captur de la Faculté de Pharmacie de Limoges.





### III.3.3. Moyens mis en œuvre et techniques

En vue de pouvoir préalablement vérifier la qualité du pentynoate de NHS à cliquer, la **résonance magnétique nucléaire (RMN) solide du proton et du carbone** a été utilisée pour caractériser la poudre synthétisée par l'Institut Néel. Cette analyse permet de vérifier la pureté du produit, notamment son évolution lors du vieillissement. La **spectroscopie infrarouge en mode réflectance totale atténuée (ATR)** a aussi été utilisée pour vérifier la présence des bandes de vibrations caractéristiques des liaisons chimiques de la molécule et ainsi avoir un spectre infrarouge de référence pour le pentynoate de NHS.

Afin de caractériser l'efficacité des étapes de lavage de la porosité, par rapport à l'élimination du tensioactif F127, ou encore pour caractériser le rendement de la réaction *click*, plusieurs techniques ont été utilisées, dont la **microscopie optique**, utilisée pour observer l'effet des solvants et estimer la casse. La **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)** a également été utilisée sur substrats wafers de silicium pour caractériser l'élimination du tensioactif ainsi que la conversion des fonctions azotures lors de la réaction *click*. Cette méthode de spectroscopie infrarouge a aussi permis d'étudier le greffage des protéines sur les microplots, en complément de la **spectroscopie Raman** (cf. Annexe 6.1.3), réalisée sur lamelles de verre et sur fibres optiques.

Concernant l'étude de l'efficacité des étapes de lavages post-réaction, celle-ci a été réalisée grâce à la **microscopie électronique à balayage (MEB) à dispersion d'énergie (EDS)**, et qui a permis d'estimer la quantité de cuivre restante sur les échantillons et de déduire les meilleures conditions de lavage après réaction *click*.

La signature des protéines a pu être déterminée à l'état solide au moyen de la **spectroscopie infrarouge en mode réflectance totale atténuée (ATR)** ainsi que par **spectroscopie Raman**. La signature des anticorps n'a pas pu être déterminée, car ils sont livrés sous forme liquide diluée et qu'il n'a pas été possible de les caractériser. Le **taux de marquage, ou DOL (Degree of Labelling)**, est déterminé au moyen de la **spectroscopie UV d'absorption**, où l'absorption des protéines, anticorps et fluorochromes permet de déduire les concentrations en espèces et d'aboutir à une valeur moyenne de fluorochromes par biomolécules (DOL).

Le contrôle du greffage des protéines et des anticorps a pu se faire grâce à l'étude de la topographie par **microscopie à force atomique (AFM)**, en complément de la **spectroscopie infrarouge en transmission ou de la spectroscopie Raman**. D'autre part, lorsque les biomolécules sont marquées en fluorescence, la **microscopie confocale** (cf. Annexe 10) peut être réalisée pour valider leur présence et l'homogénéité du greffage.



### III.4. Optimisation de l'étape de réaction *click* du pentynoate de NHS

Afin de maximiser l'efficacité de la réaction *click*, il semble important de garantir que les fonctions azotures sont bien accessibles en éliminant le tensioactif F127 des pores du matériau, par des méthodes de lavage.

#### III.4.1. Etude du lavage préliminaire de la porosité

##### III.4.1.1. Différents modes de lavages : soxhlet, bain marie, ultrasons

Les études antérieures avaient sélectionné le soxhlet comme mode de lavage de la porosité. Le montage est constitué d'un réservoir où sont disposés les échantillons, et qui se remplit au fur et à mesure de l'évaporation du solvant utilisé, placé dans le ballon chauffé (Figure 66). Il apparaît alors que tous les échantillons ne sont pas immergés autant les uns que les autres, et le temps d'immersion dépend de la position de l'échantillon dans le soxhlet. Une première observation a pu montrer que **les échantillons placés en position basse** (Figure 77-a) **présentaient davantage de casse au niveau des plots, par rapport aux échantillons placés en position haute** (Figure 77-b). De plus, le mode de lavage par utilisation du soxhlet était difficilement transposable au lavage de sondes de type fibres optiques, pour lesquelles il aurait fallu insérer les fibres par le haut du réfrigérant. Pour ces raisons, **le mode de lavage par soxhlet a été abandonné, au profit d'un lavage en bain marie**. Celui-ci présente l'avantage d'être davantage reproductible au niveau des échantillons, qui voient le même temps d'immersion. Cependant, **de la casse a aussi été observée sur des échantillons immergés en bain marie dans le solvant EtOH avec 5% volumique de HCl 37% dans l'eau** (Figure 77-c), et cette casse des plots a été attribuée à la présence de l'acide dans le solvant. En effet, le recours uniquement à de l'éthanol pur ne donnait pas autant de casse, mais les résultats en infrarouge montraient que le tensioactif ne semblait pas évacué en totalité. Par la suite, le recours aux ultrasons a été tenté pour mieux évacuer le tensioactif de la porosité, mais a été abandonné du fait d'**une casse accrue des plots par l'utilisation d'ultrasons** (Figure 77-d).

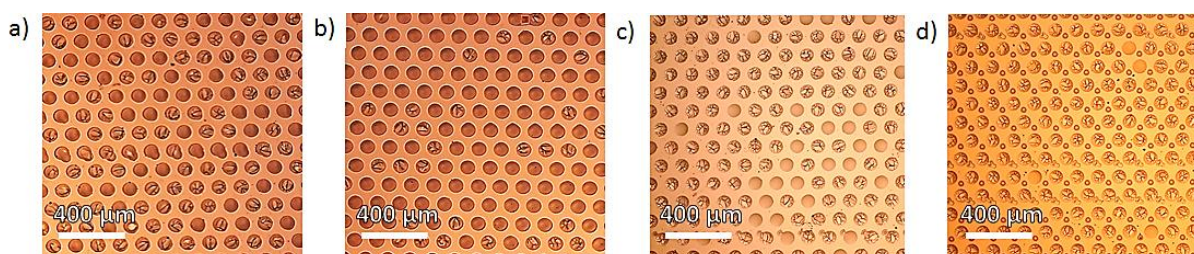


Figure 77 – Lavage de la porosité avec 5%vol HCl dans EtOH pour un lavage soxhlet en position basse (a), un lavage soxhlet en position haute (b), un lavage en bain marie (c) ou un lavage EtOH pur dans les ultrasons (d)

**Le lavage en bain marie a alors été retenu comme mode d'évacuation du tensioactif.** Par la suite, différents solvants ont été testés en vue d'optimiser son élimination.



### III.4.1.2. Utilisation de différents solvants pour le lavage de la porosité

Différents solvants ont été utilisés pour tester l'élimination du tensioactif en bain marie (50 °C), estimée (de façon semi-quantitative) grâce à l'analyse infrarouge en transmission, par intégration de la bande CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> située entre 3030 et 2800 cm<sup>-1</sup> (Tableau 11).

En premier lieu, le méthanol donnait de bons résultats, avec une très faible casse des plots, mais ce solvant affectait le substrat, en modifiant sa chimie de surface (moins de groupements hydroxyles observés sur les spectres infrarouge), ce qui ne permettait pas une quantification précise. La triéthylamine (Et<sub>3</sub>N) donnait une bonne efficacité, mais avec une casse également importante. Le THF donne un rendement bon mais laisse des dépôts de sels sur les échantillons. Le DMSO donne une faible casse, mais n'a pas conduit à un rendement très élevé. L'éthanol a quant à lui donné des résultats très corrects, à la fois pour 48 h et 24 h.

Tableau 11 – Synthèse des résultats des lavages en bain marie avec différents solvants

Temps d'immersion	Solvant utilisé	Taux de casse (%)	Bande FTIR intégrée [3030 - 2800] cm <sup>-1</sup> (U.A.)	Efficacité du lavage (%)
-	Echantillon Référence	0	1.1051	-
48 h	Dichlorométhane (20 °C)	6	0.8758	21
	DMSO	6	0.5982	46
	Toluène	8	0.5632	49
	Ethanol	12	0.5116	54
	DMF	12	0.4765	57
	Et3N	18	0.4569	59
	THF	15	0.3485	68
	Méthanol	2	1.1335	-
24 h	DMSO	4	0.6508	41
	THF	12	0.5763	48
	Ethanol	7	0.5617	49

Aussi, comme le but est de diminuer le temps de traitement, les meilleurs résultats ont été obtenus à 24 h pour l'éthanol, avec un rendement correct (49%) et une casse minimisée. De plus, ce solvant est facilement disponible, peu toxique et peu cher, ce qui représente un autre avantage en vue d'une future industrialisation du procédé global. **L'éthanol a donc été retenu comme solvant pour le lavage de la porosité durant 24 h en bain marie (50 °C).**



### III.4.2. Synthèse et conditions d'utilisation du pentynoate de NHS

#### III.4.2.1. Synthèse et contrôles du produit

Le pentynoate de NHS (Figure 78) est fourni par Xavier Cattoën de l'Institut Néel de Grenoble, et est synthétisé selon le protocole décrit en Annexe 11.

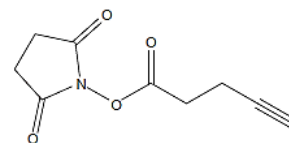


Figure 78 – Pentynoate de NHS

La pureté du produit est contrôlée à réception du produit par RMN en solution du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  avant envoi (Figure 79-a et b), et par infrarouge (mode ATR, Figure 79-c).

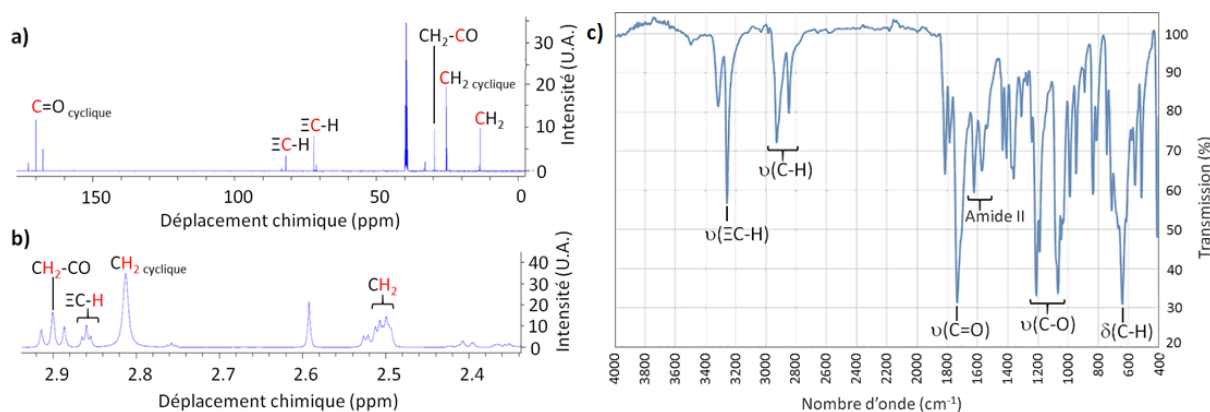


Figure 79 – Contrôle du pentynoate de NHS par RMN liquide du  $^{13}\text{C}$  (a) et RMN solide du  $^1\text{H}$  (b) et contrôle en infrarouge - mode ATR (c)

Les analyses RMN de contrôle (Figure 79-a et b) ont montré un produit à la chimie conforme au pentynoate de NHS, avec une fonction alcyne représentée par un triplet à 2,86 ppm et deux carbones à 72,0 et 81,9 ppm. La liaison  $\text{CH}_2$  proche de cette fonction alcyne est visible avec des protons à 2,51 ppm et un carbone à 13,4 ppm. La fonction  $\text{CH}_2\text{-CO}$  a un déplacement chimique en protons à 2,90 ppm et un déplacement chimique de 29,6 ppm en carbone. Les deux fonctions  $\text{CH}_2$  du cycle NHS sont présentes avec des protons à 2,81 ppm et un carbone présent à 25,4 ppm. Ces déplacements chimiques sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature [31], bien que légèrement décalés. D'autres produits sont également présents, bien que très minoritaires, **le produit est donc globalement pur**.

L'analyse de contrôle par infrarouge (mode ATR) montre aussi une chimie cohérente avec celle de la molécule synthétisée (Figure 79-c). En effet, la fonction alcyne est visible avec la liaison  $\text{CH}$  terminale autour de  $3280\text{ cm}^{-1}$ , bien que la triple liaison  $\text{C}\equiv\text{C}$  attendue autour de  $2140\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$  soit absente. Ceci est dû à l'absorption du diamant de l'ATR dans cette zone, ainsi qu'au coefficient d'absorption faible de la liaison  $\text{C}\equiv\text{C}$  en infrarouge. La fonction NHS est bien présente, avec deux bandes moyennes visibles autour de  $1810$  et  $1780\text{ cm}^{-1}$ . La fonction ester est visible avec les bandes fortes autour de  $1730$ ,  $1200$  et  $1070\text{ cm}^{-1}$ . **Les spectres sont conformes à la structure de la molécule.**



### III.4.2.2. Effet du vieillissement du NHS et des conditions de stockage

La qualité du pentynoate de NHS peut être appréciée indirectement, par le greffage de protéines marquées en fluorescence, et observées en microscopie confocale. Cette méthode a été utilisée pour mettre en évidence des différences qui apparaissent au niveau des échantillons. En premier lieu, l'étude a consisté à clicker des échantillons avec du pentynoate de NHS très pur et fraîchement synthétisé, puis à les greffer 3 jours après *click* (Figure 80-a) ou un mois après *click* (Figure 80-b).

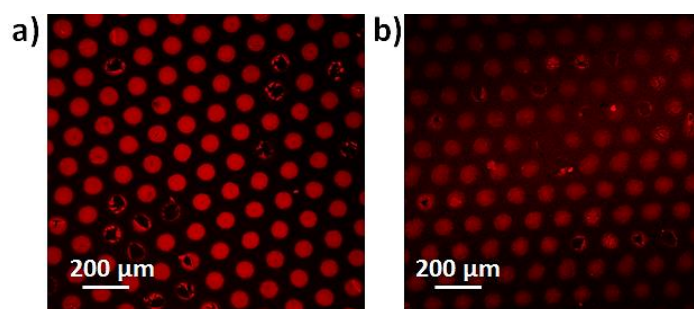


Figure 80 – Echantillon greffé 3 jours après *click* (a) et un mois après *click* (b)

Un échantillon greffé 3 jours après *click* présente un greffage de protéines plus homogène et plus net qu'un échantillon greffé un mois après *click*. Ceci peut s'expliquer très simplement par la sensibilité des fonctions NHS du produit clické, qui sont fortement réactives avec des fonctions amines ou alcools, qui pourraient circuler dans l'atmosphère. **Il est donc primordial d'assurer un temps le plus court possible entre la *click* du pentynoate de NHS et le greffage des protéines.**

D'autre part, le pentynoate de NHS était systématiquement contrôlé visuellement avant *click*, et présentait un phénomène de vieillissement au bout de quelques mois (environ 6 mois), visible par un aspect déliquescents et une coloration jaune/brun, tandis que le produit pur est sous forme de cristaux très blancs (Figure 81-a). Un échantillon clické avec du pentynoate de NHS vieilli et greffé avec des protéines présente une répartition qui n'est pas nette et d'intensité faible (Figure 81-b), probablement dû à une dégradation des fonctions NHS, ce qui expliquerait la perte d'intensité observée en microscopie confocale et une répartition non spécifique des protéines. **Le pentynoate de NHS était ainsi gardé en dessiccateur et n'était clické que pur sur les échantillons, afin de rester dans des conditions reproductibles.**

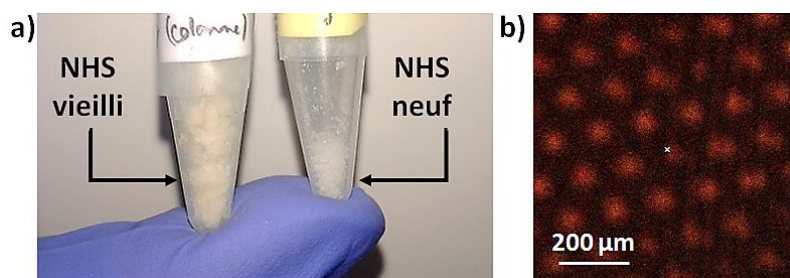


Figure 81 – Vieillesse du pentynoate de NHS observé (a) et résultat obtenu en microscopie confocale d'un échantillon greffé avec un pentynoate de NHS vieilli (b)



### III.4.3. Optimisation des conditions de la réaction *click* du pentynoate de NHS

#### III.4.3.1. Tests de différents systèmes catalytiques

Un test préliminaire dans l'étude du lavage de la porosité, en utilisant l'eau comme solvant de lavage, avait montré une dégradation très accentuée des microplots sous l'effet de l'eau. Or, les conditions établies lors des études antérieures stipulent que le milieu à utiliser est un milieu DMSO/Eau et avec des proportions en réactifs largement saturantes (> 100 équivalents molaires), sans que d'autres systèmes n'aient été testés. La dégradation observée peut également provenir de forces capillaires très fortes lors du séchage du matériau.

L'étude a ainsi été menée, en recherchant des systèmes catalytiques, parmi les nombreux déjà proposés dans la littérature (Tableau 9, page 110), pouvant maximiser le rendement de la réaction *click* du pentynoate de NHS, par exemple avec des solvants capables de mieux solubiliser le pentynoate de NHS au lieu du DMSO (éthanol, tert-butanol, etc.) et si possible en évitant l'utilisation d'eau, afin de minimiser la casse des microplots.

Les conditions utilisées (Tableau 12) sont de 40 éq. mol. de pentynoate de NHS, 5 éq. mol. pour la source de cuivre, et le cas échéant, 20 éq. mol. pour le réducteur Na-ascorbate. Les échantillons, des microplots imprimés sur wafers de silicium, sont clickés durant 48 h puis caractérisés en infrarouge en transmission. **Le rendement de la réaction *click* est estimé par la diminution de l'aire de la bande azoture sur l'intervalle [2250 ; 2000] cm<sup>-1</sup>, rapportée à l'aire de la bande avant *click*.**

Tableau 12 – Systèmes catalytiques testés pour optimiser la réaction *click* du pentynoate de NHS

Solvant (vol : vol)	Source de cuivre	Réducteur	Conversion (%)
DMSO/Eau (1:1)	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	Na-ascorbate	25
EtOH/Eau (1:1)			10
t-BuOH/Eau (1:1)			2
DMSO pur			1
THF/Et <sub>3</sub> N (1:1)	CuI	-	8
THF/Et <sub>3</sub> N (1:1)	CuBr(PPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		5
Toluène			10

Ces essais se sont avérés très décevants, de par les taux de conversion obtenus, mais également par l'impossibilité de travailler en milieu non aqueux afin de minimiser la casse, très présente sur les échantillons. Néanmoins **ces tests ont permis de retenir définitivement le milieu DMSO/Eau qui présente la meilleure conversion.**



### III.4.3.2. Ajustement du protocole

Les difficultés rencontrées précédemment (§III.4.3.1) ont été attribuées à une réduction insuffisante du cuivre (II) en cuivre (I), dans le cas de l'utilisation du sulfate de cuivre en milieu DMSO/Eau. Cependant, ceci peut être lié à une faible diffusion des réactifs en solution. Un précipité était notamment observable en utilisant les conditions fixées antérieurement [23], ce qui pouvait être également à l'origine des problèmes de reproductibilité rencontrés. **L'étude a donc porté sur l'optimisation du protocole, en vue d'améliorer le rendement et la reproductibilité de cette étape de réaction *click* (pour un temps de réaction de 48 h).**

Les conditions utilisées dans les études antérieures [23] utilisaient 30 eqv. molaires de pentynoate de NHS, pour 100 eqv. molaires de sulfate de cuivre et 200 d'ascorbate de sodium (Protocole N°1, Figure 76). Un deuxième protocole a été mis au point, et a consisté à abaisser la teneur de la source de cuivre (à 10 équivalents) et de l'ascorbate de sodium (à 40 équivalents) pour limiter la formation du précipité observé, tout en solubilisant mieux ces espèces (Protocole N°2, Figure 76). Le chauffage de la solution (sur plaque chauffante réglée à 50 °C) a été rajouté tout au long de la réaction pour améliorer la cinétique. Le THPTA, connu pour améliorer la cinétique en créant un complexe avec le cuivre (I) [15], a aussi été testé. Enfin, un troisième protocole (Protocole N°3, Figure 76) a été testé, en diminuant les proportions introduites en pentynoate de NHS et ainsi économiser du produit, et de plus, chaque réactif a été solubilisé séparément pour plus de stabilité de la solution *click* préparée.

Tableau 13 – Synthèse des résultats visant à améliorer le protocole de la *click* (les quantités sont données en équivalents molaires par rapport à la quantité d'azotures)

Protocole	Quantités utilisées (équivalents mol. d'azotures)	Chauffage	Conditions supplémentaires	Conversion (%)
N°1	Pentynoate de NHS : 30 CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O : 100 Na-ascorbate : 200	Non	/	33
N°2 (sans THPTA)	Pentynoate de NHS : 300 CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O : 10 Na-ascorbate : 40	Oui	Ajout de Na-ascorbate (40 eqv. mol.) à 24 h	65
N°2 (avec THPTA)	Pentynoate de NHS : 300 CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O : 10 <b>THPTA : 10</b> Na-ascorbate : 40			41
N°3	Pentynoate de NHS : 40 CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O : 10 Na-ascorbate : 10	Oui	Ajouts réguliers de Na-ascorbate (20 eqv. mol.) <b>toutes les 4 h</b>	81



Le résultat montre bien que les conditions précédemment établies (protocole N°1) n'étaient pas optimisées, avec un rendement estimé à 33%, dans les conditions de *click* utilisées précédemment [23]. Par ailleurs, **l'utilisation du protocole N°2 et le fait de chauffer la solution a notamment permis de doubler le rendement de la réaction (65%)**, bien que les quantités en cuivre et Na-ascorbate soient réduites par rapport au protocole N°1. Ceci est néanmoins justifié par le fait que le cuivre est utilisé en tant que catalyseur et est souvent utilisé en très faible quantité (souvent moins de 5 équivalents molaires).

**Concernant le protocole N°3, qui utilise le THPTA comme ligand du cuivre, le rendement de réaction est moins bon par rapport à l'essai sans THPTA (protocole N°2), avec une conversion de 41% contre 65% en l'absence de THPTA.** Ceci peut être lié à la taille et l'encombrement du ligand formé entre le cuivre et le THPTA (Figure 82), de taille plus importante, ce qui expliquerait aussi une plus faible diffusion dans les pores du matériau et un rendement moins bon.

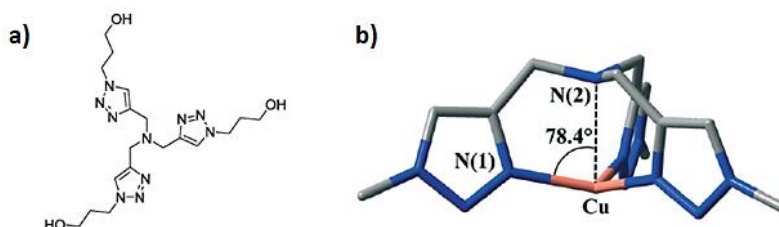


Figure 82 – Structure chimique du THPTA (a) et interaction avec le cuivre (structure simplifiée) (b) [32]

Enfin, le protocole N°3 consiste à solubiliser les réactifs séparément, à savoir que le sulfate de cuivre et l'ascorbate de sodium sont solubilisés dans deux solutions d'eau différentes, puis ajoutées une à une à la solution de pentynoate de NHS solubilisé dans le DMSO (en commençant par la solution cuivre/eau puis la solution Na-ascorbate/eau). En effet, ces réactifs étaient solubilisés dans la même solution pour le protocole N°2, ce qui occasionnait de très nombreux complexes de cuivre différents, comme en témoignait le rapide changement de couleurs de la solution, du vert au jaune puis à l'orange pour finir vers une couleur brun foncé. Aussi, pour le protocole N°3, la quantité initiale d'ascorbate de sodium introduit est moindre, mais des ajouts d'ascorbate de sodium sont faits plus régulièrement afin d'assurer la réduction du cuivre (II) et la présence de cuivre (I). **Dans ces conditions, le protocole N°3 a ainsi donné de meilleurs résultats, à savoir une conversion de 81%, contre 65% pour le protocole N°2.**

**Le protocole N°3, avec une solubilisation individuelle de chaque produit, a donc été retenu, ainsi que l'utilisation du chauffage pour maximiser le rendement de réaction.** La suite de l'étude va permettre de statuer sur les quantités à utiliser et les conditions d'ajouts du Na-ascorbate.





### III.4.3.3. Ajustement des quantités utilisées

En vue de pouvoir industrialiser le protocole défini, il est nécessaire de statuer sur les quantités à utiliser. En effet, le pentynoate de NHS doit être synthétisé car il n'est pas disponible dans le commerce, et ce produit ne doit pas être gâché dans la mesure du possible, bien que les réactifs utilisés pour la synthèse ne soient pas très coûteux.

Le protocole N°3 est utilisé pour cette démarche, mais les quantités varient en vue de trouver un rendement toujours plus important (Tableau 14). Pour cela, en partant de 40 eqv. mol. de pentynoate de NHS, pour 10 eqv. molaire de sulfate de cuivre et de Na-ascorbate (Essai N°1), la quantité de cuivre a été augmentée à 20 (Essai N°2) puis 40 (Essai N°3) en gardant la même quantité de Na-ascorbate que de cuivre. Par la suite, la quantité du pentynoate de NHS a été diminuée à 20 eqv. mol. (Essai N°4), ou bien augmentée à 80 eqv. mol. (Essai N°5), en gardant les mêmes proportions entre les constituants que l'essai N°1.

Tableau 14 – Synthèse des résultats obtenus dans l'ajustement des quantités  
(les quantités sont données en équivalents molaires par rapport à la quantité d'azotures)

Essai	Pentynoate de NHS	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	Na-ascorbate	Conversion (%)	Casse des plots (%)
N°1	40	10	10	81	48
N°2		20	20	89	49
N°3		40	40	90	47
N°4	20	5	5	55	25
N°5	80	20	20	89	47

**Les essais effectués montrent qu'il est préférable d'augmenter la quantité de cuivre**, que ce soit pour 20 ou 40 eqv. mol. qui donnent respectivement des conversions améliorées à 89% et 90%. Par ailleurs, l'augmentation de la quantité de pentynoate de NHS à 80 eqv. mol. n'améliore que peu cette conversion (89% au lieu de 81%). De plus, la diminution de cette quantité de pentynoate de NHS à 20 eqv. mol. fait diminuer le rendement de réaction (55% au lieu de 81%). **Il est donc préférable de travailler avec 40 eqv. mol. de pentynoate de NHS, tout en augmentant la quantité de cuivre, à 40 eqv. mol. par exemple, pour garantir une cinétique rapide, donc un très bon rendement (90%).** La casse des plots est cependant importante (environ 50% de plots cassés ou fissurés), ce qui s'explique par un temps d'immersion long de 48 h dans la solution. L'étude temporelle de la cinétique devrait permettre de diminuer le temps de réaction, ainsi que la casse observée.



### III.4.3.4. Ajustement du temps de réaction et tests croisés

Lors de l'étude, des essais préliminaires avaient permis de montrer que dans les conditions du protocole N°3, la réaction *click* s'effectuait très rapidement en début de réaction, avec une conversion de 78% au bout de 8 h (Figure 83), et qui permettait également de minimiser la casse, alors inférieure à 10%.

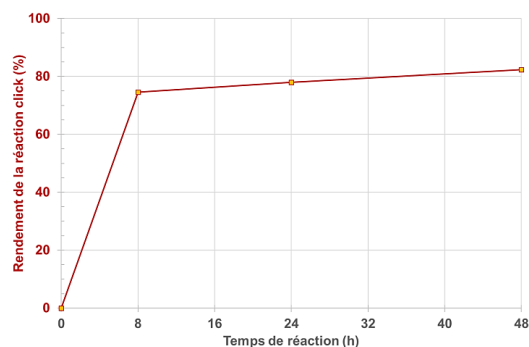


Figure 83 – Cinétique du protocole N°3

En vue de conclure définitivement sur d'autres conditions opératoires, ce suivi cinétique a été répété en s'intéressant tout particulièrement à d'autres paramètres et conditions opératoires (Tableau 15), et en se focalisant sur l'intervalle de temps entre 0 h et 8 h.

Tableau 15 – Synthèse des systèmes catalytiques testés

Système catalytique	Pentynoate de NHS		Sulfate de cuivre pentahydraté CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O		Ascorbate de sodium (Na-ascorbate)	
	Eq. Mol.	[C] (μmol/mL)	Eq. Mol.	[C] (μmol/mL)	Eq. Mol.	[C] (μmol/mL)
1-2 Standards	40	3.48	40	3.48	400	34.84
3 – [Na-asc] augmentée	40	3.48	40	3.48	800	69.69
4 – [CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O] diminuée	40	3.48	20	1.74	400	34.84
5 – Eq. mol. diminués	20	1.74	20	1.74	200	17.42

Le système 1 reproduit le protocole N°3 tel que défini, avec une homogénéisation régulière par pipeter-refouler et des ajouts de Na-ascorbate au cours de la réaction (toutes les 4 h environ). Le système 2 propose des proportions identiques, mais la totalité de la quantité de Na-ascorbate est ajoutée dès le début et il n'y a pas d'homogénéisation de la solution pendant la réaction, en vue de limiter la contribution d'un opérateur extérieur. Les systèmes 3 et 4 modifient les équivalents molaires, respectivement en augmentant la concentration en Na-ascorbate, ou en diminuant celle de sulfate de cuivre. Enfin, le système 5 consiste à diminuer l'ensemble des équivalents.

L'étude cinétique débute à un temps t = 0, ensuite un échantillon de chaque série est prélevé au bout de 30min, 1h30, 3h, 4h30 et 24 h puis rincé dans l'éthanol pour stopper la réaction. Les échantillons sont ensuite caractérisés en infrarouge en transmission, et l'intégration de la bande azotures à 2100 cm<sup>-1</sup> permet d'en déduire la conversion, semi-quantitativement par rapport à une référence (Figure 84).

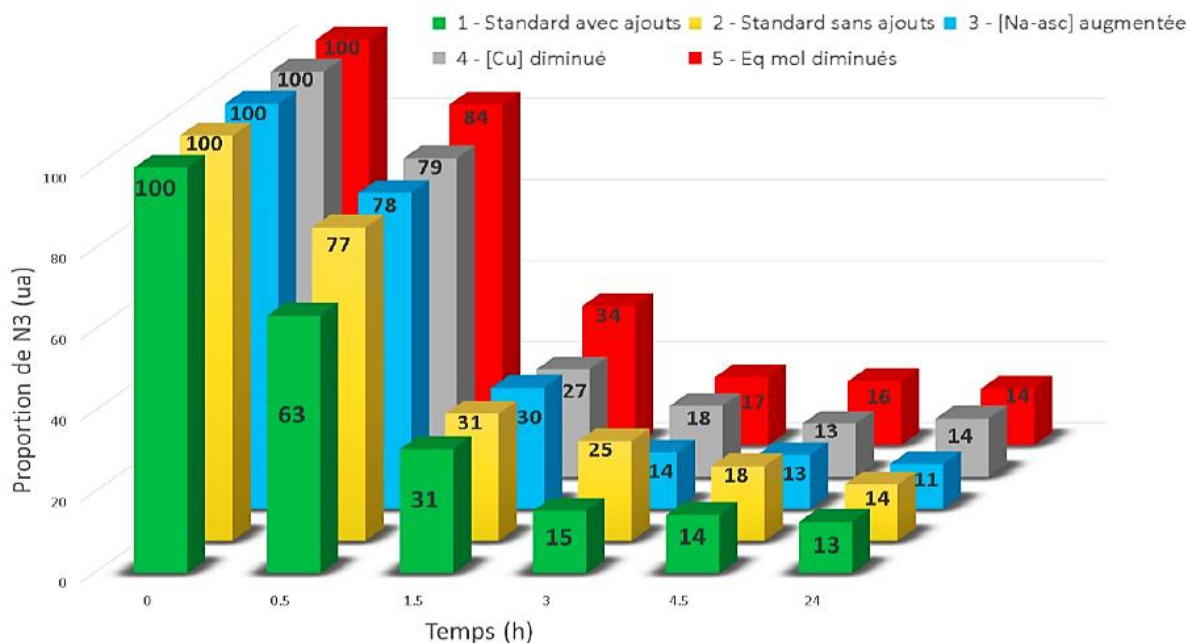


Figure 84 – Evolution des fonctions azotures dans le temps pour différentes conditions opératoires

Ces résultats démontrent globalement qu'il est possible de réduire le temps de réaction *click* à seulement 5 h au lieu de 24 h, ce qui permet de diminuer considérablement la casse des microplots (< 10%). Les 5 systèmes possèdent un comportement similaire, bien que les systèmes 1 et 3 soient plus rapides que les autres systèmes. De plus, l'ascorbate de sodium peut être ajouté entièrement au début de la réaction (système 3 substitué au système 1). Cette voie alternative permet d'obtenir un rendement équivalent tout en simplifiant de manière significative le protocole pour l'opérateur, notamment en vue de l'industrialisation de cette étape de fonctionnalisation.

Il est à noter que la conversion n'atteint jamais 100%. Ceci peut être expliqué par la présence d'une porosité fermée, à cœur, qui présenterait des fonctions azotures non accessibles et donc non réactives. En effet, en début de réaction, lorsque les échantillons sont plongés dans la solution, il est logique de penser que la réaction *click* dans les mésoporeux se passe comme un phénomène de diffusion, avec une fonctionnalisation qui intervient initialement en surface des plots, puis progressivement dans le volume du plot. Si le matériau présente bien à cœur une porosité fermée, liée au traitement de consolidation, cela expliquerait la saturation observée. De plus, les essais réalisés sur les échantillons consolidés par recuit photonique (cf. Chapitre II, §II.8.2.4.), vont dans le sens de cette hypothèse, car ces échantillons présentent un retrait moins important, donc une porosité plus accessible, et ces échantillons sont fonctionnalisés à hauteur de 100%.

Tous les tests ainsi réalisés ont permis d'optimiser la conversion de la réaction *click*, de fiabiliser et de simplifier cette étape (avec un seul ajout de Na-ascorbate en début de réaction), et de minimiser le temps de réaction et la casse des microplots.

#### III.4.4. Potentiel de fonctionnalisation en fonction de différents paramètres du matériau

Dans cette partie, le potentiel de fonctionnalisation a été étudié sur des échantillons présentant des différences de traitement au cours de l'étape de lavage de la porosité, ou encore d'autres caractéristiques du matériau, comme par exemple :

- **le taux d'AzPTES (ou taux de fonctions azotures)**, lié au nombre de molécules de pentynoate de NHS pouvant être clické
- **la structuration de la porosité**, liée à la répartition et l'accessibilité des fonctions azotures réactives,
- **le nombre de couches**, proportionnel à l'épaisseur et au volume du dépôt, notamment car la *click* est régie par un mécanisme de diffusion (d'après § III.4.3.4).

##### III.4.4.1. Influence de l'étape de lavage de la porosité

Une étude préliminaire a montré que **l'étape de lavage de la porosité, qui intervient avant de réaliser la réaction *click*, n'a pas une grande influence sur le rendement de la réaction *click***. En effet, lorsque celle-ci a été réalisée sur un échantillon sans lavage et sur un échantillon avec lavage préliminaire à l'éthanol en bain marie chaud, il n'y a eu aucune différence en termes de conversion sur ces deux échantillons. De plus, le lavage, c'est-à-dire l'élimination du tensioactif de pores du matériau intervient quand même lors de la réaction *click*, puisque l'échantillon est immergé dans la solution *click*, le tensioactif diffuse alors et quitte en partie les pores du matériau (ce qui est confirmé par analyse infrarouge en transmission). **Néanmoins, même si le lavage de la porosité n'a pas grande influence sur l'efficacité de la réaction *click*, il est important de maintenir cette étape pour ne pas relarguer trop de tensioactif lors de la réaction *click*, ce qui pourrait gêner la cinétique.**

##### III.4.4.2. Influence du taux d'AzPTES et de la structuration de la porosité

D'après le chapitre II, la structuration de la porosité est corrélée au taux d'AzPTES introduit, mais peut néanmoins être adaptée en fonction d'autres paramètres d'impression (notamment la stratégie de dépôt). Les échantillons testés ici, soit une dizaine par condition (Tableau 16), présentent la même conformation, c'est-à-dire la même densité de microplots (espacement constant de 40µm entre les plots et maille hexagonale) et le même nombre de couches, à savoir 5 couches déposées, quelle que soit la condition utilisée. Ils ont été clickés selon le protocole établi précédemment (§III.4.3.4), mais avec 5 équivalents molaires de cuivre (au lieu de 40), ceci afin d'exacerber les différences de fonctionnalisation pour ces différentes conditions matériau et ainsi conclure de façon plus fiable sur l'influence des paramètres testés.

Tableau 16 – Influence du taux d’AzPTES et de la structuration de la porosité sur le rendement de la réaction *click*

Condition	Taux d’AzPTES (%)	Structuration de la porosité	Conversion <i>click</i> (%)
N°1	10	Rectangulaire centrée	48
N°2	10	Vermiculaire	54
N°3	17,5	Vermiculaire	63

Chaque condition a été réalisée sur 3 échantillons pour chacune des séries. La conversion *click* est estimée par rapport à la moyenne, et présente un écart-type de  $\pm 2\%$ , montrant ainsi une bonne reproductibilité au niveau de la réaction par rapport au type d’échantillon. En comparant les conditions N°1 et N°2, il apparaît alors qu’à **même taux d’azotures, mais avec une structuration de la porosité différente, la structuration vermiculaire (désordonnée) semble maximiser la fonctionnalisation par chimie *click***. Ceci peut s’expliquer par une meilleure accessibilité des fonctions azotures dans le cas de la structuration vermiculaire, par rapport à la structuration rectangulaire centrée, qui est orientée dans une seule direction et pas nécessairement accessible sur toute la surface des microplots.

Par la suite, en comparant cette fois-ci les conditions N°2 et N°3, qui présentent la même structuration (vermiculaire), mais à des taux d’AzPTES (ou azotures) différents, il apparaît que **l’augmentation du taux d’AzPTES va en faveur d’une meilleure fonctionnalisation par chimie *click***. Ceci s’expliquerait simplement, par une densité accrue de fonctions azotures réactives, donc une proportion plus importante de molécules *clickées*.

#### III.4.4.3. Influence du nombre de couches

Pour étudier l’efficacité de la réaction *click* pour différents nombres de couches, des échantillons ont été préparés à partir d’une encre contenant 17,5% d’AzPTES, imprimée selon un réseau de plots standard, à savoir une maille hexagonale, pour des microplots espacés de 40  $\mu\text{m}$ . Dans ces conditions, la structuration des échantillons est toujours vermiculaire (d’après l’étude réalisée au chapitre II).

Ces échantillons ont ensuite été consolidés, puis lavés et *clickés* dans les conditions du protocole de *click* défini précédemment (40 équivalents molaires de pentynoate de NHS, de sulfate de cuivre et d’ascorbate de sodium). Après préparation, les échantillons ont été caractérisés par infrarouge en transmission et en microscopie optique pour estimer la casse des microplots (Figure 85).

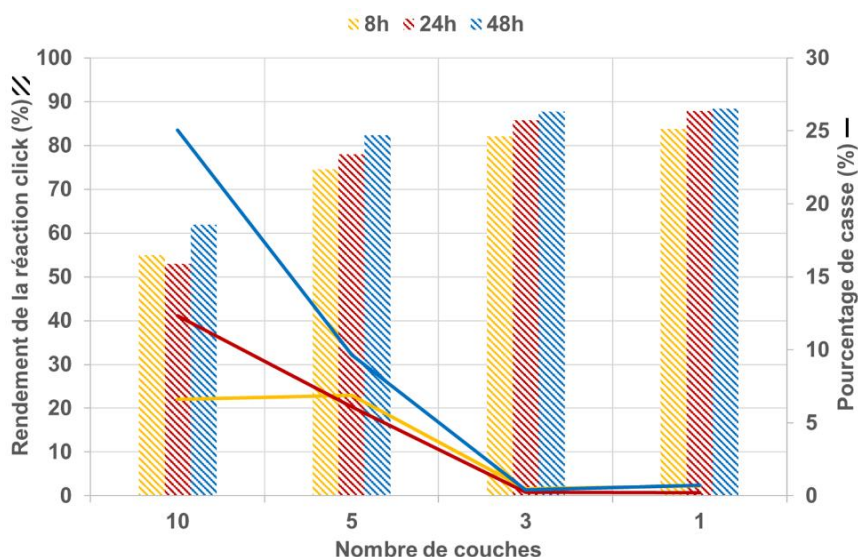


Figure 85 – Efficacité de la réaction *click* et casse des microplots pour différents nombres de couches

D'après ces résultats, il apparaît que le rendement de la réaction *click* est plus important sur un échantillon comportant 5 couches (condition utilisée de façon standard), que sur un échantillon de 10 couches. La structuration de surface étant vermiculaire pour les deux, ceci met en évidence que la réaction est bien régie par un mécanisme de diffusion du pentynoate de NHS dans le volume des microplots. **C'est préférentiellement la surface des microplots qui est clickée, avec une proportion volumique plus importante dans le cas d'un échantillon de 5 couches que d'un échantillon de 10 couches. La tendance est la même pour les échantillons de 3 couches et de 1 couche, qui possèdent un pourcentage volumique clické supérieur à celui d'un échantillon de 5 couches.** Dans ces conditions, la conversion maximale atteinte pour ces échantillons plafonne à 88%, toujours en raison de la présence de porosité fermée, avec des fonctions azotures non accessibles à la réaction *click*. Ce résultat avait été pressenti sur des expériences préliminaires, avec une solution *click* avec 40 eq. mol. de pentynoate de NHS, 5 eq. mol de sulfate de cuivre et 10 eq. mol. d'ascorbate de sodium, où des échantillons avec 10% d'azotures de 5 couches, 2 couches et 1 couche, présentaient des conversions plus marquées, respectivement d'environ 48%, 69% et 89%.

Les échantillons de 10 couches (Figure 85) sont aussi ceux qui présentent le plus de casse : 20% après 8 h et jusqu'à 83% au bout de 48 h. **Dans ces conditions, il est à noter que les échantillons de 3 couches et 1 couche ne présentent que peu de casse.**

D'après les résultats obtenus, **il semble donc qu'il ne faille pas privilégier un fort nombre de couches, puisque cela engendrerait beaucoup de casse et une fonctionnalisation moins efficace. Cependant, à ce stade, il est impossible de statuer sur les conditions optimales, en termes de nombre de couches ou de taux d'azotures, pour permettre un greffage optimal de protéines.** Ceci sera traité par la suite (cf. §III.5).

### III.4.5. Fiabilisation des étapes de lavages après réaction *click*

A l'issue de la réaction *click*, des lavages doivent être réalisés afin d'éliminer les réactifs, dont le cuivre, nocif d'un point de vue biologique. Pour cela, le diéthylthiocarbamate de sodium est utilisé afin de complexer les sels de cuivre [33]. Différents tests ont été effectués afin de vérifier l'utilité de ces lavages, mais aussi leur efficacité (Tableau 17) : en changeant le solvant qui permet de solubiliser le diéthylthiocarbamate (éthanol EtOH ou méthanol MeOH), mais aussi le nombre de répétitions des lavages. Les échantillons ont été clickés de façon standard, puis lavés après réaction *click* et enfin **le pourcentage de cuivre restant a pu être quantifié en pourcentage atomique, au moyen d'une analyse en spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB EDX).**

Tableau 17 – Résultats des conditions de lavages testées pour l'élimination du cuivre

Lamelle	N°0 - Ref	N°1	N°2	N°3	N°4
Conditions de lavage	Sans lavage	3 Ethanol 2 MeOH-Carbamate 3 Ethanol	3 Ethanol 2 EtOH-Carbamate 3 Ethanol	3 Ethanol 2 EtOH-Carbamate 3 Ethanol 1 EtOH-Carbamate 2 Ethanol	3 Ethanol 2 MeOH-Carbamate 3 Ethanol 1 MeOH-Carbamate 2 Ethanol
Cuivre (% at.)	1,4	0,8	0,5	0,3	0,1

**Avant les lavages post-réaction, il y a 1,4% de cuivre sur les microplots, d'après le test réalisé sur une lamelle de référence (non-lavée). La procédure de lavage est donc efficace car elle conduit à une nette diminution du pourcentage résiduel en cuivre.**

Suite aux lavages post-réaction, la lamelle N°2 présentait une coloration brunâtre particulière, non-visible sur la lamelle N°1. La première raison envisagée était que la solubilisation du diéthylthiocarbamate dans l'éthanol est moins efficace que dans le méthanol, ce qui expliquerait qu'une fois le complexe cuivre-diéthylthiocarbamate formé, celui-ci pourrait se retrouver piégé dans les pores du matériau. Pourtant les résultats EDS montrent un pourcentage en élément cuivre inférieur sur la lamelle N°2 par rapport à celui de la lamelle N°1 (0,5% au lieu de 0,8%). **Ainsi, les deux solvants semblent compatibles avec la procédure des lavages pour permettre la complexation du cuivre et faciliter son élimination.** Ceci montre également que **l'absence de coloration des échantillons ne signifie pas une élimination totale du cuivre.** Enfin, **l'augmentation des lavages conduit à la diminution de la teneur en cuivre**, comme le montrent les résultats des échantillons N°3 et N°4 avec respectivement 0,3 et 0,1%, mais qui rentrent cependant dans la limite de détection de la technique EDS.

**Aussi, une seconde expérience a permis de montrer que les lavages ne sont plus efficaces s'ils sont réalisés après séchage des échantillons à l'air libre**, ceci probablement car les impuretés seraient emprisonnées dans le réseau de pores du matériau. Les résultats de l'analyse EDS de ces échantillons montrent que le pourcentage atomique de cuivre résiduel des lamelles testées oscille entre 1,1% et 1,3%. **Cela confirme donc la nécessité de réaliser les lavages post-réaction directement après la réaction *click*.**

#### **III.4.6. Conclusions sur l'étape de fonctionnalisation par chimie *click***

Pour maximiser le rendement de la réaction *click* du pentynoate de NHS, un lavage de la porosité en soxhlet était réalisé précédemment, avec un mélange d'éthanol et d'acide chlorhydrique (5% en volume) durant 24 h. Les résultats ont permis de montrer que **ce lavage était non seulement non-reproductible, mais il était aussi responsable d'une casse importante des microplots**. Ce mode de lavage a alors pu être remplacé par un lavage dans de l'éthanol en bain marie (sur plaque chauffante réglée à 50 °C) durant 1 à 2 h, afin de **minimiser la casse, tout en éliminant une quantité non négligeable de tensioactif**. Cependant cette étape n'est pas apparue comme fondamentalement nécessaire à la réaction *click*, bien qu'elle assure que le tensioactif n'en gêne pas son déroulement.

Par la suite, des conditions de conservation et d'utilisation du pentynoate de NHS ont été mises en place, avec notamment la conservation du produit en dessiccateur à faible taux d'humidité (5 à 10%) afin de le conserver un maximum de temps sans qu'il ne soit altéré. De plus, l'étude a montré que **les échantillons clickés avec le pentynoate de NHS doivent être biofonctionnalisés sous 2 jours environ, afin que les fonctions NHS ne soient pas dégradées et que le greffage de protéines soit optimal**.

Concernant la réaction *click* en elle-même, le test de différents systèmes catalytiques a montré que **le système DMSO/Eau avec sulfate de cuivre et Na-ascorbate donne les meilleurs résultats**, parmi les différents systèmes testés. **Différentes conditions ont par ailleurs été optimisées pour la réaction**, à savoir dans un premier temps, le fait de chauffer la réaction (sur plaque chauffante réglée à 50 °C), ce qui a permis d'obtenir des rendements déjà bien supérieurs. **Les quantités de réactifs ont aussi été optimisées afin de maximiser la vitesse de réaction et le rendement obtenu**. Enfin, **la durée de réaction, initialement de 48 h a été abaissée à environ 5 h** (saturation observée après 4 h de réaction), **tout en minimisant grandement la casse**, garantissant ainsi l'intégrité des microplots.

La fonctionnalisation *click* par le pentynoate de NHS, réalisée sur des échantillons présentant différentes conditions d'un point de vue du matériau, ont mis en avant que **des échantillons de structuration vermiculaire (désordonnée) étaient mieux fonctionnalisés que des échantillons de structuration rectangulaire centrée (organisée)**. Ceci s'explique



notamment par une meilleure accessibilité de la porosité et des fonctions azotures réactives, dans le cas de la structuration vermiculaire. De plus, **l'augmentation du taux d'azotures va également en faveur d'un meilleur taux de fonctionnalisation**, du fait d'une densité accrue de fonctions, qui explique alors une proportion plus importante de molécules clickées. Les tests de *click* réalisés sur des échantillons avec différents nombres de couches ont permis de confirmer que cette réaction est soumise à un mécanisme de diffusion, car **des échantillons à faible nombre de couches (donc de faible épaisseur) sont mieux fonctionnalisés** et présentent moins de casse (5% maximum), par rapport à des échantillons avec un nombre de couches important qui présentent une casse accentuée (jusqu'à 80% de casse).

Il est cependant nécessaire de s'intéresser au greffage des protéines sur ces échantillons afin de statuer sur les conditions matériau à adopter (taux d'azotures, nombre de couches, etc.). Dans ce but, il semblait intéressant de **pouvoir quantifier au mieux la quantité de fonction NHS clickées**, afin d'avoir une idée du nombre de protéines pouvant être greffées sur ces échantillons, et faire par la suite le lien avec d'autres techniques (AFM, microscopie confocale, etc.). Du fait des faibles quantités mises en jeu et du faible poids moléculaire des atomes d'azote impliqués dans ces mécanismes, le dosage par ICP ou par XPS se sont avérées impossibles. Une autre méthode a été mise en place, par dosage d'une molécule de pentynoate de p-nitrophénol, clickée dans les mêmes conditions que le pentynoate de NHS, puis par dosage UV du p-nitrophénol (Annexe 14). La quantité de molécules de pentynoate de NHS clickée a ainsi été approchée, bien que les quantités trouvées soient sous-estimées.

Enfin, **le lavage après réaction *click* a montré son utilité dans l'élimination du cuivre résiduel au sein du matériau**. Les tests réalisés ont permis d'adapter les protocoles de lavage afin de maximiser l'élimination du cuivre. Par la suite, ces étapes de lavage, très contraignantes et chronophages pour un opérateur, pourraient être automatisées en vue de l'industrialisation de toute la chaîne de fabrication des sondes.

**En résumé, en vue de l'industrialisation de tout le procédé, les protocoles ont été optimisés et fiabilisés, tout en réduisant considérablement le temps de préparation des échantillons (Tableau 18), ainsi que la consommation des produits utilisés.**

Tableau 18 – Réduction de la durée du protocole de fonctionnalisation par chimie *click*

	Lavage de la porosité	Réaction <i>click</i>	Lavage post-réaction	TOTAL
<b>Protocoles antérieurs</b>	24 h (soxhlet)	48 h	24 h (soxhlet)	<b>4 jours</b>
<b>Nouveaux protocoles</b>	1 h	5 h	1 à 2 h	<b>8 heures</b>

### III.5. Etude du greffage des biomolécules sur des échantillons clickés

Le système doit permettre la détection des marqueurs cancéreux. La méthode de détection repose sur un phénomène de transfert d'énergie de fluorescence, l'effet FRET, qui a été explicité précédemment (cf. Chapitre I, §1.2.2.6, et Figure 8, page 22). Pour cela, le matériau est biofonctionnalisé après réaction *click* du pentynoate de NHS.

Une protéine G, présentant des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>), est greffée sur les fonctions NHS, puis un anticorps spécifique du marqueur cancéreux ciblé (anticorps anti-TrkB) est ancré sur la protéine, par interaction chimique entre les deux biomolécules. Afin d'utiliser le phénomène de FRET, la protéine et l'anticorps sont marqués par des fluorochromes, respectivement par un fluorochrome accepteur AlexaFluor® 594 et un fluorochrome donneur l'AlexaFluor® 488 ou 546 (Figure 86).

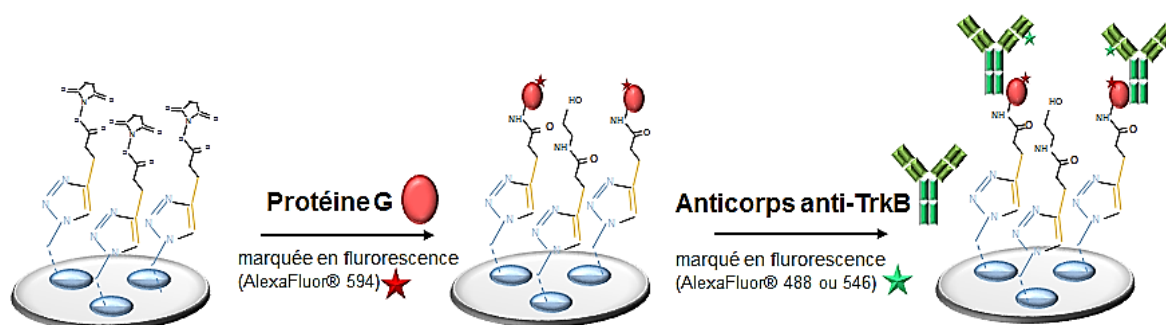


Figure 86 – Etapes de biofonctionnalisation des échantillons clickés avec le pentynoate de NHS

La preuve de concept avait été établie lors d'une étude antérieure [23], bien qu'il reste également à vérifier que le greffage soit spécifique, c'est-à-dire qu'il y a absence de greffage en absence de fonctions NHS. Par ailleurs, l'étude porte sur l'optimisation de la sensibilité de détection du système. Pour cela, il faut maximiser la réponse lors de la détection, c'est-à-dire le basculement d'énergie observé en fluorescence lors de la détection des marqueurs cancéreux (diminution de l'émission du donneur au profit de celle de l'accepteur). Aussi, plusieurs voies peuvent être envisagées pour maximiser cette sensibilité de détection :

- Optimiser le taux de fluorochromes donneurs par rapport au taux de fluorochromes accepteurs, pour que chaque fluorochrome donneur participe au transfert d'énergie.
- Maximiser le nombre de fluorochromes par biomolécule, sans saturer les sites spécifiques assurant le greffage des biomolécules.
- Maximiser le nombre de biomolécules greffées, par l'optimisation des protocoles, tout en garantissant une répartition homogène en surface des microplots.

### III.5.1. Vérification du greffage spécifique des protéines sur les microplots fonctionnalisés azotures

L'objectif de cette partie est de pouvoir attester de la réaction de greffage des protéines G marquées en fluorescence, se faisant sur les groupements NHS présents dans la porosité des microplots, à l'issue de la réaction *click*. L'étude sera faite en premier lieu avec des protéines non marquées en fluorescence, puis marquées par des fluorochromes, ceci en raison du prix important des kits de marquage en fluorescence (environ 800€ pour un kit de 5 séries d'expériences). Afin de pouvoir maximiser le taux de greffage des protéines G, des échantillons imprimés de microplots avec 17,5% d'azotures sont utilisés.

#### III.5.1.1. Greffage de protéines non marquées en fluorescence

Afin de pouvoir vérifier le greffage spécifique de protéines non marquées en fluorescence, des échantillons sont préparés aux différentes étapes de fonctionnalisation. La surface de ces échantillons est ensuite étudiée par AFM, afin de vérifier si des entités sont présentes en surface (Figure 87). Pour des échantillons qui ne présentent pas de groupement NHS, que ce soit avec ou sans mise en contact avec des protéines, il est à noter que la surface a l'air similaire à celle d'un échantillon de référence. En revanche, un échantillon clické avec le pentynoate de NHS et mis au contact de protéines présente une densité accrue d'entités en surface (Figure 87-d). Des extractions de profil réalisées sur cette surface permettent de montrer que les entités sont de taille entre 3,5 et 4,5 nm, ce qui semble correspondre aux protéines utilisées, dont la taille est de 4,2 x 4,0 x 3,5 nm [34], [35]. La légère différence de hauteur est expliquée par la topographie engendrée par la porosité vermiculaire en surface.

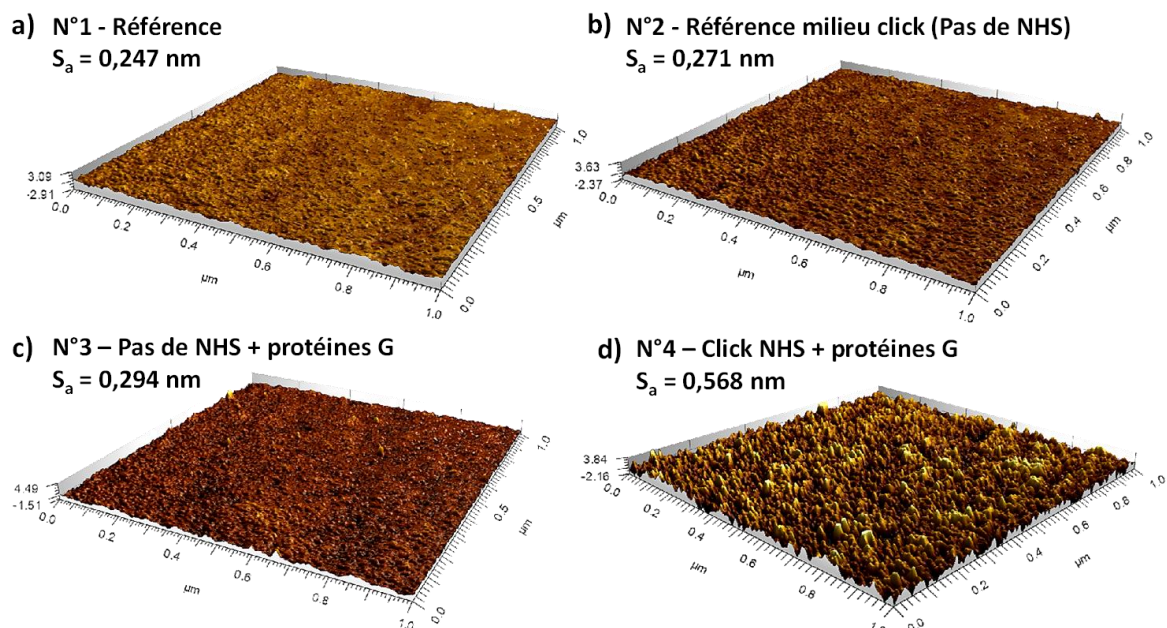


Figure 87 – Scans AFM  $1 \times 1 \mu\text{m}$  de la surface de microplots sans traitement (a), mis dans le milieu click sans pentynoate de NHS (b), mis au contact de protéines G sans click de pentynoate de NHS (c) et mis au contact de protéines G avec click préalable de pentynoate de NHS (d)

Afin de témoigner de la fonctionnalisation par les protéines, il est aussi possible de considérer la valeur de la hauteur moyenne arithmétique, notée  $S_a$ . En effet, un échantillon de référence, *i.e.* sans traitement, présente une valeur de  $S_a$  de 0,247 nm et qui correspond à la rugosité de la porosité vermiculaire présente en surface du matériau. Cette valeur ne varie que très peu lorsque l'échantillon est immergé dans le milieu *click* sans pentynoate de NHS ( $S_a = 0,271$  nm), ou bien sans pentynoate de NHS et en présence de protéines ( $S_a = 0,294$  nm), ce qui oriente notamment vers un greffage qui serait bien spécifique. En présence de pentynoate de NHS et avant greffage des protéines, la rugosité ne varie que très peu [23], en raison de la faible taille de la molécule. Par la suite, lorsque l'échantillon est clické avec du pentynoate de NHS et mis en présence de protéines G, **une augmentation nette de la valeur de  $S_a$  est observée ( $S_a = 0,568$  nm), ce qui laisse à penser que des protéines G sont bien greffées en surface du matériau.**

Néanmoins, la technique AFM ne permet pas de renseigner sur la chimie des entités présentes en surface. Pour cela, des analyses complémentaires en spectroscopie ont été réalisées. La technique d'infrarouge en mode ATR a permis d'obtenir la signature spécifique de la protéine G, qui a aussi été obtenue par spectroscopie Raman, effectuée sur la protéine G pure (Figure 88). Les bandes ont pu être attribuées grâce aux données présentes dans la littérature, à la fois pour le spectre infrarouge [36], et pour le spectre Raman [37], [38].

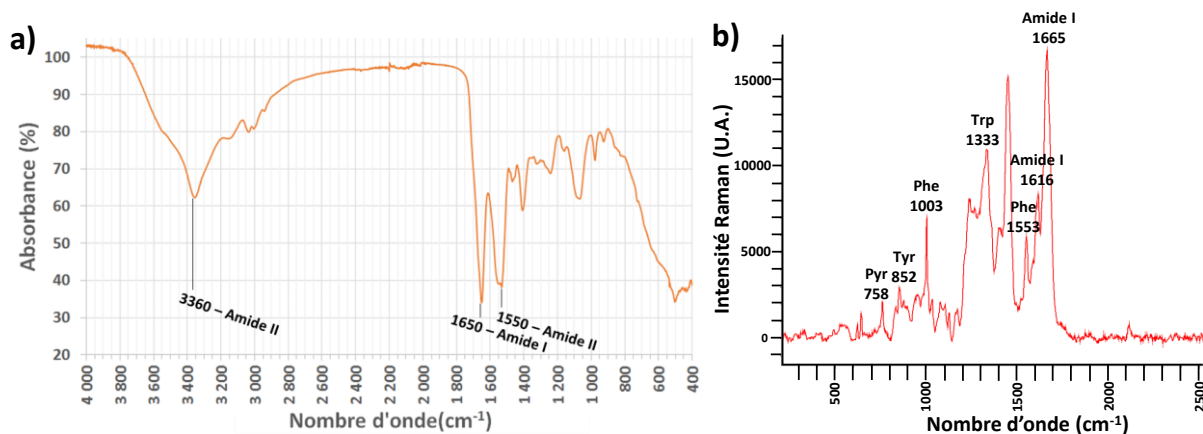


Figure 88 – Spectres infrarouge (a) et Raman (b) des protéines G utilisées

Les spectres de la protéine laissent bien apparaître des groupements spécifiques de celle-ci, avec notamment la présence de liaisons peptidiques autour de 1650 et 1550  $\text{cm}^{-1}$ . La spectroscopie Raman permet même d'identifier des acides aminés constitutifs de la protéine (chaîne de différents acides aminés), comme par exemple la pyrrolysine (Pyr), la tryptophane (Trp), la tyrosine (Tyr), la phénylalanine (Phe), ces acides aminés possédant en effet des fonctions chimiques spécifiques. Par la suite, ces spectres ont servi de référence pour étudier le greffage des protéines.

Des lamelles de verre imprimées de microplots avec 17,5% d'azotures, fonctionnalisées avec NHS et protéines G, ont été caractérisées en spectroscopie Raman, mais celles-ci n'ont pas révélé d'apparition significative des bandes de vibration recherchées, probablement du fait d'une **intensité trop faible en Raman de la réponse des protéines greffées sur les microplots**. L'infrarouge en transmission, réalisée sur des wafers de silicium imprimés de microplots avec 17,5% d'azotures, a cependant permis de voir des différences significatives au niveau des bandes de vibrations d'intérêt (Figure 89).

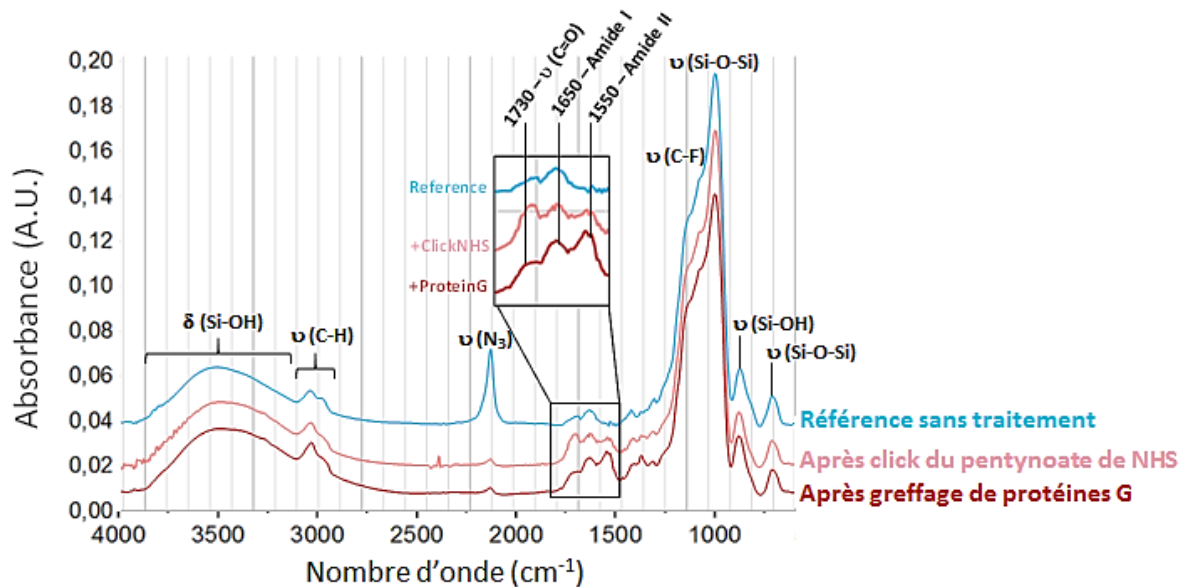


Figure 89 – Spectres infrarouge d'échantillon de référence (bleu), ou bien cliqué avec du pentynoate de NHS (rose), ou bien cliqué NHS et mis au contact de protéines G (rouge)

D'après les résultats des échantillons caractérisés en infrarouge en transmission, il est possible de noter une augmentation de la bande à  $1730\text{ cm}^{-1}$  après réaction *click*, ce qui atteste de la fonctionnalisation par les groupements NHS, ainsi qu'une augmentation des bandes à  $1650$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$ . Par la suite, une fois les échantillons mis en présence de protéines G, et malgré une bande à  $1650\text{ cm}^{-1}$  qui semble inchangée, il est possible de remarquer que l'intensité de la bande C=O à  $1730\text{ cm}^{-1}$  a diminué et que celle de la bande à  $1550\text{ cm}^{-1}$  a augmenté. **Ceci traduit bien l'immobilisation des protéines G sur les fonctions NHS, de par la disparition de fonctions NHS réactives et l'apparition de davantage de groupements peptidiques de la protéine.** Il y a donc une complémentarité entre les techniques de spectroscopie et d'AFM, la spectroscopie permettant une caractérisation chimique de la réaction de greffage, et l'AFM permettant une caractérisation physique, de par l'augmentation de hauteur constatée qui est en accord avec la taille des protéines.

### III.5.1.2. Greffage de protéines marquées par un fluorochrome

Pour s'intéresser au greffage des protéines marquées en fluorescence, des échantillons de type lamelles de verre ont été imprimés de façon standard avec des

microplots de 17,5% d'azotures. Des échantillons fonctionnalisés NHS et d'autres non fonctionnalisés NHS ont ensuite été mis en présence de protéines G, préalablement marquées par le fluorochrome AlexaFluor® 594 (AF594). La surface des échantillons a ensuite été caractérisée par AFM pour s'intéresser au greffage des protéines marquées (Figure 90).

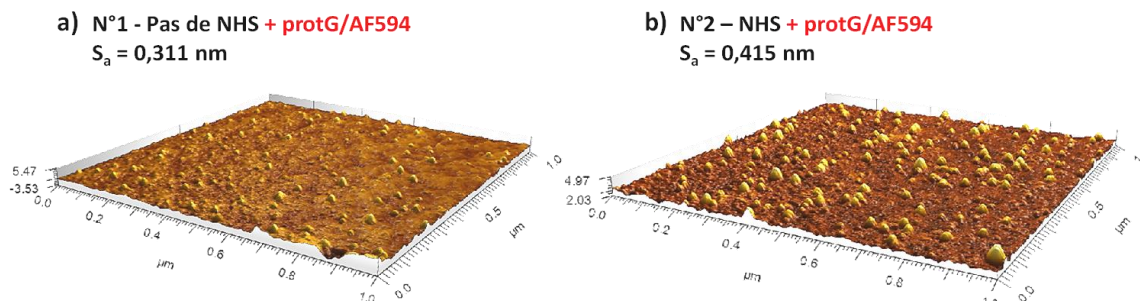


Figure 90 - Scans AFM 1x1 µm de la surface de microplots mis en présence de protéines marquées par le fluorochrome AF594 : sans fonctionnalisation NHS (a) ou bien avec fonctionnalisation NHS (b)

En présence de fonctions NHS (Figure 90-b), il y a une bonne densité d'entités en surface du plot ( $S_a = 0,415$  nm), et une densité moindre ( $S_a = 0,311$  nm), en l'absence de NHS (Figure 90-a). Cela tend à montrer que **le greffage des protéines se fait bien préférentiellement sur les échantillons greffés NHS, mais ne serait pas spécifique, du fait de la présence d'entités en surface des échantillons de contrôle**. Ceci n'apparaissait pas sur les échantillons non fonctionnalisés NHS et mis au contact de protéines non marquées (Figure 87-c) et pourrait donc être lié à la nature du fluorochrome utilisé.

En effet, celui-ci doit se greffer sur les protéines par le biais de fonctions NHS présentes sur le fluorochrome (Figure 91) et qui réagissent avec les fonctions amines ( $-NH_2$ ) de la protéine. Le fluorochrome possède aussi des zones électroniquement instables (groupements  $N^+$  et  $SO_3^-$ ).

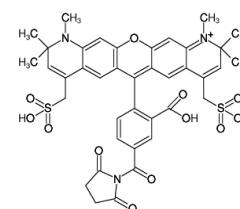


Figure 91 – Structure chimique du fluorochrome AlexaFluor® 594

Dans le cas d'une absence de fonctionnalisation par *click*, il reste alors des fonctions azotures disponibles dans les pores du matériau, qui sont elles-mêmes électroniquement instables (groupement  $-N=N^+=N^-$ ). Il est alors possible que des protéines marquées par le fluorochrome AF594, venant à la proximité des fonctions azotures en surface, soient attirées par une interaction électrochimique (non-covalente) entre les fonctions azotures et certains groupements du fluorochrome, expliquant ensuite que les lavages post-fonctionnalisations ne suffisent pas à éliminer la totalité des protéines marquées, qui ne sont alors pas greffées de façon covalente sur le matériau.

Afin de vérifier que les entités détectées en AFM sont bien des protéines G marquées par des fluorochromes, des analyses complémentaires en microscopie confocale ont été

réalisées (Figure 92). Ceci permet, à la longueur d'onde 655 nm, d'observer le signal de réémission du fluorochrome AF594 et de s'intéresser à l'homogénéité du greffage.

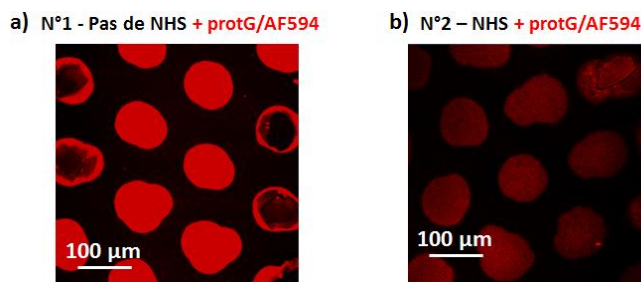


Figure 92 – Image en intensité obtenue en microscopie confocale à 655 nm, pour des échantillons mis en présence de protéines G marquées AF594 : en l'absence de fonctionnalisation click (a) ou préalablement fonctionnalisés par chimie click du pentynoate de NHS (b)

Un constat direct a permis de montrer qu'une réponse en intensité est présente sur un échantillon non fonctionnalisé NHS (Figure 92-a), alors que celui-ci ne devrait pas avoir vu de greffage de protéines et ne devrait donc pas donner de réponse en intensité. Par ailleurs, il est d'autant plus surprenant de trouver une intensité beaucoup plus importante sur ce type d'échantillon plutôt que sur celui qui a été clické avec le pentynoate de NHS et qui doit avoir des protéines greffées en surface (Figure 92-b).

**L'explication qui semble alors la plus probable est que du fluorochrome libre, *i.e.* non greffé à des protéines, soit présent dans la solution de marquage des échantillons, et puisse alors diffuser dans la porosité.** Ceci s'expliquerait par rapport à l'étape préalable de marquage des protéines, qui, une fois marquées, sont passées au travers d'une colonne censée filtrer les fluorochromes non greffés à des protéines. Une mauvaise filtration entraînerait alors la présence de fluorochromes libres dans la solution qui est mise en contact avec les échantillons. Par la suite, ces fluorochromes diffusent alors librement dans les pores du matériau non clické, et diffusent moins facilement dans les pores du matériau clické, de par l'accroche progressive des protéines qui viennent boucher ces pores.

Ces conclusions ont été vérifiées par spectroscopie Raman, qui apporte une information complémentaire sur les interactions chimiques. Les échantillons étant réalisés sur lamelles de verre, il n'était pas possible d'utiliser la méthode d'infrarouge en transmission. De plus, comme les échantillons sont marqués en fluorescence, il n'était pas possible de les caractériser aux longueurs d'ondes 532 et 785 nm. Ceci a néanmoins été possible à la longueur d'onde 488 nm. Les échantillons ont été caractérisés dans les mêmes conditions, à savoir une focalisation sur le haut d'un plot, grâce à un objectif x100, un réseau de 600 traits, une excitation laser de 20 secondes à 488 nm, répétée avec 20 accumulations (Figure 93).



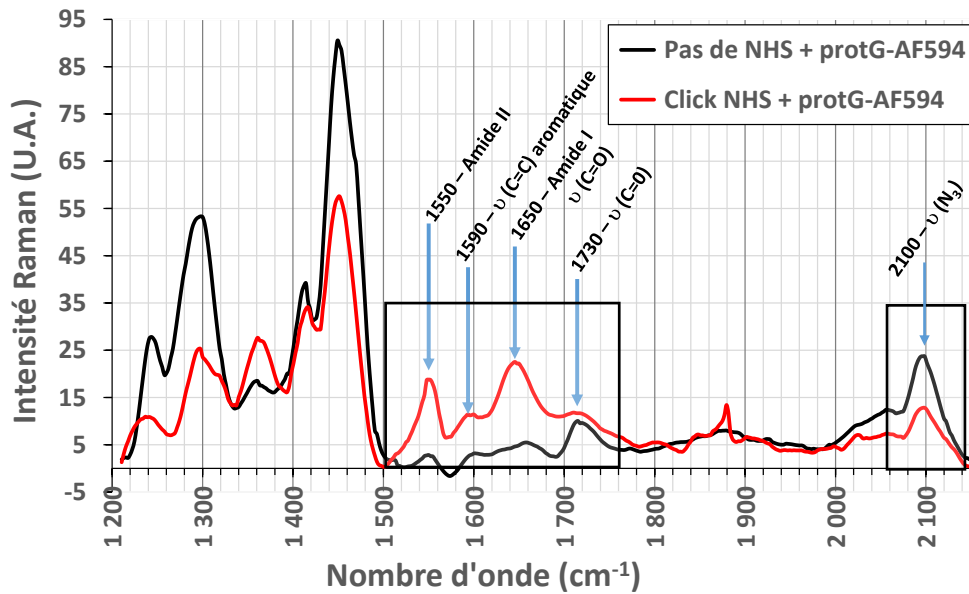


Figure 93 – Spectres Raman bruts obtenus pour les différents échantillons

Les principaux résultats qui se dégagent alors de cette analyse sont les suivants :

- La bande azotures à  $2100\text{ cm}^{-1}$  est plus importante sur les échantillons qui n'ont pas subi la *click* du pentynoate de NHS, ce qui est donc cohérent et écarte complètement l'hypothèse que les échantillons précédemment observés en microscopie confocale (Figure 92) aient pu être inversés.
- Les échantillons clickés avec le pentynoate de NHS et mis au contact de protéines possèdent des bandes intenses à  $1550$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$ , qui sont caractéristiques des liaisons peptidiques. De plus, une bande à  $1360\text{ cm}^{-1}$ , relative à des liaisons C-N aromatiques, est plus intense pour ces échantillons clickés avec protéines que pour les échantillons non clickés, ce qui semble confirmer le greffage des protéines.
- Les échantillons qui n'ont pas été clickés présentent une bande à  $1730\text{ cm}^{-1}$ , qui correspond pourtant à la liaison C=O ester caractéristique des fonctions NHS, bien que ces échantillons n'aient pas été clickés. Ces fonctions sont donc celles du fluorochrome libre, qui en possède aussi (cf. Figure 91, page 141). Ceci coïncide également avec une augmentation d'intensité du mode C-H des groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ , observé pour les bandes à  $1240$ ,  $1300$ ,  $1410$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$ .

**Cette étude du greffage de protéines marquées par un fluorochrome a permis de mettre en évidence un défaut au niveau des protocoles de biofonctionnalisation, à savoir la présence de fluorochrome libre dans la solution de protéines marquées, ce fluorochrome pouvant pénétrer dans les pores du matériau. De plus, comme observé en AFM, la présence de fluorochromes sur les protéines entraîne une diminution de la**





densité de protéines greffées sur la surface des plots ( $S_a = 0,415 \text{ nm}$ ), par rapport au cas où les protéines ne sont pas marquées ( $S_a = 0,568 \text{ nm}$ ).

Comme défini dans les objectifs de l'étude, il faut néanmoins viser à maximiser la densité de protéines greffées, ce qui nécessite de reprendre les étapes des protocoles utilisés.

### III.5.2. Optimisation des protocoles de greffage de protéines G marquées

Il a été observé une diminution de la densité de protéines greffées, lorsque celles-ci sont marquées par un fluorochrome. **Ceci peut être lié au nombre de fluorochromes par protéine, c'est-à-dire le taux de marquage ou DOL (*Degree of Labeling*)**. En effet, les fluorochromes se fixent par leur fonction NHS sur des liaisons amines de la protéine. Si le DOL est fort, alors la protéine pourrait voir ses sites amines saturés, ce qui entrainerait une diminution de l'interaction avec les microplots fonctionnalisés NHS.

Par ailleurs, la présence de fluorochrome libre peut être liée à une étape du protocole de marquage des protéines, à savoir l'étape de filtration en colonne (Figure 94). Pour celle-ci, une résine est mise dans une colonne de filtration, puis la solution de protéines marquées y est déposée puis centrifugée. **La colonne est censée retenir les fluorochromes libres, de telle sorte que le filtrat ne contienne que des protéines marquées et pas de fluorochromes libres**. D'autre part, un composant des kits de marquage, le bicarbonate de sodium, doit permettre de maîtriser le marquage, donc la valeur du DOL. Différentes conditions ont été testées pour diminuer la part de fluorochromes libres (§II.5.2.1).

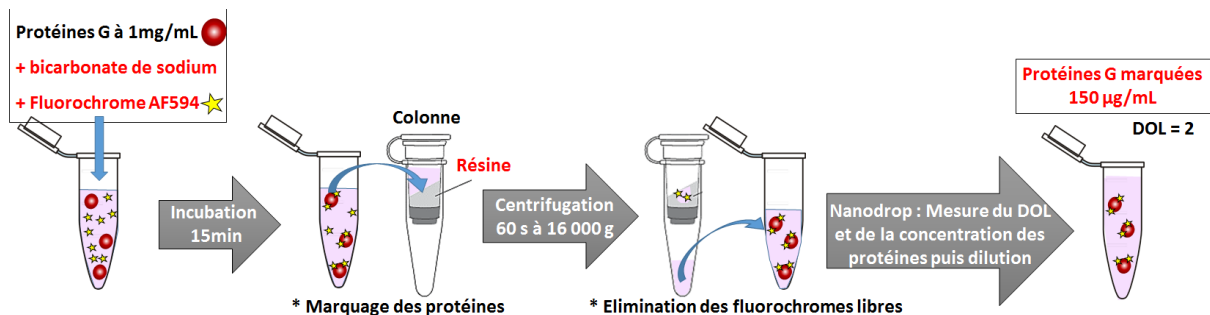


Figure 94 – Schéma synthétique du protocole de marquage des protéines par un fluorochrome

Par la suite, une fois que le DOL (taux de marquage) est maîtrisé, il est possible, comme pour la réaction *click* du pentynoate de NHS, d'essayer de diminuer la concentration des protéines lors des étapes de greffage, dans l'optique d'économiser les produits, dont le coût est élevé (800€ par kit de marquage). Le temps de réaction sera aussi étudié.



### III.5.2.1. Maîtrise du taux de greffage (DOL)

Dans le kit de marquage en AlexaFluor® 594 produit par Invitrogen, il arrive que la résine fournie soit en quantité insuffisante. Il est alors possible de la remplacer par de la résine P6 produite par Bio-Rad. Par ailleurs, l'absence d'utilisation du bicarbonate de sodium semblait augmenter le DOL. **Différentes conditions de marquage de la protéine par le fluorochrome AF594 ont été testées, en fonction du type de résine et de l'utilisation ou non du bicarbonate de sodium.** Les résultats des marquages par spectroscopie d'absorption (équipement Nanodrop), sont présentés dans le Tableau 19, les concentrations en protéines et valeurs de DOL sont calculées par le biais des équations 1 et 2. **Par la suite, ces différentes solutions de protéines G marquées ont été mises en contact avec des échantillons similaires, qui ont été caractérisés en microscopie confocale (Figure 95).**

$$[Protéines]_{(mmol/mL)} = \frac{[A_{280} - 0.56 \times A_{590}] \times \text{facteur de dilution}}{MW_{(protéine\ en\ DA)} \times A_{280\ (protéine\ à\ 1\ mg/mL\ sans\ marquage)}} \quad (\text{équation 1})$$

$$DOL = \frac{\text{moles de fluorochromes}}{\text{moles de protéines}} = \frac{A_{590} \times \text{facteur de dilution}}{90\ 000 \times [Protéines]_{(mmol/mL)}} \quad (\text{équation 2})$$

Tableau 19 – Synthèse des résultats en absorbance pour les différentes conditions de marquage

Conditions		Abs (280 nm)	Ecart-type	Abs (590 nm)	Ecart-type	[Protéines] (mmol/mL)	DOL
<b>A</b>	<b>AVEC NaHCO<sub>3</sub></b> <b>Résine Kit Invitrogen</b>	0.557	± 0.03	0.800	± 0.04	4.64 E-06	<b>1.91</b>
<b>B</b>	<b>AVEC NaHCO<sub>3</sub></b> <b>Résine Bio-Rad P6</b>	0.378	± 0.10	0.532	± 0.08	3.39 E-06	<b>1.74</b>
<b>C</b>	<b>SANS NaHCO<sub>3</sub></b> <b>Résine Kit Invitrogen</b>	0.646	± 0.01	0.964	± 0.01	4.52 E-06	<b>2.37</b>
<b>D</b>	<b>SANS NaHCO<sub>3</sub></b> <b>Résine Bio-Rad P6</b>	0.494	± 0.26	0.313	± 0.03	13.6 E-06	<b>0.26</b>

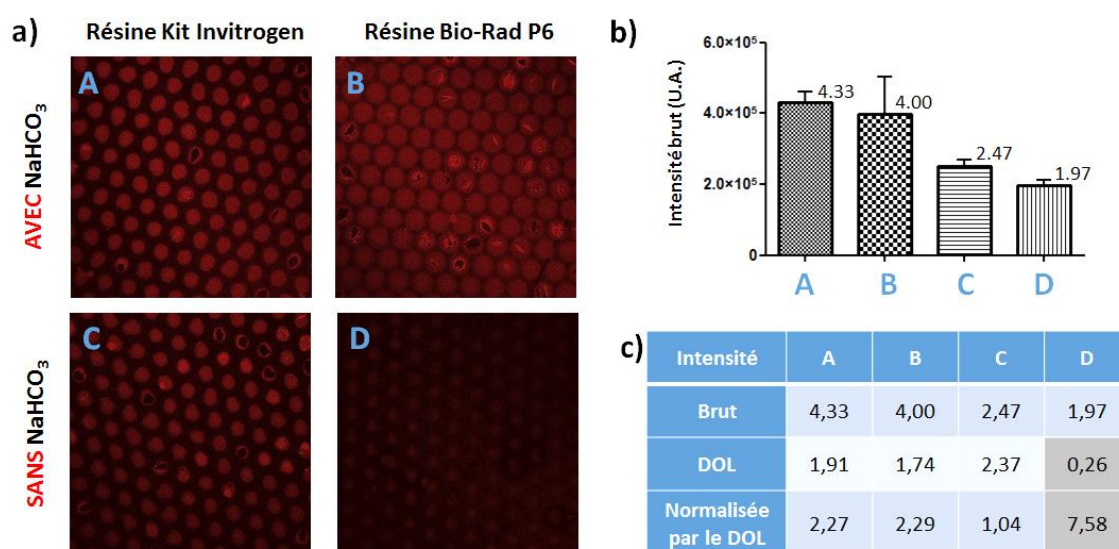


Figure 95 – Synthèse des résultats obtenus pour les différentes conditions de marquage de la protéine : images en intensité obtenues en microscopie confocale (a), quantification de l'intensité brute récupérée sur toute la fenêtre d'analyse (b) ou bien normalisée par rapport au DOL (c)



Concernant le type de résine, il apparaît que **la résine P6 de chez Bio-Rad soit plus sélective que la résine du kit Invitrogen, car elle donne des concentrations en protéines plus faibles, en comparant les conditions A et B** (en se basant sur les valeurs d'absorbance à 280 nm et de concentrations en protéines calculées). La microscopie confocale donne pour la condition B des ségrégations de fluorochromes au niveau des plots fissurés, ce qui dénote une fonctionnalisation des pores du volume et explique ainsi une intensité localement plus forte. Par ailleurs, l'intensité (brute ou normalisée par le DOL) mesurée sur toute la surface observée montre des résultats similaires entre les conditions A et B, ce qui montre une **homogénéité du marquage pour ces protéines**, visible aussi par l'homogénéité observée sur les clichés de microscopie. **Il semble donc préférable d'utiliser la résine du kit Invitrogen qui permet de récupérer un maximum de protéines.**

En comparant les résultats des conditions A et C (résine du kit Invitrogen), il apparaît que **l'absence de bicarbonate de sodium lors du marquage permette parfois d'avoir un DOL plus élevé** (2,37 sans bicarbonate de sodium contre 1,91 avec). Cependant l'image en microscopie confocale pour la condition C montre des plots de plus forte intensité, ce qui peut être dû, soit à du fluorochrome libre qui a pénétré les pores, soit à un marquage non régulier des protéines. Pourtant, les écart-types des mesures d'absorbance au Nanodrop relevées pour la condition C sont très faibles, ce qui réfute l'hypothèse établie. **L'intensité plus forte observée en microscopie confocale au niveau des plots pour la condition C est donc très probablement liée à du fluorochrome libre.** Ceci apporte donc l'information que le DOL est surévalué, du fait de la présence de fluorochrome libre. Par ailleurs, toujours pour la condition C, l'intensité brute mesurée sur toute la surface d'analyse est plus faible en l'absence d'utilisation du bicarbonate de sodium (malgré la présence de fluorochrome libre). **Ceci montre donc que le marquage des protéines par le fluorochrome est moins efficient et/ou que le greffage des protéines se fait moins bien.** Or, comme le DOL est surévalué (2,37), il serait alors moindre et globalement du même ordre que celui de la condition A (1,91), ce qui exclut l'hypothèse que les protéines se grefferaient moins bien. **Il est donc fort probable que l'absence d'utilisation du bicarbonate de sodium augmente le DOL, mais en réalité le marquage se fait moins bien, ce qui laisse davantage de fluorochromes libres avant et après filtration**, en raison d'une possible saturation de la résine de la colonne qui pourrait provoquer le passage de fluorochromes libres au travers de celle-ci. **Il est donc préférable d'utiliser le bicarbonate de sodium dans la réaction de marquage des protéines par les fluorochromes, afin de fiabiliser la valeur de DOL et d'éviter la présence de fluorochromes libres.**

Enfin, la condition D testée conjugue les 2 problèmes énoncés précédemment. En raison de l'absence d'utilisation du bicarbonate de sodium, les protéines ne sont pas bien



marquées et il y a beaucoup de fluorochromes libres. L'utilisation de la résine P6 permettrait de retenir beaucoup de protéines ainsi que des fluorochromes, comme le témoignent les valeurs faibles d'absorbances à 280 et à 590 nm. Par ailleurs, il y a une aberrance au niveau de ces mesures d'absorbances, qui renvoient une concentration plus élevée de protéines, mais une valeur de DOL plus faible. Ces conditions sont, quoi qu'il en soit, inadaptées pour un bon marquage des protéines par le fluorochrome.

**En conclusion, ces résultats confirment qu'il vaut mieux utiliser le bicarbonate de sodium pour garantir un marquage fiable et reproductible des protéines, ainsi qu'une accroche homogène des protéines sur les microplots. Il est aussi préférable d'utiliser la résine du kit Invitrogen, afin de récupérer davantage de protéines, par rapport à la résine P6 de Bio-Rad, qui en filtre beaucoup trop.**

### III.5.2.2. Variation de la concentration en protéines et du temps de greffage

Tout comme pour la réaction *click* du pentynoate de NHS, il est possible de chercher à améliorer les conditions de greffage des protéines, **soit en diminuant la concentration des protéines pour économiser des produits, soit en adaptant le temps de réaction afin de gagner du temps.** Pour cela, deux types de protéines sont utilisées, la protéine du fournisseur Sigma-Aldrich qui est celle utilisée jusqu' alors, et celle du fournisseur ThermoFisher, qui est moins chère. Différentes concentrations sont testées (150, 50 et 5 µg/mL) et des échantillons de 17,5% d'azotures, préalablement clickés avec le pentynoate de NHS ont été mis en présence de ces solutions protéiques, puis caractérisés en microscopie confocale (Figure 96).

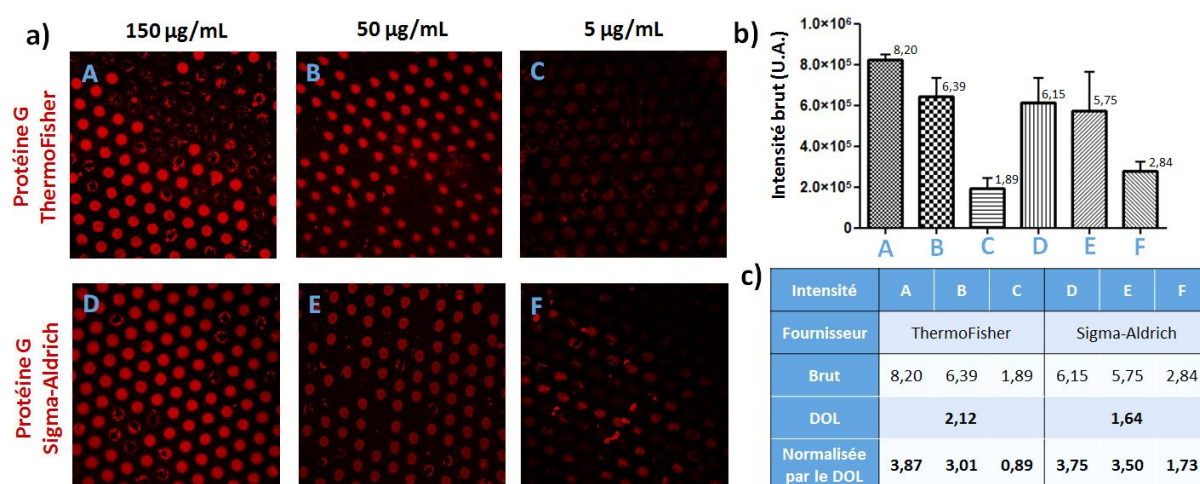


Figure 96 - Synthèse des résultats obtenus pour les différentes concentrations en protéines : images en intensité obtenues en microscopie confocale (a), quantification de l'intensité brute récupérée sur toute la fenêtre d'analyse (b) ou bien normalisée par rapport au DOL (c)



En première observation, il est possible de voir de la casse au niveau des plots, qui peut être liée aux étapes précédant le greffage des protéines. Cependant, sur les plots intègres, la réponse en fluorescence est homogène, synonyme d'un marquage uniforme des protéines par les fluorochromes. Par ailleurs, il semble qu'il n'y ait pas de fluorochromes libres, sinon il y aurait des plots localement plus intenses. L'intensité globale récupérée en fluorescence diminue lorsque la concentration des protéines diminue, comme attendu.

Malgré une casse importante des plots observés pour la condition A, l'intensité brute récupérée est plus intense que celle pour la condition D (8.20 contre 6.15), pour une même concentration en protéines (150 µg/mL). Ceci est lié à un taux de marquage plus fort, avec un DOL de 2,12 pour les protéines du fournisseur ThermoFisher, contre un DOL de 1,64 pour les protéines du fournisseur Sigma-Aldrich. Les protéines ne sont donc pas marquées de façon équivalente, malgré l'utilisation du même protocole de marquage. Ceci peut s'expliquer simplement, par la structure moléculaire des protéines, en fonction de la séquence peptidique lors de la synthèse, qui peut varier d'un fournisseur à l'autre (la séquence est généralement non communiquée par les fournisseurs). **Pour comparer les deux types de protéines, il convient alors de normaliser l'intensité brute par le DOL (nombre de fluorochromes par protéine).** Les intensités normalisées des conditions A et D sont alors du même ordre de grandeur (respectivement 3,87 et 3,75). **En revanche, en comparant les intensités normalisées pour les conditions B et E (50 µg/mL), ainsi que pour C et F (5 µg/mL), il est possible de remarquer que l'intensité normalisée par le DOL est plus forte lorsque la protéine du fournisseur Sigma-Aldrich est utilisée. Par la suite, c'est donc la protéine G fournie par Sigma-Aldrich qui sera utilisée.**

De plus, pour la protéine G fournie par Sigma-Aldrich, il semble que le greffage soit équivalent pour des concentrations en protéines de 150 et 50 µg/mL, mais l'intensité diminue de moitié pour 5 µg/mL. Aussi, malgré le besoin d'économiser des produits, **il est préférable de travailler avec une concentration en protéines de 150 µg/mL, afin de maximiser et fiabiliser le greffage des protéines.**

Pour une concentration de 150 µg/mL, il s'est également avéré que la réduction du temps de greffage, de 30 min au lieu de 2 h, ne permettait pas de greffer complètement les protéines. **Une durée de deux heures pour le greffage des protéines a donc été maintenu durant les protocoles.**



### III.5.3. Incidence de paramètres matériaux sur l'efficacité du greffage des protéines

Afin de pouvoir maximiser la réponse en fluorescence, l'influence de certains paramètres matériaux sur le greffage des protéines a été étudiée, à savoir notamment le taux de fonctions azotures du matériau, ainsi que le type de structuration de la porosité (désordonné, de type vermiculaire ou bien ordonné, de type rectangulaire centrée). Pour s'affranchir de la signature en spectroscopie du fluorochrome, les tests ont porté uniquement sur le greffage de protéines sans marquage. Ceci permettrait de déterminer, indépendamment du DOL, s'il existe une condition sur le matériau qui rende optimal le greffage des protéines. Pour cela, les protéines ont été greffées sur des échantillons préalablement clickés avec le pentynoate de NHS, suivant les protocoles précédemment établis.

#### III.5.3.1. Etude du greffage des protéines par spectroscopie infrarouge en transmission

Dans un premier temps, l'influence du taux d'azotures sur le greffage des protéines a été étudiée par le biais de l'infrarouge en transmission (sur substrat wafer de silicium), sur des échantillons ayant respectivement des taux d'azotures de 10% ou 17,5%, qui présentent tous deux la structuration vermiculaire. Le suivi a été fait à différentes étapes de la fonctionnalisation de ces échantillons, comme illustré en Figure 97 pour la série d'échantillons avec 10% d'azotures. Après click du pentynoate de NHS, il y a une augmentation des bandes à 1550, 1650 et 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Après greffage des protéines G, la bande spécifique du NHS à 1730  $\text{cm}^{-1}$  a diminué, au profit de celles à 1550 et 1650  $\text{cm}^{-1}$ , qui correspondent aux liaisons peptidiques de la protéine.

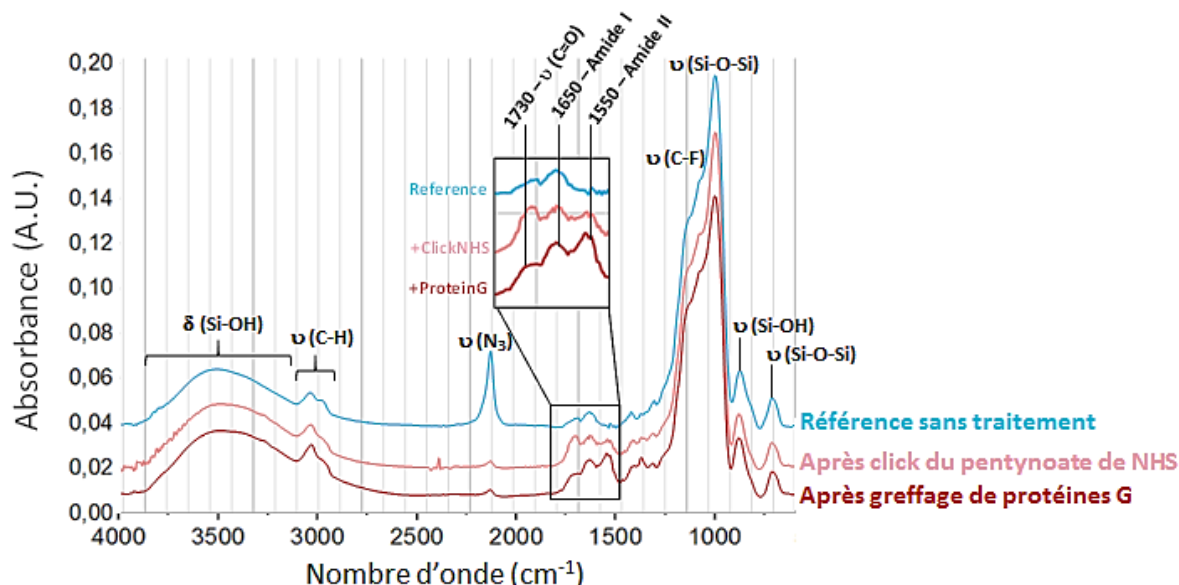


Figure 97 – Spectres infrarouge obtenus pour la série d'échantillons Az10% vermiculaire à différentes étapes du processus de greffage des protéines G non marquées



Afin de pouvoir réaliser une étude comparative (semi-quantitative), **un traitement de données a été effectué (avec le logiciel *Wire*), qui consiste à pouvoir décomposer les 3 bandes à 1550, 1650 et 1730 cm<sup>-1</sup>**. Pour s'affranchir de la contribution des bandes présentes en-dessous de 1500 cm<sup>-1</sup>, tout le spectre a été décomposé afin d'isoler correctement les 3 bandes d'intérêt (Figure 98). L'aire de ces bandes a ensuite été quantifiée.

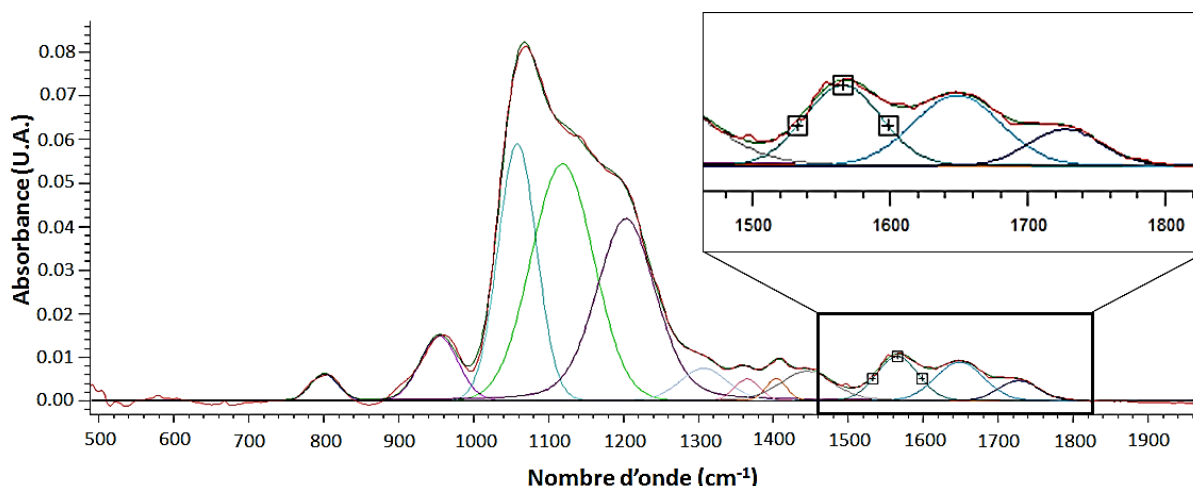


Figure 98 – Exemple de décomposition du spectre obtenu sur un échantillon Az17,5% clické avec le pentynoate de NHS et greffé avec des protéines G

Une fois les aires des bandes connues, il est alors possible d'estimer le **taux de greffage de la protéine, par la diminution relative de la bande NHS à 1730 cm<sup>-1</sup>**. En effet, il y a disparition des fonctions NHS lorsque la protéine se fixe sur les microplots par l'interaction de ses fonctions amines avec les fonctions NHS présentes sur les plots. Le calcul se fait alors selon l'équation 3 ci-dessous et qui permet d'estimer le taux de greffage des échantillons avec 10% et 17,5% d'azotures (Tableau 20) :

$$\text{Taux de greffage}_{FTIR} (\%) = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Aire}_{1730\text{cm}^{-1}} \text{Après greffage}}{\text{Aire}_{1730\text{cm}^{-1}} \text{Après click}} \right] \quad (\text{équation 3})$$

Tableau 20 – Synthèse des résultats obtenus après traitement des données infrarouge réalisées sur les échantillons avec 10% et 17,5% d'azotures et de structuration vermiculaire

Echantillons	Aire de la bande à 1550 cm <sup>-1</sup>	Aire de la bande à 1650 cm <sup>-1</sup>	Aire de la bande à 1730 cm <sup>-1</sup>	Taux de greffage FTIR calculé (%)
Az10 - V Après click NHS	0.167	0.548	0.444	83
Az10 - V Après greffage des protéines	▲ 0.280 ▲	▼ 0.447 ▼	▼ 0.077 ▼	
Az17,5 - V Après click NHS	0.679	0.668	0.615	51
Az17,5 - V Après greffage des protéines	▲ 0.713 ▲	▲ 0.706 ▲	▼ 0.299 ▼	



Ces résultats (Tableau 20) permettent de conclure que **l'atténuation de la bande NHS à 1730 cm<sup>-1</sup> est beaucoup plus forte pour un taux d'azotures de 10% par comparaison avec un taux de 17,5%**. Pourtant, malgré une densité de fonctions azotures plus importante pour 17,5% que pour 10% d'azotures, ce résultat tendrait alors à montrer qu'il y a une mauvaise répartition des protéines en surface pour les échantillons avec 17,5% d'azotures, contre une bonne répartition pour les échantillons avec 10% d'azotures. Ceci est bien sûr dépendant de la répartition des fonctions amines sur la protéine G, bien que cette donnée soit inconnue. Cependant, ce résultat pourrait être expliqué comme illustré en Figure 99.

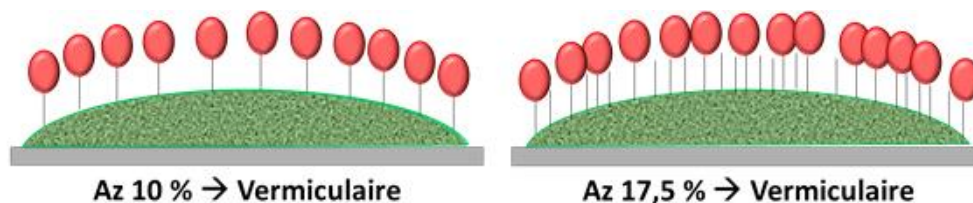


Figure 99 – Proposition d'explication du greffage entre des échantillons avec 10% et 17,5% d'azotures

**Du fait de l'encombrement de la protéine, elle pourrait, dans le cas de 17,5% d'azotures, se fixer en surface par le biais de plusieurs fonctions NHS. Cependant, il est possible que la protéine écrante ainsi des fonctions NHS qui ne participent alors pas au greffage.** L'aire de la bande à 1550 cm<sup>-1</sup> vient appuyer cette hypothèse, car son augmentation est beaucoup plus forte avec 10% d'azotures (environ + 68%) par rapport à 17,5% d'azotures (environ + 5%). Il en va de même pour l'aire de la bande à 1650 cm<sup>-1</sup>, qui joue un rôle dans les deux contributions (présente après *click* du pentynoate de NHS, ainsi qu'au niveau des liaisons peptidiques présentes sur les protéines). En effet, il y a une diminution de l'aire de la bande constatée pour 10% d'azotures (de 0,548 à 0,447), du fait de la forte diminution des fonctions NHS, majoritaire par rapport à l'augmentation de la bande liée au greffage des protéines. De plus, il y a une augmentation de l'aire de la bande pour 17,5% d'azotures (de 0,668 à 0,706), du fait d'une faible diminution des fonctions NHS, minoritaire par rapport à l'augmentation liée au greffage des protéines.

**En première conclusion, il semble donc que le greffage des protéines se fasse mieux avec des échantillons avec 10% d'azotures qu'avec 17,5% d'azotures, pour une même structuration vermiculaire.** Par ailleurs, les tests réalisés avec des taux inférieurs (1% notamment) n'étaient pas pertinents en infrarouge en transmission, en raison de la faible intensité des bandes de vibration, qui ne permettait pas de conclure de façon fiable. C'est pourquoi la spectroscopie Raman a été utilisée en second temps afin de pouvoir qualifier plus finement ces échantillons. De plus, des analyses par microscopie à force atomique (AFM) ont été envisagées pour vérifier l'homogénéité du greffage des protéines.





### III.5.3.2. Etude du greffage des protéines par spectroscopie Raman et AFM

L'influence du taux d'azotures et de la structuration de la porosité sur le greffage des protéines a été étudiée dans cette partie par le biais de la spectroscopie Raman (sur lamelles de verre) ainsi que par microscopie à force atomique (AFM). Les échantillons utilisés présentent la même configuration (même réseau, même espacement entre plots, même nombre de couches) et ont été réalisés pour différents taux d'azotures (Az) et différents types de structuration de la porosité, à savoir vermiculaire (V) ou rectangulaire centrée (RC) : Az1%-RC, Az5%-RC, Az10%-RC, Az10%-V et Az17,5%-V.

Le suivi a été réalisé avec la longueur d'onde 532 nm, en repérant un microplot sur chaque échantillon, et en ciblant cette zone pour chaque étape du greffage des protéines : (1) après impression, consolidation et lavage du tensioactif, (2) après réaction *click* du pentynoate de NHS, (3) après greffage des protéines G non marquées, (4) après lavage à l'éthanolamine. Le rôle de l'éthanolamine [39] est de pouvoir couper les fonctions NHS qui n'auraient pas réagi avec les protéines (Figure 100), préalablement au greffage des anticorps. Les spectres étant collectés dans les mêmes conditions et à chaque fois sur le même microplot, il est alors possible de comparer les spectres à chaque étape de fonctionnalisation, comme illustré en Figure 101 pour l'échantillon Az10%-RC.

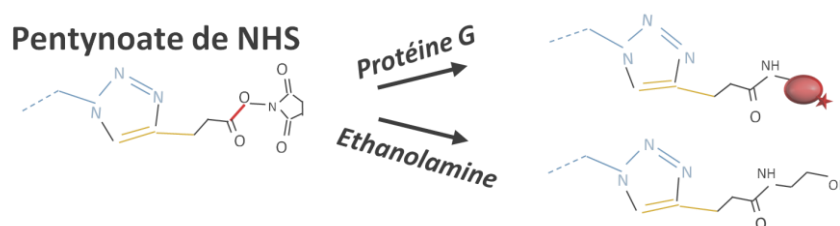


Figure 100 – Réaction entre le pentynoate de NHS clické et la protéine G ou l'éthanolamine, conduisant à la disparition complète de la liaison ester en rouge.

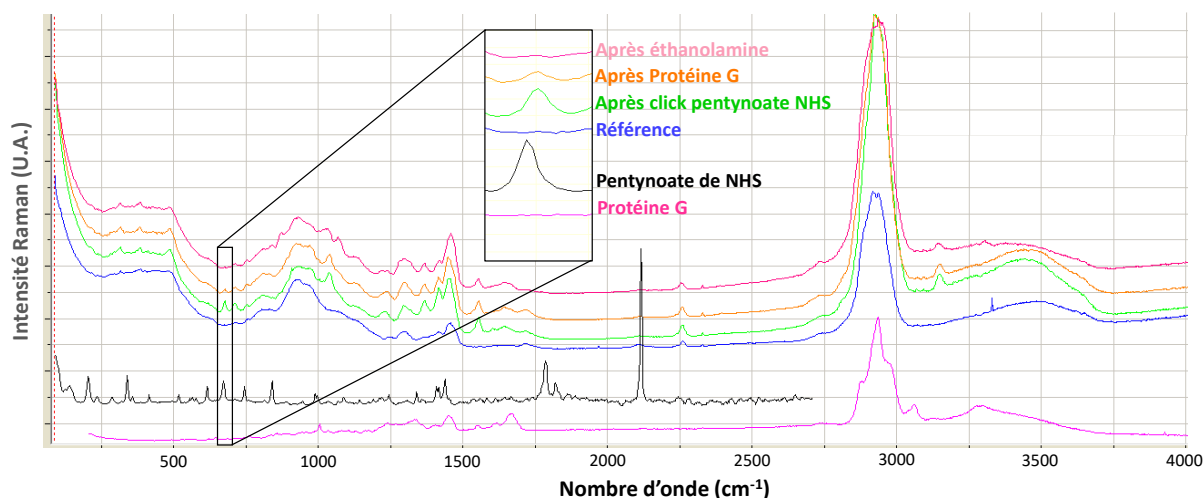


Figure 101 – Spectres Raman (données brutes) pour l'échantillon avec 10% d'azotures, de structuration rectangulaire centrée, après chacune des quatre étapes du processus de greffage des protéines. Spectres du bas : spectres de référence du pentynoate de NHS et de la protéine G solide.



De par les résultats obtenus (Figure 101), il y a une nette différence après greffage du pentynoate de NHS, par rapport à l'échantillon de référence, avec l'apparition de bandes entre 1250 et 1750  $\text{cm}^{-1}$ . En revanche, la signature des protéines est difficilement identifiable, du fait d'une similarité des spectres après *click* du pentynoate de NHS et après greffage des protéines. En effet, l'analyse étant focalisée, la quantité de protéines greffées sur la surface analysée est minime par rapport à la contribution de l'ensemble des liaisons relatives au matériau et au pentynoate de NHS *clické* en volume.

Cependant, une autre bande, située à 675  $\text{cm}^{-1}$  semble intéressante (encadré, Figure 101), attribuée au pentynoate de NHS. En effet, cette bande n'est pas présente sur la signature du matériau de référence, ni sur la signature de référence de la protéine G, mais est bien présente sur celle du pentynoate de NHS et se retrouve sur l'échantillon *clické*. Après greffage des protéines, l'intensité de cette bande diminue, jusqu'à disparaître complètement par utilisation de l'éthanolamine, qui coupe la liaison ester du pentynoate de NHS (Figure 100). **Il est donc apparu possible de quantifier indirectement l'efficacité du greffage des protéines G, par la diminution relative de la bande située à 675  $\text{cm}^{-1}$  (intégrée sur l'intervalle [658 ; 692]  $\text{cm}^{-1}$ ) et attribuée à la liaison ester du pentynoate de NHS.** Cette efficacité ou « taux de greffage » est alors quantifiable par le biais de l'équation 4 ci-dessous, et a pu être calculée pour tous les échantillons (Tableau 21).

$$\text{Taux de greffage}_{\text{Raman}} (\%) = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Aire}_{675 \text{ cm}^{-1}} \text{Après greffage}}{\text{Aire}_{675 \text{ cm}^{-1}} \text{Après click}} \right] \quad (\text{équation 4})$$

La caractérisation Raman est faite pour chaque échantillon sur le même plot et dans les mêmes conditions de focalisation, il est alors possible de calculer des ratios d'aires pour chaque échantillon, sans devoir normaliser les spectres obtenus sur un même échantillon. De plus, lorsqu'il s'agit de comparer plusieurs échantillons différents, il convient généralement de normaliser les spectres, soit par rapport à l'intensité globale sur tout le spectre, soit en normalisant par rapport à des bandes invariantes du matériau. Cependant, l'équation 4 faisant intervenir des ratios d'aires de bandes, cela revient à s'affranchir d'une quelconque normalisation et permet donc de travailler directement avec les données brutes.

Tableau 21 – Synthèse des résultats obtenus en Raman pour les différents taux d'azotures

Structuration de la porosité	Rectangulaire centrée (RC)			Vermiculaire (V)		
	Echantillon	Az01% - RC	Az05% - RC	Az10% - RC	Az10% - V	Az17,5% - V
Taux de greffage Raman calculé (%)		100	89	72	100	72



Les résultats trouvés pour Az10%-V et Az17,5%-V sont en accord avec ceux trouvés grâce à l'infrarouge, à savoir que **le greffage des protéines est meilleur avec 10% qu'avec 17,5% d'azotures, pour une même structure vermiculaire**. Les valeurs calculées sont purement indicatives, car dépendent de la technique de caractérisation et des conditions utilisées. Il est donc normal de ne pas retrouver les mêmes valeurs que celles du §III.5.3.1.

**Pour un même taux d'azotures (10%), la comparaison des deux types de structuration montre que la structure vermiculaire est plus favorable au greffage des protéines.** Ceci peut résulter de la plus grande disponibilité des fonctions azotures pour des pores organisés aléatoirement pour la structure vermiculaire, par rapport à des pores plus difficilement accessibles pour la structuration rectangulaire centrée, où les pores seraient accessibles aux extrémités des cylindres poreux.

**Pour la structuration rectangulaire centrée, la tendance des échantillons avec 1%, 5% et 10% d'azotures montre que le greffage se fait mieux à bas taux d'azotures.** Puisque les fonctions azotures sont difficilement accessibles avec la structuration rectangulaire centrée, ce résultat peut alors s'expliquer par la probabilité de rencontre entre une protéine et des fonctions NHS clickées, qui serait plus forte pour un taux d'azotures faible.

L'AFM a été réalisée sur ces échantillons pour vérifier l'homogénéité du greffage des protéines (Figure 102). Pour les échantillons de structuration rectangulaire centrée, le greffage des protéines est moins dense pour 1% d'azotures, mais est plus homogène que pour 10% d'azotures, qui a tendance à montrer des amas de protéines. L'échantillon avec 10% d'azotures en structuration vermiculaire est également plus homogène au niveau du greffage des protéines, avec un greffage encore plus individualisé que pour l'échantillon avec 1% d'azotures. L'échantillon avec 17,5% d'azotures, pourtant vermiculaire, présente un greffage très inhomogène, avec des amas de protéines très épais. Pour cet échantillon à 17,5% d'azotures, les amas peuvent être dus à une co-condensation des molécules d'AzPTES, comme observé d'après la RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$  au chapitre II, et qui expliquerait la présence de zones localement plus riches en fonctions azotures et d'autres qui en seraient dépourvues.

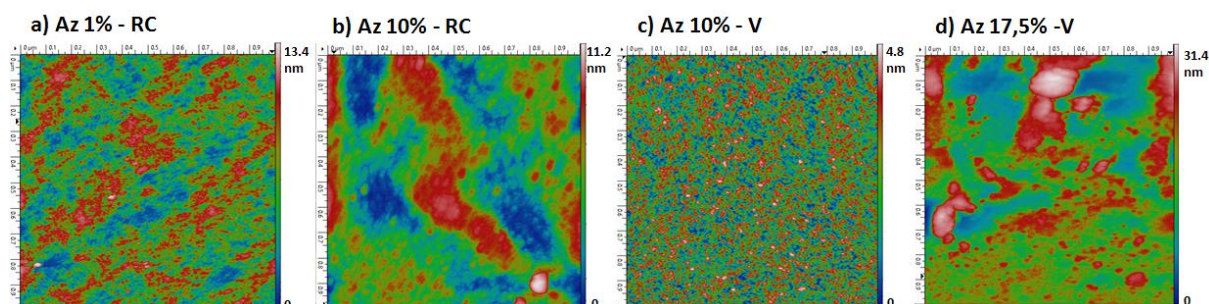


Figure 102 – Scans AFM ( $1 \times 1 \mu\text{m}$ ) de la surface d'échantillons greffés de protéines pour différents taux d'azotures et différentes structururations : 1% RC (a), 10% RC (b), 10% V (c) ou 17,5% V (d)



Les résultats d'AFM coïncident ainsi avec les résultats obtenus en spectroscopie (Tableau 20 & Tableau 21). Le meilleur résultat correspond à l'échantillon avec 10% d'azotures en structuration vermiculaire, qui présente une très bonne répartition homogène des protéines (Figure 102-c).

### III.5.4. Mise en évidence du greffage des anticorps anti-TrkB sur les protéines G

Le marqueur cancéreux choisi pour l'étude est l'antigène TrkB, surexprimé à la surface des cellules cancéreuses [40], [41], et qui est reconnu spécifiquement par son anticorps complémentaire, l'anticorps anti-TrkB. Comme tout anticorps (Figure 103), celui-ci possède un fragment constant Fc possédant une terminaison acide carboxylique (-COOH) qui va permettre son immobilisation sur les fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) de la protéine. La spécificité de détection de l'antigène cible est dictée par la chimie du fragment spécifique Fab. Des fonctions amines sont aussi présentes sur le site spécifique (Figure 103), et permettent le marquage par des fluorochromes fonctionnalisés NHS, comme les AlexaFluor® [42].

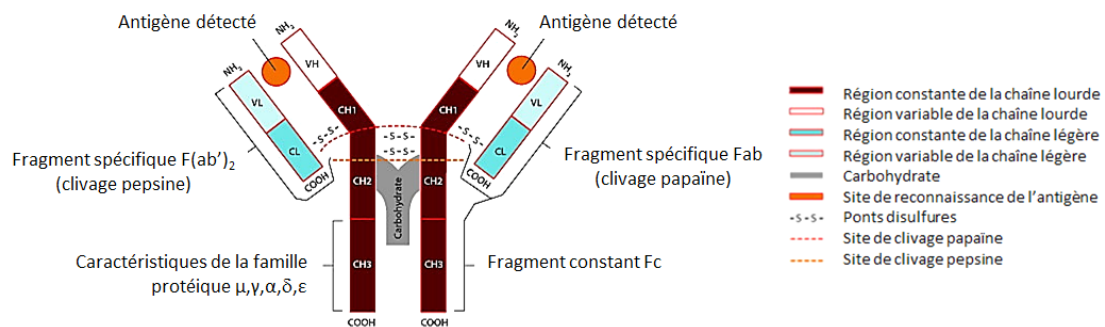


Figure 103 – Schéma de structure d'un anticorps : fragment constant Fc et fragment spécifique Fab de détection de l'antigène correspondant [43]

Le but de cette partie est de mettre en évidence et trouver des conditions qui optimisent l'accroche des anticorps anti-TrkB sur les protéines G. Il ne semble a priori pas possible d'utiliser des méthodes de spectroscopie afin de caractériser précisément l'accroche des anticorps sur les protéines. En effet, cela reviendrait à étudier la diminution des fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) et acides carboxyliques (-COOH), déjà très présentes au niveau des protéines, par rapport à l'augmentation des fonctions peptidiques (également très présentes au niveau des protéines) résultant de cette réaction (Figure 104). De plus, l'anticorps fourni n'est pas sous forme solide comme la protéine, mais il est fourni directement en solution. Il est alors difficile de le caractériser et d'en extraire une signature spécifique en spectroscopie.

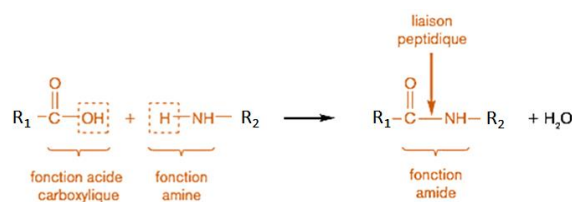


Figure 104 – Formation de la liaison peptidique à partir des fonctions amine et acide carboxylique



L'AFM quant à elle donne une idée de la morphologie et permet de statuer sur une augmentation de hauteur, mais ne permettrait pas de discriminer rigoureusement les anticorps des protéines, en surface des microplots. **Il semble donc plus pertinent de marquer chacune des biomolécules (protéine et anticorps) par un fluorochrome, et d'étudier la signature en fluorescence après greffage, au moyen de la microscopie confocale.**

Pour cela, des échantillons de même configuration (réseau, espacement, nombre de couches) ont été imprimés pour différents taux d'azotures, à savoir 1%, 5%, 10% et 17,5%. **Les échantillons avec 1% et 5% d'azotures présentent la structuration rectangulaire centrée (RC), tandis que les échantillons avec 10% et 17,5% d'azotures présentent la structuration vermiculaire (V).** Ces échantillons ont été préparés rigoureusement dans les mêmes conditions : clickés avec le pentynoate de NHS puis greffés par des protéines G préalablement marquées par le fluorochrome AF594 ( $DOL(G_{AF594}) = 1,3$ ), et ensuite par des anticorps (Ac) anti-TrkB préalablement marqués par le fluorochrome AF488 ( $DOL(Ac_{AF488}) = 3,7$ ). La microscopie confocale permet de vérifier le greffage des biomolécules (Figure 105).

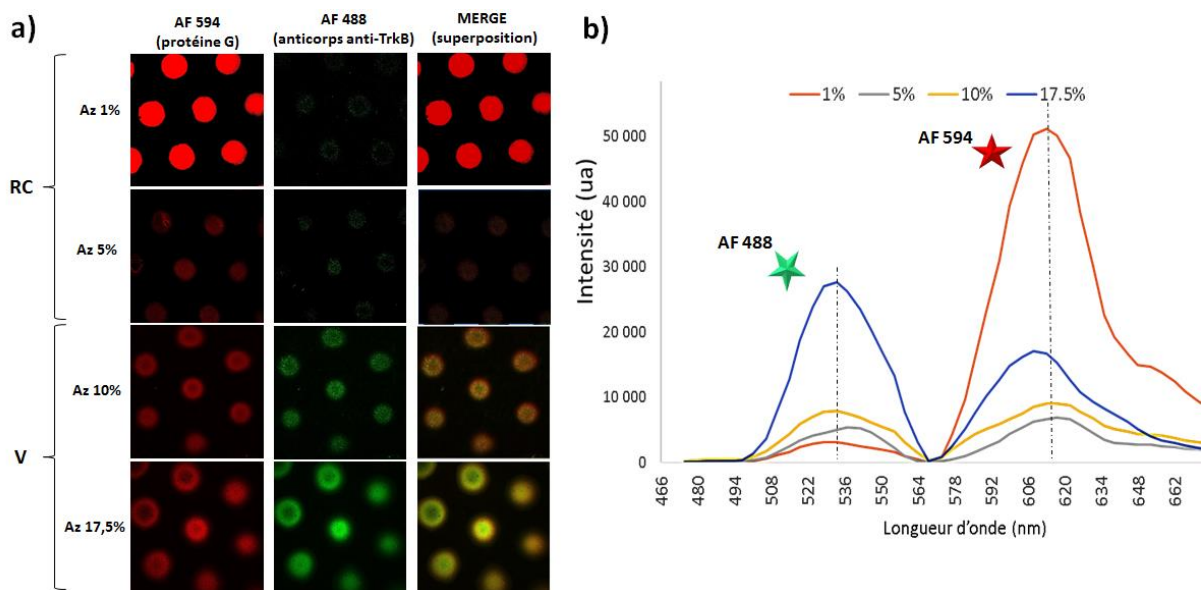


Figure 105 – Images obtenues en microscopie confocale en mode multicanaux, permettant d'isoler la signature des deux fluorochromes (a) et intensités correspondantes (b)

D'après ces résultats, il est alors possible de remarquer que l'échantillon avec 1% d'azotures présente une réponse en fluorescence aberrante, avec une intensité à 617 nm beaucoup plus importante que sur les autres échantillons (Figure 105-b), malgré un taux d'azotures plus faible. Il est alors **possible que du fluorochrome libre soit présent dans la solution de protéines marquées**, et ait diffusé dans les pores du matériau. En effet, avec un taux d'azotures plus faible, il y a des pores non fonctionnalisés NHS qui sont directement accessibles pour la diffusion du fluorochrome libre, tandis que les pores fonctionnalisés NHS seraient localement bouchés par les protéines greffées, comme illustré en Figure 106.



Ce phénomène n'empêche pas une réponse normale des autres échantillons, avec une intensité d'émission des fluorochromes qui évolue globalement de façon linéaire avec le taux d'azotures. Que ce soit pour 5%, 10% ou 17,5%, la signature des deux fluorochromes correspond à une accroche des protéines et des anticorps de façon homogène, comme le traduit l'image « *merge* » qui est la superposition des deux signatures (Figure 105-a). Cependant, les intensités d'émission des fluorochromes sont plus faibles pour 5% que pour 10% d'azotures, avec une intensité d'émission équivalente entre les deux fluorochromes (Figure 105-b). Ceci permet de montrer, grâce à la relation ci-dessous, démontrée en Annexe 15.2, qu'il y a 4 fois plus de protéines que d'anticorps, et un anticorps peut donc être lié à plusieurs protéines, et certaines protéines peuvent être sans anticorps.

$$\frac{I_{\text{accepteur}}}{I_{\text{donneur}}} = \left[ \frac{\varphi_{(AF594)} \varepsilon_{(AF594)} \cdot DOL(G_{AF594})}{\varphi_{(AF488)} \varepsilon_{(AF488)} \cdot DOL(Ac_{AF488})} \right] \times \frac{N_G}{N_{Ac}} \approx 4 \times \frac{N_G}{N_{Ac}} \quad (\text{équation 5})$$

En revanche pour 17,5% d'azotures, la signature des deux fluorochromes est supérieure à celle pour 5% et 10% d'azotures, et l'intensité du fluorochrome AF488 marquant l'anticorps est supérieure à celle du fluorochrome AF594 marquant la protéine G. Cela sous-entend alors un nombre d'anticorps greffés plus important pour 17,5% d'azotures par rapport aux échantillons avec 5% et 10% d'azotures. Néanmoins, d'après les données AFM, le greffage des protéines non marquées ne se fait pas de façon homogène sur cet échantillon (Figure 102-d), suggérant que le greffage des protéines marquées ne serait pas non plus optimal (d'après Figure 90-b). Pour l'échantillon avec 17,5% d'azotures, des anticorps pourraient alors être présents en surface de l'échantillon, sans pour autant être fixés sur des protéines G. Ce phénomène est observable sur la superposition (« *merge* ») de l'échantillon Az17,5%, par une signature du fluorochrome AF488 plus présente au centre des microplots (Figure 105-a).

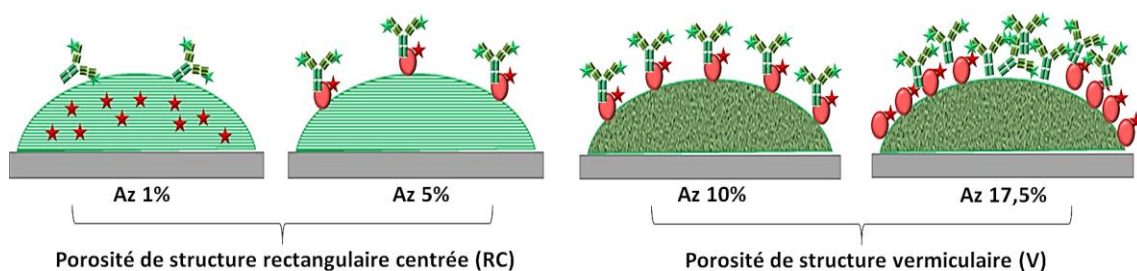


Figure 106 – Illustration des résultats obtenus par le biais de la microscopie confocale

Ainsi, bien que l'intensité de fluorescence soit maximale pour l'échantillon Az17,5%, l'accroche des anticorps ne se fait pas de façon contrôlée et reproductible. En revanche, l'échantillon avec 10% d'azotures et de structuration vermiculaire présente une bonne répartition des protéines G et des anticorps en surface des microplots. De plus, dans ces conditions, les intensités d'émission des deux



**fluorochromes sont du même ordre de grandeur, ce qui semble judicieux en vue d'étudier la variation de signature en fluorescence, c'est-à-dire l'effet FRET.**

### III.5.5. Conclusions sur la biofonctionnalisation des échantillons mésoporeux

En vue d'optimiser le greffage des protéines G et des anticorps sur les microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisés, différentes techniques complémentaires ont été utilisées : la microscopie à force atomique (AFM), la spectroscopie infrarouge en transmission et en ATR, la spectroscopie Raman et la microscopie confocale.

**En premier lieu, les conditions des protocoles de marquage et de greffage de ces biomolécules ont été étudiées.** En effet, le protocole de biofonctionnalisation (cf. Annexe 9) avait été établi par défaut, sans vérifier que les valeurs de concentration en biomolécules et de temps d'incubation ne soient établies comme conditions optimales. La démonstration a été faite en ce qui concerne le protocole de greffage des protéines G, où les conditions sont donc optimales, pour un greffage homogène et maximum, comme souhaité pour l'application finale en tant que sonde de diagnostic.

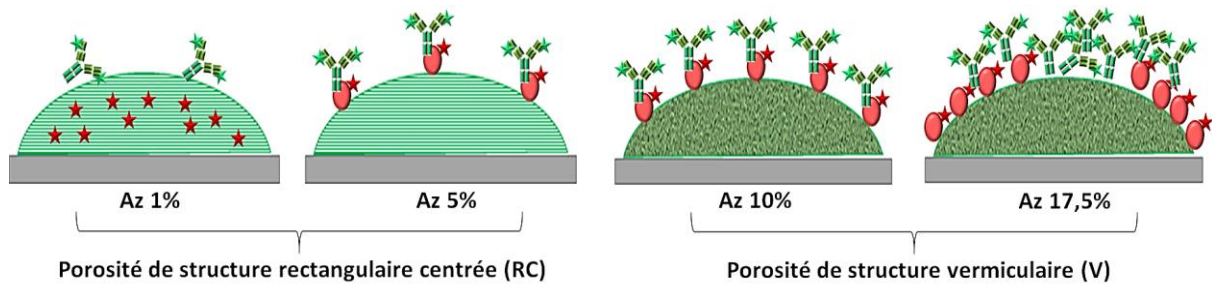
En spectroscopie, **la signature des protéines a pu être acquise grâce à l'infrarouge en mode ATR et également en spectroscopie Raman.** Ceci a permis d'isoler les bandes majoritaires de la protéine, afin de l'identifier par la suite. Différentes conditions matériaux ont été testées, afin d'estimer par traitement de données et de façon semi-quantitative les conditions matériaux jugées optimales pour le greffage des protéines. En complément de l'AFM et de la microscopie confocale, cela a permis de mieux comprendre le comportement des protéines vis-à-vis du matériau. **En effet, les protéines se greffent mieux lorsque la mésoporosité de surface est de type vermiculaire plutôt que rectangulaire centrée.**

Par ailleurs, des échantillons avec différents taux d'azotures et une mésoporosité de type vermiculaire ont été testés, à savoir 10% et 17,5% d'azotures. Les résultats ont permis de montrer que le greffage des protéines est inhomogène pour 17,5% d'azotures, ce qui est très probablement lié à une co-condensation des molécules d'AzPTES entre elles (comme vu au chapitre II), donnant lieu à des zones plus riches en fonctions azotures et d'autres zones qui en seraient dépourvues. **Les protéines sont en revanche greffées de façon homogène sur les échantillons avec 10% d'azotures, bien qu'en plus faible quantité par rapport à 17,5% d'azotures.** Il serait intéressant de voir ce que donnerait un taux d'azotures de 15%, qui donnerait a priori un greffage de protéines similaire aux conditions des échantillons avec 10% d'azotures (comportement en RMN plus proche du sol Az10% que du sol Az17,5%).

**Le greffage des anticorps a été étudié par microscopie confocale,** puisque les techniques de spectroscopie ne permettaient pas de mesurer la signature spécifique des anticorps. **Les résultats ont montré que le greffage des anticorps est dépendant du**



**greffage des protéines** (Figure 107). En effet, bien qu'en plus grande quantité, les anticorps semblent greffés de façon non homogène sur les échantillons avec 17,5% d'azotures. **Pour les échantillons avec 10% d'azotures, le greffage semble homogène, d'après la signature en microscopie confocale, avec une bonne superposition des réponses des deux fluorochromes marquant les deux biomolécules.** Enfin, l'échantillon avec 5% d'azotures présente aussi une réponse en fluorescence homogène mais de plus faible intensité par rapport aux échantillons avec 10% d'azotures. Là encore, il serait intéressant de voir la réponse d'un échantillon avec 15% d'azotures, qui devrait présenter une intensité supérieure à celle des échantillons Az10%, tout en permettant un greffage homogène.



*Figure 107 – Illustration des résultats obtenus par le biais de la microscopie confocale*

**La suite de l'étude concerne la phase de transfert sur fibres optiques de l'intégralité du procédé, allant de l'impression des microplots jusqu'à la détection du signal de fluorescence.**





### III.6. Vers un dispositif préindustriel pour la détection par voie fibrée

La phase de transfert du procédé sur fibres optiques va permettre de fonctionnaliser les fibres optiques d'une manière analogue à ce qui a été réalisé sur lamelles de verre en passant par les différentes étapes d'impression des microplots, de réaction *click* et de biofonctionnalisation. Aussi, les étapes de lavage, de *click* du pentynoate de NHS et de greffage des protéines G et anticorps nécessiteront d'ajuster les protocoles de préparation, au vu de l'encombrement des fibres optiques par rapport aux lamelles de verre ou aux wafers de silicium utilisés précédemment. Les méthodes de caractérisation devront également être adaptées à ce type de support.

Cette étude devra démontrer la viabilité du dispositif de récupération du signal optique développé par la société Kamax Innovative System, *i.e.* permettre d'obtenir une signature fiable et reproductible des cellules analysées (saines ou tumorales). Si nécessaire, des pistes d'améliorations seront proposées pour atteindre cet objectif.

#### III.6.1. Validation du dispositif développé pour l'excitation et la récupération du signal de fluorescence

Le dispositif développé (Figure 108) permet l'excitation et la récupération du signal de fluorescence. Ce signal doit renseigner sur la présence ou non de cellules cancéreuses lors d'une mise en contact *in situ* avec des tissus biologiques. Pour cela, le dispositif est composé d'une source laser (553 nm dans le cas du diagnostic) dont le signal optique est filtré (filtre bande étroite) puis injecté jusqu'en bout de fibre. Le faisceau d'émission peut ainsi interagir avec les fluorochromes marquant les biomolécules greffées sur les microplots, en bout de fibre. **Le signal réémis par les fluorochromes est récupéré par la fibre, et acheminé optiquement jusqu'à un analyseur spectral pour acquérir la réponse en fluorescence.** Une interface logicielle permet de visualiser les spectres sur un écran d'ordinateur. Il est également possible de réaliser une mesure de blanc, afin de soustraire la signature intrinsèque de la fibre, ainsi qu'une éventuelle réémission du laser qui ne serait pas filtrée.

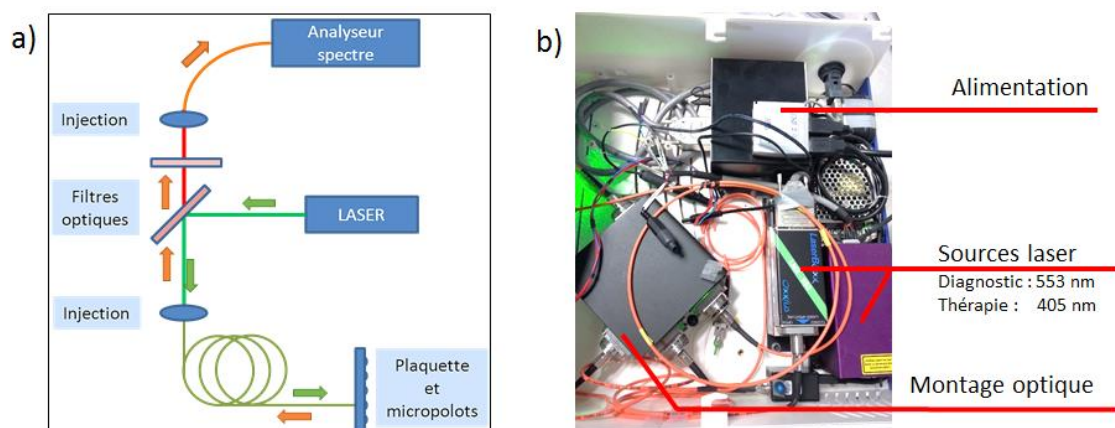


Figure 108 – Schéma de principe du dispositif (a) et prototype réalisé (b)



Des tests préliminaires ont visé à **valider le montage optique**, en vérifiant la réponse optique obtenue sur des échantillons de référence, à savoir des microplots de 5 couches avec 10% d'azotures, déposés sur lamelles de verre et biofonctionnalisés. Le montage optique utilisé avec le prototype est un **montage dit « fibre-lamelle »** qui consiste à approcher une fibre vierge au contact optique de la lamelle à analyser, ce qui requiert de monter les lamelles de verre ronde sur des lames de microscopie (Figure 109).

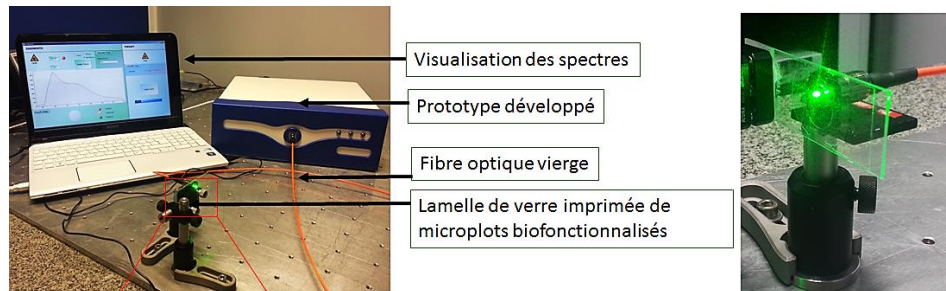


Figure 109 – Utilisation du dispositif en montage « fibre-lamelle »

Lorsqu'elles sont marquées, les biomolécules ont respectivement un DOL de 1,66 pour la protéine G marquée par le fluorochrome AF594 et un DOL de 1,76 pour l'anticorps anti-TrkB marqué par le fluorochrome AF546. Le spectre de fluorescence est obtenu après prise de blanc, pour une excitation laser d'une puissance de 20 mW, correspondant à un diamètre du spot lumineux d'environ 1 mm, et avec un temps d'intégration de 500 ms. Ces analyses ont permis de **confirmer la réponse obtenue pour un échantillon greffé de protéines G marquées par le fluorochrome AF594**, avec un maximum d'émission présent à 617 nm, qui correspond bien à la longueur d'onde d'émission maximum du fluorochrome (Figure 110-a). **La réponse obtenue pour un échantillon greffé de protéines non marquées et d'anticorps marqués par le fluorochrome AF546 est également validée**, avec un maximum d'émission présent à 573 nm, correspondant à la longueur d'onde maximum du fluorochrome (Figure 110-b).

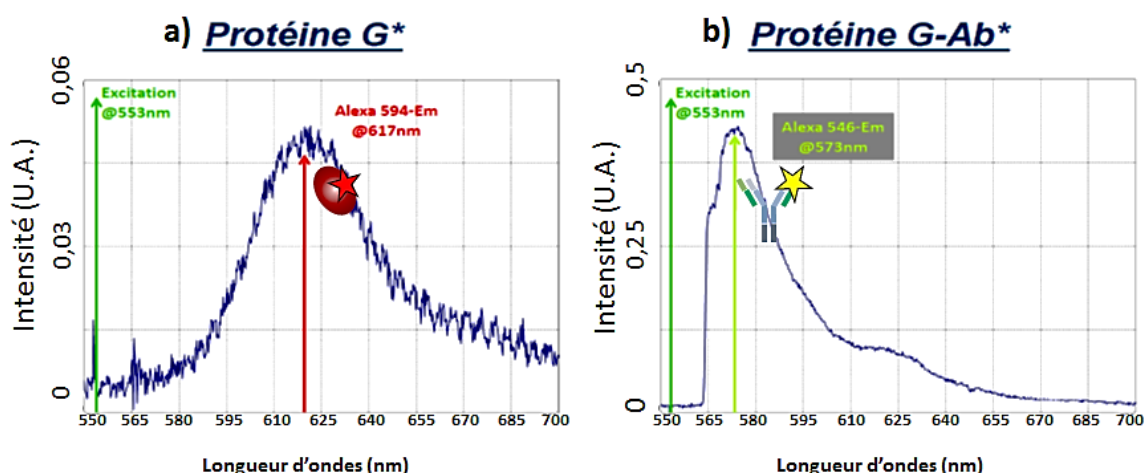


Figure 110 – Réponse optique obtenue avec le prototype pour une lamelle fonctionnalisée par des protéines marquées AF594 (a) ou des protéines non marquées et des anticorps marqués AF546 (b)



Il est possible de remarquer que malgré un DOL similaire, la réponse de l'échantillon avec uniquement des protéines G marquées AF594 présente une intensité bien plus faible ( $I_{617nm} = 0,05$ ) que celle de l'échantillon avec des anticorps marqués AF546 greffés sur des protéines non marquées ( $I_{573nm} = 0,40$ ). En effet, ces fluorochromes présentent des coefficients d'extinctions molaires proches, respectivement de  $104\ 000\ \text{cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$  pour le fluorochrome AF546 et de  $73\ 000\ \text{cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$  pour le fluorochrome AF594 [44]. De plus, leurs rendements quantiques, traduisant la capacité d'un fluorochrome à réémettre un photon absorbé, sont de 0,66 pour le fluorochrome AF594 et de 0,79 pour le fluorochrome AF546 [42].

Il est possible de penser que l'intensité plus forte pour l'échantillon avec des protéines non marquées et des anticorps marqués AF546 ( $I_{573nm} = 0,40$ ) pourrait s'expliquer par le fait que **les anticorps sont fixés en plus grand nombre sur des protéines non marquées**. En effet, cette intensité est bien moindre ( $I_{573nm} = 0,12$ ) pour un échantillon greffé avec des protéines G marquées AF594 et des anticorps marqués AF546 (Figure 111-a). Il a d'ailleurs été montré que les protéines G non marquées se greffent en plus grande densité que des protéines marquées (d'après Figure 87, p. 138 et Figure 90, p. 141), qui explique alors un plus grand nombre d'anticorps lorsque les protéines ne sont pas marquées.

Le montage « fibre-lamelle » a de nouveau été testé dans le cas de deux échantillons préalablement greffés dans les mêmes conditions, avec des protéines G marquées AF594 et des anticorps anti-TrkB marqués AF546. L'un des deux échantillons a été mis en présence de BSA, une protéine non spécifique (Figure 111-a), et l'autre échantillon en présence de l'antigène spécifique TrkB (Figure 111-b). **Ce test permet alors de vérifier que le dispositif détecte spécifiquement les marqueurs cancéreux TrkB, cibles de l'anticorps anti-TrkB.**

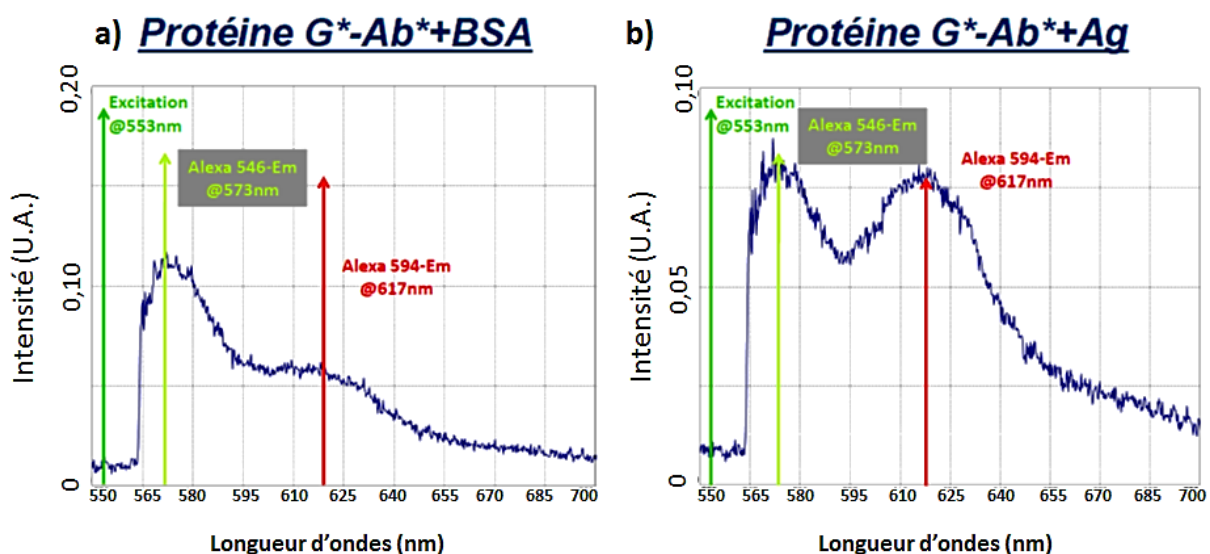


Figure 111 – Réponse optique obtenue avec le prototype pour une lamelle fonctionnalisée par des protéines marquées AF594 et des anticorps marqués AF546, mis au contact d'une protéine non spécifique (a) et du marqueur tumoral TrkB (b)



Les résultats montrent ainsi un changement de la signature en fluorescence. En effet, en présence d'une protéine non spécifique, la signature présente des intensités d'émission respectivement de  $I_{573nm} = 0,12$  et  $I_{617nm} = 0,06$ . En revanche, en présence de l'antigène TrkB, les intensités d'émission sont de  $I_{573nm} = 0,08$  et  $I_{617nm} = 0,08$ . **Il y a donc une diminution de l'intensité d'émission du fluorochrome donneur AF546 et une augmentation de celle du fluorochrome accepteur AF594, lors de l'interaction de l'anticorps avec l'antigène TrkB. Ceci montre qu'il y a, dans ce dernier cas, un transfert d'énergie de FRET, et valide indirectement que les antigènes ont été détectés par les anticorps.**

Par la suite, il sera nécessaire de pouvoir quantifier ce transfert d'énergie de FRET de façon relative, afin de pouvoir comparer l'efficacité du transfert de FRET pour différentes conditions de biofonctionnalisation, comme différentes conditions de DOL par exemple. Pour cela, il est alors possible d'introduire la notion de **sensibilité de détection**, qui se définit comme un facteur de qualité, sous la forme suivante :

$$Sensibilité (S) = \frac{\left( \frac{I_{accepteur}}{I_{donneur}} \right)_{Après\ contact}}{\left( \frac{I_{accepteur}}{I_{donneur}} \right)_{Avant\ contact}} = \frac{\left( \frac{I_{617}}{I_{573}} \right)_{Contact}}{\left( \frac{I_{617}}{I_{573}} \right)_{Ref}} \quad (\text{équation 6})$$

La sensibilité traduit ainsi la variation relative d'intensité du système, en faisant le rapport de l'intensité de l'accepteur sur l'intensité du donneur, après mise en contact avec la BSA ou l'antigène, et de normaliser ce rapport par la même quantité avant contact. Un effet FRET marqué se traduit alors par une augmentation importante du rapport des intensités après contact, et permet d'obtenir une forte valeur de sensibilité. **S'il n'y a pas d'antigènes détectés par les anticorps, le signal de fluorescence est inchangé et la valeur de sensibilité vaut alors 1.** Dans leurs travaux, Ko et Grant [45] étudient l'inverse (au sens mathématique) de la sensibilité, ce qui revient à observer la diminution de cette quantité pour témoigner de l'activité FRET, et ils considèrent par ailleurs plutôt l'aire des bandes au lieu du maximum d'intensité.

**Ainsi, dans les conditions utilisées, la valeur de sensibilité est de 2,0 pour le système testé, à savoir des microplots de 5 couches avec 10% d'azotures, déposés selon un réseau hexagonal avec un écartement entre plots de 40  $\mu\text{m}$ , fonctionnalisés selon le nouveau protocole de *click* (Protocole N°3, Figure 76, page 119), et marqués par des protéines G avec un DOL de 1,66 et des anticorps anti-TrkB avec un DOL de 1,76.**

Dans les études antérieures [23], **la valeur de sensibilité était également d'environ 2,0** pour le système considéré, à savoir des microplots de 5 couches avec 10% d'azotures, déposés selon un **réseau carré** avec un écartement de 40  $\mu\text{m}$ , clickés avec l'ancien protocole de *click* (Protocole N°1, Figure 76 en page 119), et marqués avec des **protéines G ayant un DOL d'environ 1,5 et des anticorps anti-TrkB avec un DOL supérieur d'environ 2.**



### III.6.2. Adaptation des protocoles pour la préparation des fibres et montages annexes

Le procédé doit être adapté sur fibres afin de pouvoir transférer les résultats précédemment montrés lors de cette étude. En effet, les fibres optiques utilisées présentent un encombrement beaucoup plus important par rapport aux autres types de substrats précédemment utilisés, comme les lamelles de verre (environ 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) ou les wafers de silicium (environ 600-700  $\mu\text{m}$  d'épaisseur). De plus, le maniement des fibres est délicat, car elles peuvent casser si elles sont trop courbées.

#### III.6.2.1. Impression jet d'encre de microplots sur fibres optiques

Les fibres ont été préalablement polies afin d'avoir un très bon état de surface, avec très peu d'aspérités. L'étude précédente [23] avait mis en évidence la faisabilité d'imprimer sur des faisceaux multi-fibres (37 fibres de 125  $\mu\text{m}$  par sonde), avec un seul microplot par fibre, ce qui est cependant très chronophage pour l'opérateur, qui doit repérer manuellement la position de chaque fibre avant impression.

**Les fibres utilisées pour la présente étude sont des fibres monocoeurs d'un diamètre de 800  $\mu\text{m}$ .** Des microplots sont imprimés à leur surface (une trentaine de microplots par fibre), soit de façon continue (Figure 112-b) avec dépôt de microplots également sur la férule métallique mais qui ne participent pas à la réponse optique, soit de façon localisée, ce qui demande un repérage précis pour une bonne impression du motif (Figure 112-c). **Pour garantir une densité constante de microplots sur la fibre, et dans un souci d'efficacité, l'impression continue a été privilégiée.**

Un montage adaptatif a été fabriqué (Figure 112-a) conjointement avec les sociétés Ceradrop®, Kamax Innovative System et par les techniciens de l'atelier de l'IRCER, afin d'insérer et maintenir les fibres en position sur le support d'impression. Des logements dédiés et des vis de maintien permettent l'ajustement de la position en Z des fibres, et de garantir une distance constante (ou distance de travail) entre la surface imprimée de la fibre et la tête d'impression. Un bâti métallique permet d'accueillir le reste de la fibre et assure qu'elles ne bougent pas durant l'impression.

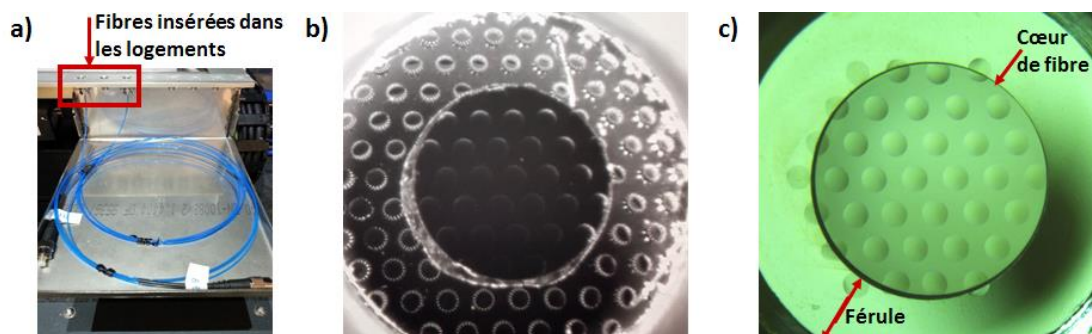


Figure 112 – Montage adaptatif fixé sur le support d'impression du Ceraprinter (a) permettant d'imprimer des microplots sur des fibres optiques en continu (b) ou seulement sur le cœur de fibre (c)



La qualité des impressions peut être vérifiée en cours d'impression, avant dépôt de la couche N+1, grâce à la caméra embarquée sur le support des têtes d'impression, ce qui permet notamment de vérifier que le nombre de couches déposées est correct (Figure 112-b). Les fibres ont aussi été observées grâce à une caméra optique (Figure 112-c) afin de suivre l'intégrité des microplots au cours des différents traitements.

**Une fois l'impression réalisée, les microplots déposés sur les fibres sont consolidés selon le même protocole que précédemment, à savoir un traitement thermique en étuve avec un palier de 2 jours à 130 °C.** Pour cela, les parties plastiques protégeant les extrémités des fibres sont retirées. Une fois la consolidation terminée, les fibres peuvent alors subir les étapes de lavage de la porosité et de *click* du pentynoate de NHS.

### III.6.2.2. Lavage de la porosité et *click* du pentynoate de NHS

Les protocoles de lavage de la porosité et de *click* du pentynoate de NHS doivent également être adaptés du fait de l'encombrement des fibres. Pour cela, la surface imprimée des fibres est immergée dans la solution. **Le protocole de lavage de la porosité se fait alors toujours en bain marie à 50 °C avec de l'éthanol technique** (Figure 113-a & Figure 113-b). **Une faible agitation de la solution peut être utilisée, comme pour l'étape de *click* du pentynoate de NHS**, afin de garder les molécules en suspension, et éviter la formation de précipités qui pourraient nuire à la fonctionnalisation des fibres (Figure 113-c & Figure 113-d).

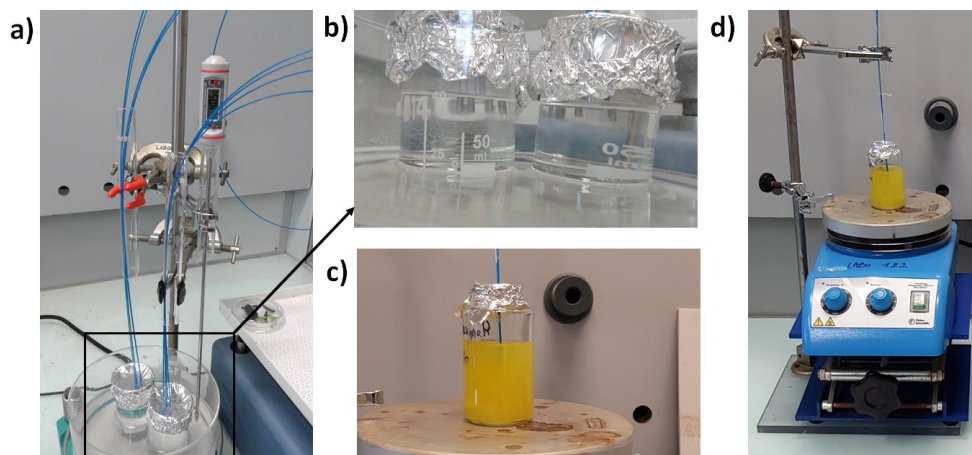


Figure 113 – Adaptation des protocoles de lavage de la porosité (a) (b) et de *click* (c) (d) sur fibres

### III.6.2.3. Biofonctionnalisations : montage plaque à puits et fonctionnalisation en goutte

De façon analogue à la réaction *click* sur fibres, la biofonctionnalisation des fibres doit permettre de mettre en contact la surface des fibres avec la solution de protéines G marquées et d'anticorps marqués, les volumes utilisés étant très faibles (environ 300  $\mu$ L par fibre). Pour cela, **la société Dyameo a fait réaliser un montage par impression 3D** (Figure 114-a).



Le montage permet de biofonctionnaliser les fibres par immersion (Figure 114-a), en traitant simultanément 12 à 36 fibres en même temps, et la plaque 96 puits utilisée est un consommable jetable. Cela s'avère alors très efficace pour réduire le temps de manipulation des fibres, notamment pour les étapes intermédiaires de lavage du protocole de biofonctionnalisation. Un autre mode de biofonctionnalisation, dit « en goutte » (Figure 114-b), permet de déposer un faible volume de solution de protéines marquées ou d'anticorps marqués, réduisant ainsi le volume et donc les coûts de cette étape, ce qui est un énorme avantage en considérant le prix des kits de marquage.

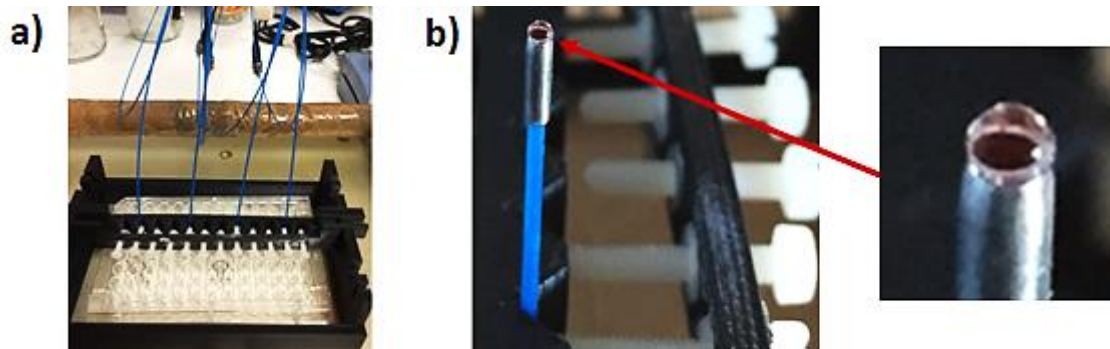


Figure 114 – Biofonctionnalisations des fibres par immersion dans la solution (a) ou biofonctionnalisation « en goutte » (b)

**Les protocoles de préparation des échantillons ont ainsi été adaptés pour la préparation de fibres optiques, sans trop dévier des conditions initialement utilisées pour les échantillons de microplots déposés sur lamelles de verre ou sur wafers de silicium. Le montage réalisé dans ce but, constitue un avantage considérable pour la préparation d'un grand nombre de fibres en série, en vue de l'industrialisation du procédé de fabrication.**

### III.6.3. Ajustement des techniques utilisées pour la caractérisation des fibres fonctionnalisées

Comme pour les protocoles de fabrication, les techniques d'analyse doivent être ajustées pour la caractérisation des microplots déposés sur ces fibres optiques.

L'ajustement de l'impression jet d'encre de microplots sur des fibres optiques peut avoir une influence sur les mécanismes d'auto-assemblage du matériau, et donc sur l'organisation de la porosité du matériau. Ceci peut être dû, d'une part, à la plus faible densité de gouttes déposées sur une fibre par rapport aux lamelles. D'autre part, les fibres optiques sont également composées d'un verre de silice, mais celui-ci est de nature chimique différente de celle des lamelles de verre. Ceci peut alors se traduire par des interactions différentes lors de l'auto-assemblage par EISA, pour des gouttes de sol déposées par jet d'encre sur la fibre.



**La méthode d'observation MET pour des éclats de microplots a pu être mise en œuvre sur les fibres, en grattant des microplots de la fibre et en les déposant sur une grille d'observation.** Cette analyse a permis de montrer que la structuration ne semble pas différente sur fibres par rapport aux résultats obtenus sur lamelles de verre (pour des conditions standards d'une impression continue de microplots de 5 couches, imprimés suivant un réseau hexagonal avec un espacement entre plots de 40  $\mu\text{m}$ ). **En effet, il a été observé que des microplots imprimés sur fibre avec 1% d'AzPTES possèdent bien une porosité de type rectangulaire centrée. De façon analogue, des microplots imprimés sur fibre avec 10% d'AzPTES présentent majoritairement une porosité de type vermiculaire, avec une très faible proportion de phase rectangulaire centrée.**

Au niveau des caractérisations par spectroscopie, il a fallu adapter la technique de mesure sur fibres. En effet, il n'était pas possible d'utiliser la spectroscopie infrarouge en transmission. **Des analyses Raman ont été possibles pour caractériser des fibres après impression (sans fluorochrome), avec une source laser à 532 nm.** Les spectres obtenus (Figure 115-a) **laissent apparaître des bandes qui coïncident avec les bandes observables sur des microplots déposés sur lamelles de verre ou encore sur wafers de silicium** (Figure 115-b). Cependant, une forte luminescence est observable lors des caractérisations avec les fibres, due très probablement à la composition chimique du verre qui les compose.

Une fois les fibres biofonctionnalisées avec des biomolécules marquées par des fluorochromes, la caractérisation de ces fibres n'était pas possible avec une longueur d'onde d'excitation de 532 nm ou même de 785 nm, à cause des fluorochromes utilisés. Des tests ont été réalisés avec une longueur d'onde de 488 nm, car cela avait précédemment permis d'obtenir une signature pour les échantillons réalisés sur lamelles de verre. **Néanmoins, il n'a pas été possible d'obtenir des spectres corrects avec la longueur d'onde 488 nm, en raison d'une très forte luminescence, liée à la nature des fibres optiques utilisées.**

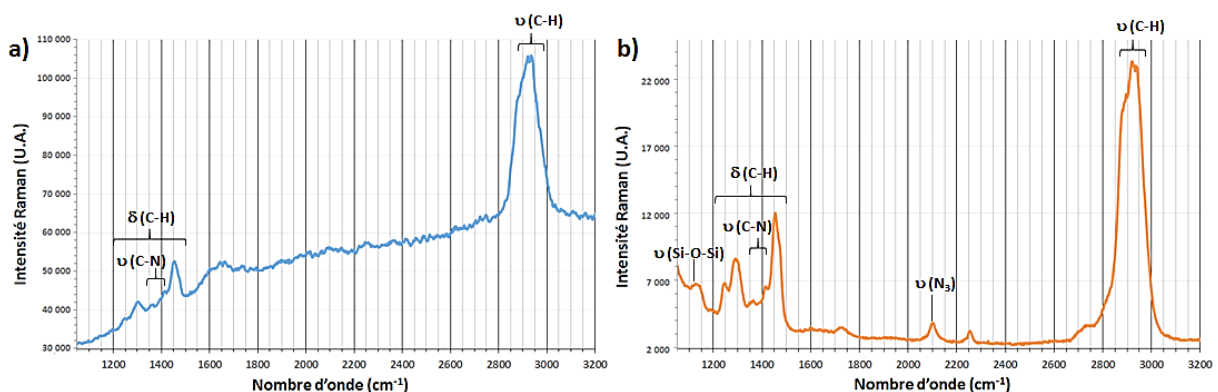


Figure 115 – Caractérisation Raman à 532 nm et spectres bruts obtenus pour des réseaux de microplots réalisés avec une encre Az17,5% : sur une fibre optique (a) ou sur un wafer de silicium (b)





La technique de spectroscopie ATR a également été mise en œuvre (Figure 116), et permet d'obtenir une signature proche de celle trouvée par infrarouge en transmission (hormis pour les bandes azotures à  $2100\text{ cm}^{-1}$ , atténuées par le diamant ATR). La technique par ATR présente des limitations fortes, à savoir qu'elle n'est ni quantitative, ni semi-quantitative, car les intensités de bandes dépendent du contact des microplots sur la fibre avec le diamant ATR. Aussi, la forte pression appliquée est destructive pour les microplots de silice mésoporeuse.

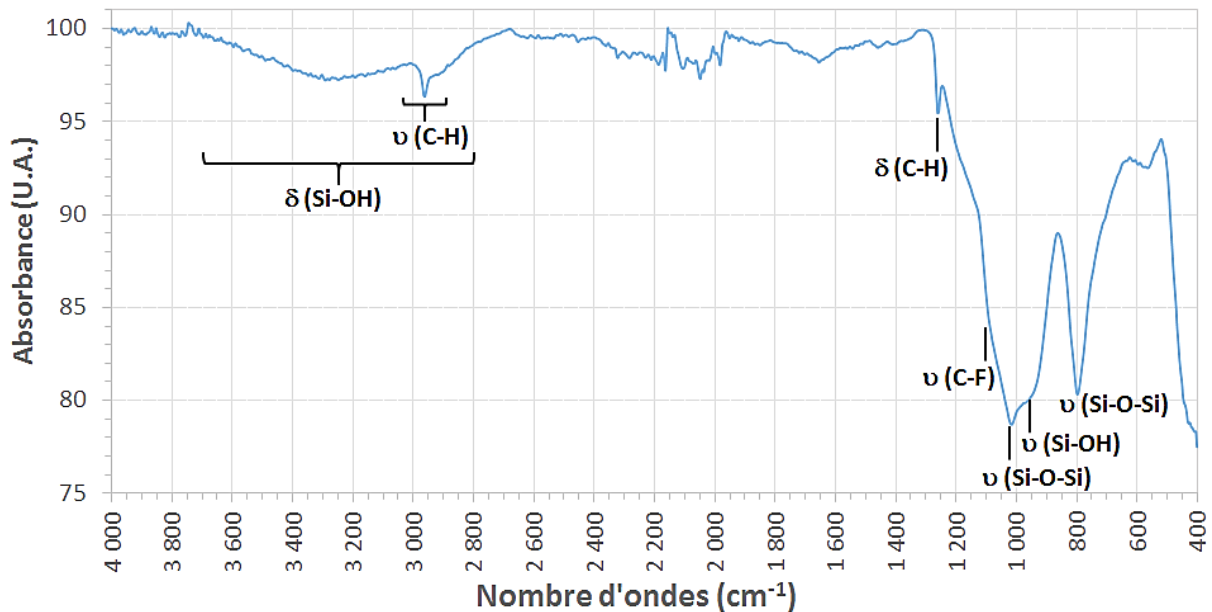


Figure 116 – Spectre infrarouge obtenu par caractérisation ATR d'une fibre Az17,5% de référence

Enfin, en ce qui concerne les caractérisations AFM, un montage adaptatif a été réalisé pour des observations sur des fibres biofonctionnalisées (Figure 117). Cette méthode de caractérisation pourra être envisagée par la suite, en utilisant le mode *tapping* afin de ne pas endommager les biomolécules greffées sur les microplots des fibres optiques.

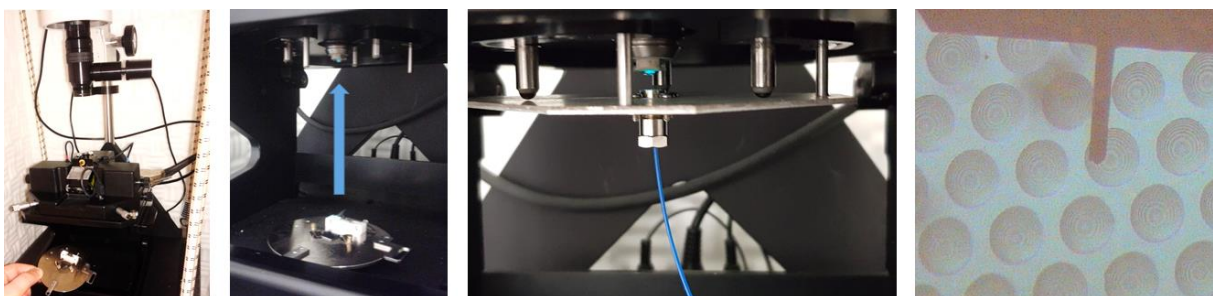


Figure 117 – Montage adaptatif développé pour la caractérisation par AFM de fibres optiques



### III.6.4. Détection de cancers *in situ* sur différents modèles vivants ou prélèvements

L'ajustement des protocoles et des méthodes de caractérisation sur fibres ont globalement permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence majeure par rapport aux résultats démontrés sur lamelles de verre. Les microplots déposés sur fibre ont été biofonctionnalisés avec des protéines G marquées avec le fluorochrome AF594 et des anticorps marqués avec le fluorochrome AF546. **La signature des deux fluorochromes a été détectée grâce au prototype de récupération du signal développé, ce qui a ensuite permis d'étudier la réponse en détection, lors du contact avec des marqueurs cancéreux, et ceci pour différents modèles vivants (Figure 118).**

**Un premier modèle vivant est utilisé, à savoir le modèle de membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de poulet, qui consiste à cultiver des œufs de poulets fécondés, en dehors de leur coquille (*ex ovo*). L'incubation de l'œuf à 37 °C entraîne le développement embryonnaire du poulet, ainsi que l'apparition de vaisseaux sanguins. Après 7 jours de développement, la membrane est suffisamment vascularisée pour permettre l'implantation de cellules cancéreuses, aboutissant à l'apparition d'une tumeur de 1 à 2 mm. Les tests de détection sont réalisés 2 jours après greffe des cellules cancéreuses, en approchant les fibres fonctionnalisées au contact de la tumeur (*in situ*). Différentes souches de cellules cancéreuses ont été testées, comme la souche **HCT 116 (cancer colorectal)** ou encore **HEK TrkB+**, qui sont des cellules souches du rein, modifiées pour surexprimer le marqueur TrkB.**

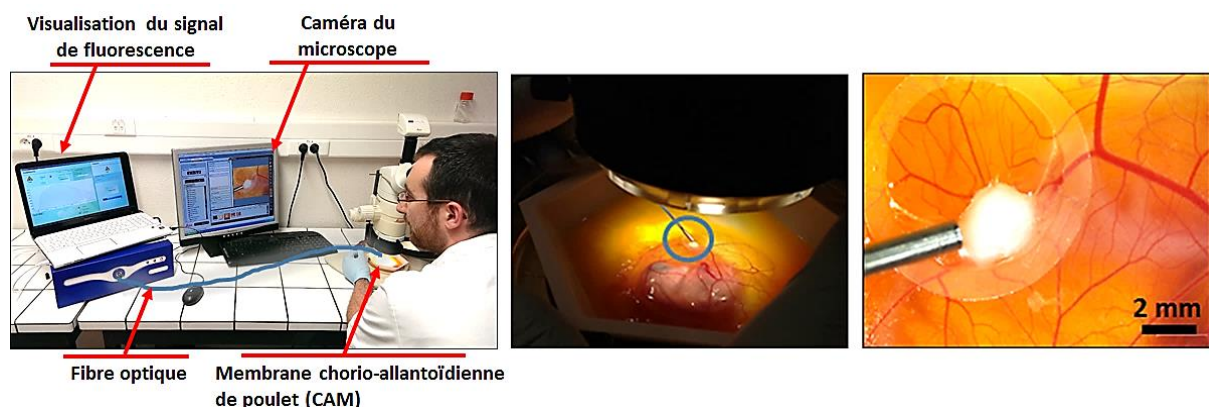


Figure 118 – Modèle vivant utilisé pour le diagnostic *in situ* : membrane chorio-allantoïdienne (CAM) d'un embryon de poulet, sur laquelle a été implantée une tumeur cancéreuse

#### III.6.4.1. Tests réalisés sur un modèle vivant *in situ* : modèle CAM de poulet

Les principaux résultats obtenus sur le modèle de CAM de poulet sont présentés ci-après, avec des exemples de spectres obtenus (Figure 119) et les résultats des tests (Tableau 22) avec la sensibilité de détection calculée (définie par l'équation 6 ci-dessous).

$$Sensibilité (S) = \frac{\left( \frac{I_{accepteur}}{I_{donneur}} \Big|_{Après\ contact} \right)}{\left( \frac{I_{accepteur}}{I_{donneur}} \Big|_{Avant\ contact} \right)} = \frac{\left( \frac{I_{617}}{I_{573}} \Big|_{Contact} \right)}{\left( \frac{I_{617}}{I_{573}} \Big|_{Ref} \right)} \quad (\text{équation 6})$$



Les fibres ont été préparées avec un sol contenant 10% d'azotures, pour des microplots de 1 ou 5 couches, imprimés selon un réseau hexagonal avec un espacement entre plots (E) de 25 µm pour maximiser le nombre de plots sur la fibre, et pour une humidité relative (HR) de 45 ou 60%. Le DOL de la protéine G marquée AF594 est d'environ 2 et le DOL de l'anticorps anti-TrkB marqué AF546 est d'environ 5. Les spectres sont obtenus avec une longueur d'onde d'excitation de 553 nm, une puissance de 80 mW/mm<sup>2</sup> et un temps d'intégration de 300 ms.

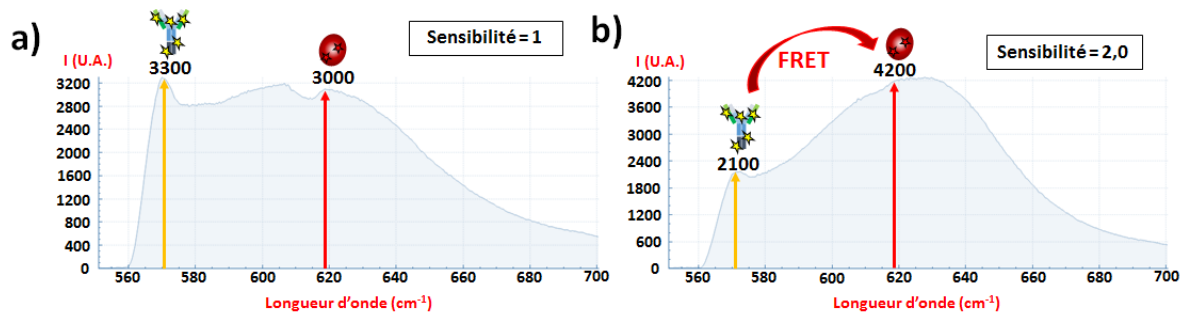


Figure 119 – Spectres obtenus lors du contact de la sonde B12 avec un œuf sain servant de référence (a), puis après contact avec une tumeur de souche HCT116 (b)

La fibre B12 a été mise au contact d'un œuf sain pour acquérir le signal de référence. Elle a ensuite été lavée puis mise en contact avec une tumeur de souche HCT 116. **Le changement de signature en fluorescence observé (Figure 119-b) témoigne du transfert d'énergie par effet FRET et de la détection du marqueur TrkB avec une sensibilité de 2,0 pour cette configuration.** Ceci est visible à la fois par la diminution de l'intensité d'émission du fluorochrome donneur (-36%) ainsi que par l'augmentation d'intensité d'émission du fluorochrome accepteur (+40%).

Cependant, **après détection des marqueurs cancéreux TrkB, il est possible qu'il y ait décrochage de certains complexes de protéines et d'anticorps lors du retrait de la sonde**, comme cela a été observé en acquérant le spectre après retrait, une diminution des intensités est observée. **Ceci permet de conclure un résultat important pour l'utilisation des sondes, qui est qu'après utilisation, les fibres optiques déjà mises en contact avec des tumeurs ne sont pas réutilisables. Néanmoins, les fibres semblent réutilisables tant qu'elles n'ont pas été en contact avec des zones cancéreuses.**

La fibre B11 est une fibre doublon de la fibre B12 (Tableau 22). **Cette fibre B11 a été mise en contact avec la masse tumorale issue de cellules HEK TrkB+, donnant une valeur de sensibilité mesurée de 2,3 contre 2,0 pour la lignée de cellules HCT 116 (cancer colorectal).** Par la suite, il faudra inclure dans le protocole de recherche de mesurer le degré d'expression du récepteur TrkB au niveau des masses tumorales testées, car ce degré d'expression du marqueur peut influencer la sensibilité de détection. Ces indicateurs permettront également de conclure de façon plus précise sur l'efficacité de détection du dispositif, qui peut varier en fonction du type de cellules cancéreuses en présence.



Tableau 22 – Synthèse des résultats des tests réalisés avec les fibres sur le modèle CAM de poulet

Condition d'impression	Fibre et numéro d'essai / toucher	Souche tumorale	Intensité mesurée à 573 nm	Intensité mesurée à 617 nm	Sensibilité S
5 couches E = 25 µm HR = 45%	Fibre B12 – 1	Œuf sain	3300	3000	1
	Fibre B12 – 2	HCT 116	2100	4200	2.0
	Fibre B11 – 1	Hek TrkB+	3000	7000	2.3
1 couche E = 25 µm HR = 60%	Fibre B07 – 1	Œuf sain	3000	7300	1
	Fibre B07 – 2	HCT 116	3000	8600	1.2
1 couche E = 25 µm HR = 45%	Fibre B09 – 1	Œuf sain	3000	7300	1
	Fibre B09 - 2	HCT 116	2000	8000	1.6
	Fibre B10 – 1	Hek TrkB+	3000	9000	1.2

Les valeurs de sensibilité des fibres B11 et B12, ayant une sensibilité de détection de 2,3 sur des cellules Hek TrkB+ et de 2,0 sur des cellules HCT 116 (cancer colorectal) constituent des résultats très encourageants. Le changement de signature témoigne bien du transfert d'énergie de FRET sur ces fibres, constituées de microplots de 5 couches.

Des fibres ayant des microplots de 1 couche ont aussi été testées pour détecter les tumeurs cancéreuses de lignée cellulaire HCT 116 ou Hek TrkB+ (Tableau 22). Cependant, dans ces conditions, bien que l'effet FRET soit observé, notamment par l'augmentation d'intensité du fluorochrome accepteur, les sensibilités mesurées sont beaucoup plus faibles, entre 1,2 et 1,6.

Les tests réalisés durant cette campagne montrent alors que la sensibilité de détection du dispositif est meilleure pour des fibres ayant des microplots de 5 couches (sensibilité de 2,0 et 2,3) par rapport à des fibres ayant des microplots de 1 couche (sensibilité de 1,2 et 1,6). Cette différence pourrait s'expliquer par un greffage différent des protéines G. En effet, l'intensité à 617 nm est plus élevée pour les fibres ayant 1 couche (7300 au lieu de 3000 pour des microplots de 5 couches), ce qui **laisse à penser qu'il y a davantage de protéines G greffées sur les microplots de 1 couche**. Par ailleurs, l'intensité à 573 nm



est du même ordre de grandeur (environ 3000) entre les fibres ayant des microplots de 1 ou 5 couches, ce qui laisse penser qu'il y a autant d'anticorps pour ces deux configurations.

Il est alors possible de penser que la faible sensibilité obtenue sur les fibres de 1 couche s'explique par des protéines G qui ne participent pas à l'effet FRET (Figure 120), et qui sont probablement sous forme d'amas, en raison d'une structure de la porosité de type rectangulaire centrée sur les plots de 1 couche.

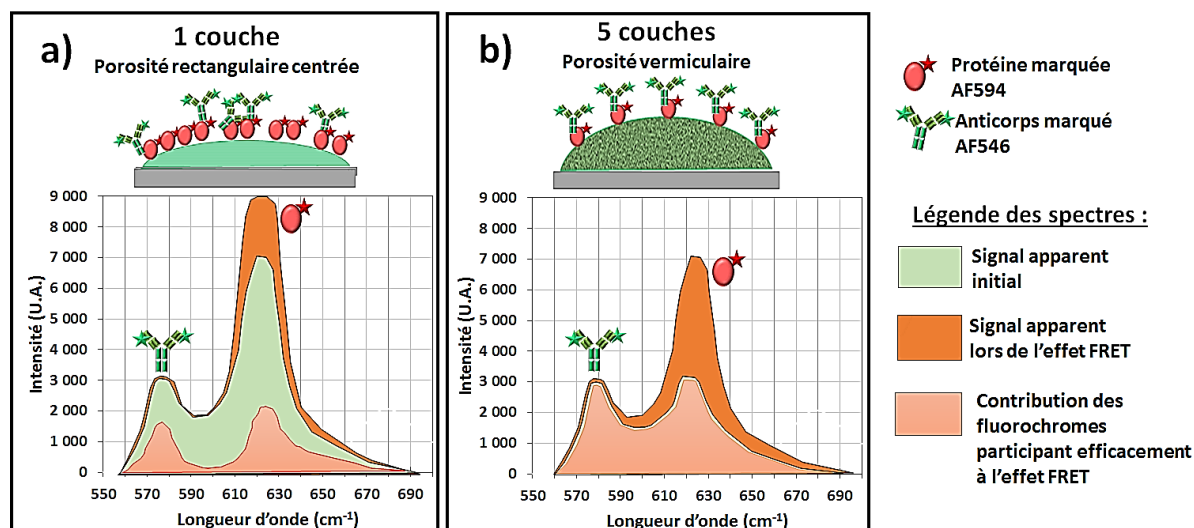


Figure 120 – Schéma expliquant les différences entre des fibres de 1 couche (a) et 5 couches (b)

### III.6.4.2. Autres campagnes réalisées et voies d'amélioration du dispositif

Suite à ces résultats très positifs sur des fibres ayant des microplots de 5 couches, de multiples campagnes de tests avaient été réalisées pour étudier l'influence de paramètres matériaux (notamment le taux d'azotures et la structure de la porosité du matériau) sur la sensibilité de détection du dispositif. Les tests devaient également permettre d'étudier la sensibilité de détection par rapport aux différents types de lignées cellulaires, et voir si le principe de détection est plus indiqué pour tel ou tel cas de cancers. Ceci aurait également permis de reconfirmer les résultats obtenus, et consolider la reproductibilité des mesures.

**Pourtant, ces nombreuses campagnes de tests, notamment des expérimentations sur des prélèvements de patients, ont permis de mettre en lumière des problèmes jusqu'alors inconnus, ainsi que des voies d'amélioration possibles, concernant les conditions d'excitation et de récupération du signal :**

- Après contact et lors du retrait de la fibre, la réponse en fluorescence est plus faible, signe que des biomolécules ont pu être arrachées de la sonde. De plus, la partie de la fibre imprimée de plots doit être bien en contact avec la surface à analyser.
- Il est possible que la surface organique éclairée participe au signal de fluorescence récupéré, en lien avec une probable fluorescence des tissus en question. Il est donc



important de réaliser des mesures de vérification avec une fibre vierge, pour vérifier cette absence de fluorescence des tissus, et le cas échéant de pouvoir enlever cette contribution sur le signal de fluorescence analysé.

- Les fibres possèdent une auto-fluorescence importante. Un épaulement a été observé autour de 610 nm sur les spectres. Une étude a pu montrer qu'il s'agissait d'un déplacement de l'auto-fluorescence, qui résulte du traitement de consolidation en étuve. Ce problème pourra être levé en utilisant des fibres non traitées thermiquement, et des embouts de fibres qui seront imprimés avec des microplots puis biofonctionnalisés et assemblés sur la fibre au dernier moment (juste avant de réaliser les tests de détection).
- Les spectres donnaient initialement des bandes très larges. Un effort a été apporté au niveau du détecteur spectral du prototype afin d'obtenir des bandes spectrales mieux résolues. Par la suite, le traitement des données, avec notamment la soustraction de la réponse de la fibre (soustraction de ligne de base) est amélioré. Cependant, des pics de réflexion du laser ont parfois été observés, ce qui traduit que le laser est potentiellement d'une puissance trop forte.

**Des améliorations sont donc nécessaires du point de vue du dispositif et de la méthode de récupération du signal, ainsi que sur l'optimisation de la méthode de détection, à savoir l'effet FRET.**

Par la suite, différents couples de fluorochromes ont été étudiés afin d'optimiser la détection du dispositif.



### III.6.5. Recherche d'une optimisation de la sensibilité de détection du dispositif

La sensibilité de détection est maximale quand le transfert d'intensité du fluorochrome donneur au fluorochrome accepteur est maximal. Afin d'améliorer la sensibilité de détection par effet FRET, différents couples de fluorochromes ont été étudiés.

#### III.6.5.1. Couples de fluorochromes utilisés et données de fluorescence

Trois couples donneur-accepteur d'Alexa Fluor (AF) ont été retenus pour optimiser la détection par effet FRET : les couples **AF488-AF594**, **AF546-AF594** et **AF594-AF647**. Des données relatives à ces fluorochromes sont récapitulées au Tableau 23 et au Tableau 24.

#### Pour être un bon candidat pour l'effet FRET, les fluorochromes utilisés doivent :

- Avoir un **coefficient d'extinction élevé** (capacité à absorber les photons) et un **rendement quantique élevé** (capacité à réémettre un photon absorbé), afin d'avoir ainsi une **brillance élevée**.
- **L'intégrale de recouvrement J doit être importante**. C'est l'aire de recouvrement de la bande d'émission du donneur avec la bande d'absorption de l'accepteur. L'estimation du calcul de cette intégrale est détaillée en Annexe 15.3.
- **La valeur  $R_0$  du couple doit être adaptée aux dimensions du système** : le transfert de FRET est initié quand les fluorochromes sont distants de  $R < 1,8 \times R_0$ .

Tableau 23 – Données de fluorescence des fluorochromes utilisés [42], [44]

Alexa Fluor	Absorption (nm)	Emission (nm)	Couleur	Coefficient d'extinction $\epsilon$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	Rendement quantique $\phi$	Brillance
AF 488	495	519	Vert	71 000	0,92	65 320
AF 546	556	573	Orange	104 000	0,79	82 160
AF 594	590	617	Rouge	73 000	0,66	48 180
AF 647	650	665	Rouge lointain	239 000	0,33	78 870

Tableau 24 – Données de FRET pour les couples de fluorochromes utilisés [46]

Couple de fluorochromes Donneur – Accepteur	Valeur $R_0$ (Å)	$1,8 \times R_0$ (nm)	Intégrale de recouvrement J
AF488 – AF594	60	10,8	2008
AF546 – AF594	71	12,8	3449
AF594 – AF647	85	15,3	2442



### III.6.5.2. Test préliminaire avec le couple de fluorochromes AF594-AF647

Un test préliminaire avec le couple AF594-AF647 a été réalisé avec des échantillons de microplots préparés sur lamelles de verre et fonctionnalisés avec des protéines marquées AF594 ( $DOL(G_{AF594}) = 4$ ) et des anticorps marqués AF647 ( $DOL(AC_{AF647}) = 9$ ). Ces échantillons ont été caractérisés avec le prototype en montage « fibre-lamelle » (Figure 121-a), avec un échantillon de référence et un échantillon mis en contact avec des antigènes TrkB.

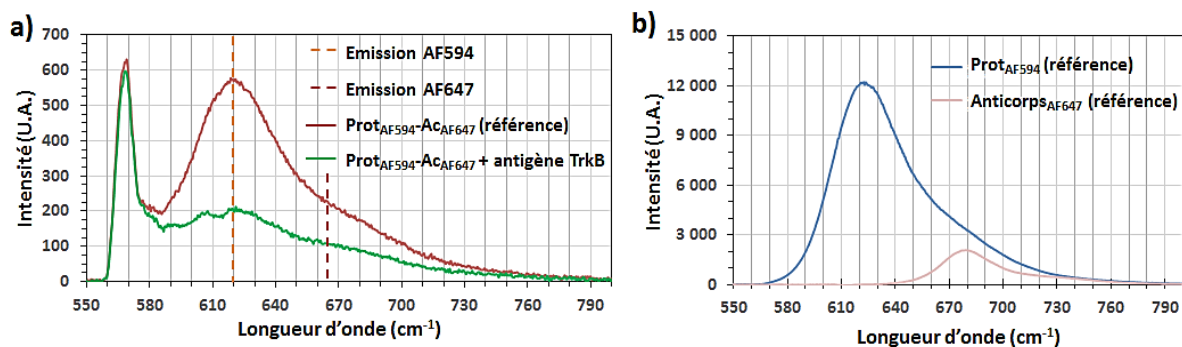


Figure 121 – Spectres obtenus en montage fibre-lamelle sur échantillons lamelles de verre biofonctionnalisés (a) et contrôle de la solution de protéines marquées AF594 et de la solution d'anticorps marqués AF647 en fluorimétrie en voie liquide (b)

Les spectres obtenus laissent apparaître le pied du laser autour de 570 nm, qui est un problème déjà signalé au paragraphe précédent. La bande d'intensité d'émission du fluorochrome donneur (AF594) est bien visible à 617 nm. En revanche celle du fluorochrome accepteur (AF647) n'est pas clairement visible à 665 nm. Ceci s'explique par le fait que la bande d'émission de l'accepteur (AF647) est faible et n'est que très peu visible en présence de celle du donneur, malgré un taux de marquage des anticorps plus élevé que celui des protéines, comme le montrent les intensités observées en fluorimétrie en voie liquide (Figure 121-b). De plus, malgré une intégrale de recouvrement  $J$  d'une valeur acceptable pour ce couple (d'après Tableau 24), le fluorochrome AF647 a un très faible rendement quantique par rapport aux autres fluorochromes, ce qui expliquerait la faible intensité observée et un épaulement très peu marqué pour l'émission du fluorochrome AF647 (Figure 121-a).

Pour l'échantillon qui a été mis en présence de l'antigène TrkB, **il y a une diminution de l'intensité du donneur (AF594) mais pas d'augmentation notable de l'intensité du fluorochrome accepteur (AF647)**. Dans ces conditions, **il n'est alors pas possible de confirmer avec certitude la présence d'un transfert d'énergie par effet FRET, autrement que par la seule diminution d'intensité du fluorochrome donneur**. Néanmoins il ne s'agit pas des mêmes échantillons et **cette diminution d'intensité peut être imputée à d'autres phénomènes** (greffage des biomolécules différent entre les deux échantillons, casse plus importante pour l'échantillon mis en contact avec l'antigène, etc.).





De plus, la valeur  $R_0$  du rayon de Förster de ce couple est la plus élevée parmi les 3 couples de fluorochromes envisagés (Tableau 24), ce qui implique qu'il est moins spécifique et pourrait entraîner un transfert de FRET même en l'absence d'antigène, comme cela sera explicité par la suite.

**En raison du faible rendement quantique du fluorochrome AF647 et du risque de détection de faux-positifs, le couple de fluorochromes AF594-AF647 a donc été rejeté.** Les deux autres couples sont alors étudiés en voie liquide pour réaliser des tests FRET.

### III.6.5.3. Comparaison des couples AF488-AF594 et AF546-AF594 en voie liquide

Les couples de fluorochromes AF488-AF594 et AF546-AF594 ont été testés en voie liquide en spectrofluorimétrie. La voie liquide a été retenue pour s'affranchir des différences induites par un greffage différent des protéines en surface des échantillons, et le greffage des anticorps sur les protéines est censé être favorisé en solution.

Dans ce but, les solutions préparées sont des solutions de protéines G marquées avec le fluorochrome AF594 et des anticorps anti-TrkB marqués avec le fluorochrome AF546 ou bien AF488. Les taux de marquages (DOL) sont respectivement :  $DOL(G_{AF594}) = 1,6$  et  $DOL(Ac_{AF546}) = 4,6$  pour le couple AF546-AF594, et  $DOL(G_{AF594}) = 1,3$  et  $DOL(Ac_{AF488}) = 3,7$  pour le couple AF488-AF594. Pour rester proche des conditions utilisées pour la biofonctionnalisation, la solution mesurée en fluorimétrie possède une concentration en protéines de 150  $\mu\text{g/mL}$  et une concentration en anticorps de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

La solution de référence a été mesurée avant puis après ajout de l'antigène TrkB. La solution avec le couple AF488-AF594 est excitée à une longueur d'onde de 488 nm et la solution avec le couple AF546-AF594 est excitée à une longueur d'onde de 532 nm. Les résultats sont présentés en Figure 122 et une modification de la signature en fluorescence est observée pour les deux couples, après ajout de l'antigène TrkB.

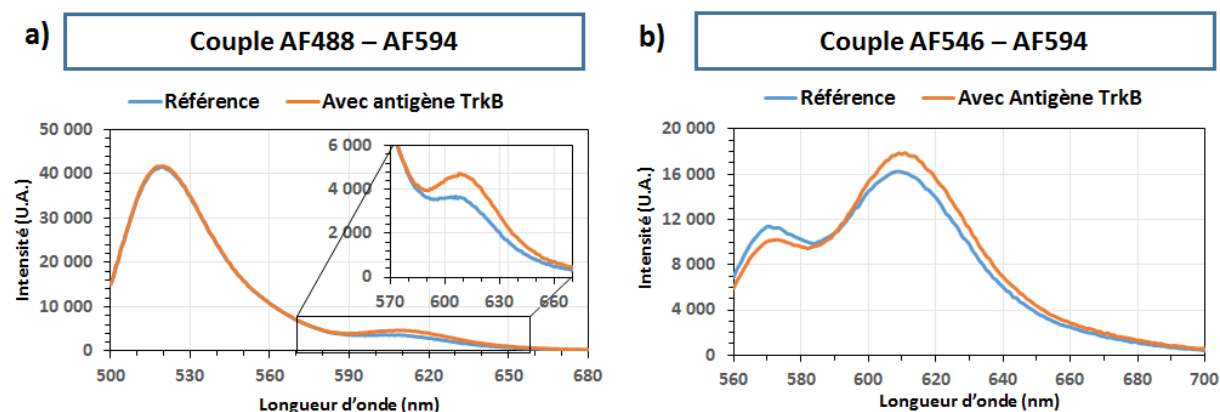


Figure 122 – Signature par fluorimétrie en voie liquide, avant et après contact avec l'antigène TrkB, dans le cas du couple AF488-AF594 (a) et du couple AF546-AF594 (b)



**Pour le couple AF488-AF594** (Figure 122-a), malgré la faible intensité d'émission du fluorochrome accepteur (AF594) à 617 nm, une augmentation d'intensité d'environ +30% est constatée, mais il n'y a pas de diminution significative de l'intensité d'émission du fluorochrome donneur (AF488) à 519 nm. Ceci peut amener à se demander s'il y a bien eu un transfert d'énergie de FRET ou bien si cette différence d'intensité de l'accepteur est liée à une variation locale de concentration au moment de la mesure.

**Pour le couple AF546-AF594** (Figure 122-b), une diminution de l'intensité d'émission du fluorochrome donneur (AF546) d'environ -13% est observée à 573 nm, ainsi qu'une augmentation d'intensité d'émission du fluorochrome accepteur (AF594) d'environ +12% à 617 nm, ce qui **confirme la présence d'un effet FRET pour le couple AF546-AF594**. Il est cependant surprenant de ne pas voir un effet FRET plus marqué que dans le cas des résultats obtenus sur modèle vivant (Figure 119). Par ailleurs, en se basant sur les valeurs de concentrations en protéines et en anticorps, ainsi que sur les valeurs respectives de DOL, il y aurait environ deux fois plus de fluorochromes AF546 que de fluorochromes AF594 (d'après l'équation 5 page 157, démontrée en Annexe 15.2). De plus, la brillance du fluorochrome AF546 est environ deux fois plus élevée que celle du fluorochrome AF594 (Tableau 23). De ce fait, **le spectre de référence devrait faire figurer une intensité d'émission du fluorochrome AF546 quatre fois supérieure à celle du fluorochrome AF594, or ce n'est pas le cas.**

**La seule explication de ces résultats serait la possibilité qu'il y ait un effet FRET déjà présent au niveau du système en solution, avant même l'ajout de l'antigène TrkB.** Cette possibilité a d'ailleurs été évoquée dans les travaux de Ko et Grant [45], comme étant liée au mouvement brownien des biomolécules en solution, qui déclencherait le transfert d'énergie de FRET lorsque celles-ci sont proches. Cependant, la seule agitation moléculaire liée au mouvement brownien ne suffit pas à expliquer le faible effet FRET observé en Figure 122. En effet, du fait de l'agitation en solution, l'accroche des anticorps sur les protéines est censée être favorisée, par rapport au cas d'échantillons de microplots de silice mésoporeuse, pour lesquels les protéines sont immobilisées en surface. Il est alors fort possible que le greffage des anticorps sur les protéines se fasse plus rapidement en solution.

La présence de l'effet FRET avant ajout de l'antigène suggère que les fluorochromes sont déjà en condition de FRET, c'est-à-dire à une distance l'un de l'autre qui permet le transfert d'énergie. **La distance entre les fluorochromes est liée à la position de chaque fluorochrome sur la protéine et l'anticorps, et dépend également de la position de la protéine par rapport à l'anticorps, donc de leur condition d'accroche.**



Une hypothèse pour expliquer l'effet FRET obtenu en voie liquide en l'absence d'antigène serait liée au greffage entre les protéines et les anticorps.

### III.6.5.4. Etude des conditions de marquage des fluorochromes sur les biomolécules et des conditions d'accroche entre les protéines et les anticorps

Au niveau des biomolécules et concernant les sites possibles pour le marquage des fluorochromes, il est à rappeler que les Alexa Fluor utilisés sont fonctionnalisés NHS et doivent donc se fixer sur les fonctions amines ( $\text{NH}_2$ ) des biomolécules. **La séquence peptidique de la protéine G inclut des acides aminés de type lysine avec des fonctions amines, qui peuvent cependant se situer n'importe où au niveau de la protéine.**

Pour l'anticorps, les fonctions amines sont situées à l'extrémité du fragment spécifique (région variable des chaînes légère et lourde), autour du site de détection de l'antigène (Figure 123). Il est cependant possible, en fonction du séquençage de l'anticorps, que des résidus lysines soient aussi présents sur la région constante de la chaîne légère [47].

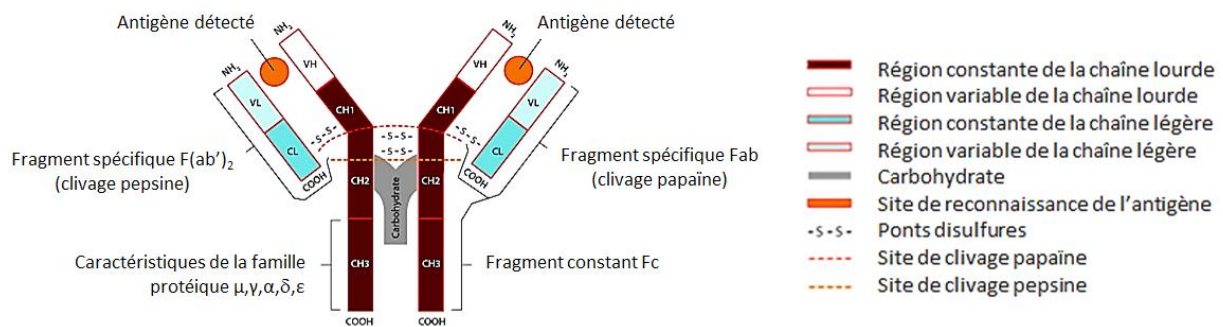


Figure 123 – Structure chimique d'un anticorps [43]

En ce qui concerne les conditions d'accroche entre la protéine et l'anticorps, l'anticorps peut se fixer d'ordinaire sur la protéine de façon non-covalente au moyen de son fragment Fab' ou  $\text{F(ab')}_2$  [48], [49] (Figure 123), comme c'est probablement le cas pour la voie liquide. Cependant, sous certaines conditions, il est aussi possible que l'anticorps se fixe par son fragment Fc sur la protéine G [50]–[52], grâce aux groupements carboxyliques (COOH) en bout du fragment Fc qui interagissent avec les groupements amines ( $\text{NH}_2$ ) de la protéine. Cela donne alors lieu à deux configurations possibles pour l'accroche des anticorps et des protéines (Figure 124).

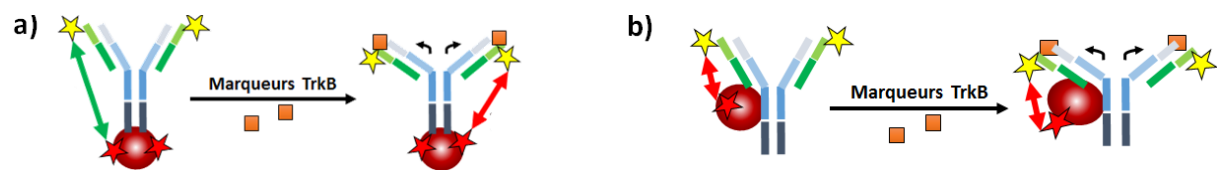


Figure 124 – Deux configurations pour le greffage des protéines sur les anticorps : en bout du fragment constant de la chaîne lourde (a) ou en bout du fragment spécifique de la chaîne légère (b)



Les conditions d'accroche des biomolécules influencent la distance entre les fluorochromes (Figure 124), ce qui peut donc avoir un rôle sur le transfert par effet FRET. Ceci est caractérisé par le rayon de Förster  $R_0$  du couple, qui est la distance correspondant à une efficacité de transfert de FRET de 50%. Ce paramètre  $R_0$  caractérise également la précision et le caractère sélectif de l'effet FRET mis en avant :

- **Plus la valeur de  $R_0$  est faible, plus les fluorochromes doivent être proches pour qu'il y ait un transfert par effet FRET. Le système est donc plus sélectif,** mais le transfert d'énergie peut être de moindre intensité.
- **A contrario, si la valeur de  $R_0$  est élevée, les fluorochromes pourront réaliser davantage de transfert d'énergie, mais présenterait le risque d'avoir davantage de faux-positifs,** c'est-à-dire une réponse par effet FRET en l'absence des antigènes cancéreux du fait de la proximité des fluorochromes.

De plus, **les anticorps ont généralement des dimensions d'environ 14,2 x 8,5 x 4,0 nm** [47], [53], tandis que **les protéines G ont des tailles d'environ 4,2 x 4,0 x 3,5 nm** [34], [35]. La valeur de  $R_0$  est respectivement de 60 Å soit 6,0 nm pour le couple AF488-AF594 et de 71 Å soit 7,1 nm pour le couple AF546-AF594 (Tableau 24) [46].

Dans ces conditions, **il est alors possible qu'un greffage de protéines au niveau du fragment  $F(ab')_2$ , occasionne un effet FRET en l'absence d'antigène**, comme illustré en Figure 125-a. En voie liquide, les biomolécules ont plus de mobilité et cette configuration serait privilégiée. Par la suite, c'est cette configuration d'accroche des biomolécules qui **explique le faible effet FRET observé en voie liquide pour les deux couples lors de l'ajout de l'antigène TrkB** (Figure 122).

Cependant, si les protéines sont greffées en bout du fragment Fc de l'anticorps, par interaction entre les groupements carboxyliques des anticorps avec les groupements amines des protéines, la distance entre les fluorochromes serait supérieure et **il y aurait moins de risque qu'un effet FRET soit présent en situation initiale, c'est-à-dire en l'absence d'antigène**, comme illustré en Figure 125-b.

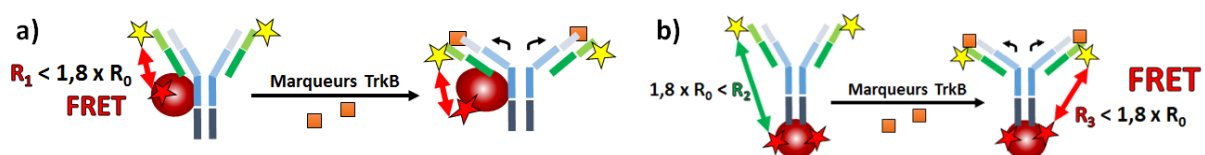


Figure 125 – Influence des conditions d'accroche des protéines avec les anticorps sur la présence d'un effet FRET initialement (a) ou qui se déclencherait uniquement lors de la détection de l'antigène (b)

Il faut alors s'intéresser au greffage des anticorps sur les protéines dans le cas des réseaux de microplots fonctionnalisés, afin de savoir quelle est la configuration d'accroche.



### III.6.5.5. Etude de l'orientation des anticorps en surface des réseaux de microplots

Il est intuitif de penser que l'accroche des anticorps sur les protéines dépend de la répartition de celles-ci en surface des microplots, comme ce que semblaient d'ailleurs montrer les résultats précédemment obtenus (§III.5.4, page 155).

Au niveau des microplots, **lorsque les protéines sont bien dispersées en surface et de façon homogène, comme c'est le cas pour des microplots de 5 couches avec 10% d'azotures** (Figure 102, page 154), **il est possible que les anticorps soient en position « debout »** [47], [54], **ce qui expliquerait une détection optimale**, comme observée dans le cas des tests de détection sur modèle CAM avec des fibres Az10% de 5 couches (Figure 119). En effet, dans ces conditions, la structuration de la porosité est vermiculaire et les protéines sont greffées de façon homogène.

En revanche, lorsque la structuration est rectangulaire centrée (*i.e.* pour de faible taux d'azotures ou de faibles nombres de couches d'après le chapitre II), ou bien pour 17,5% d'azotures, **les protéines forment des amas et il est possible de trouver des anticorps qui seraient vus en position « sur le côté »** [47]. Cette position expliquerait une mauvaise détection des antigènes, avec au moins un des sites de détection non-accessible aux antigènes. **Cette hypothèse expliquerait alors les résultats décevants obtenus sur fibres pour des microplots de 1 couche, dont la porosité de surface est de structure rectangulaire centrée** (Figure 120). Cette position des anticorps « de côté » a aussi été observée par AFM pour des échantillons avec 17,5% d'azotures qui présentaient des amas de protéines (Figure 126).

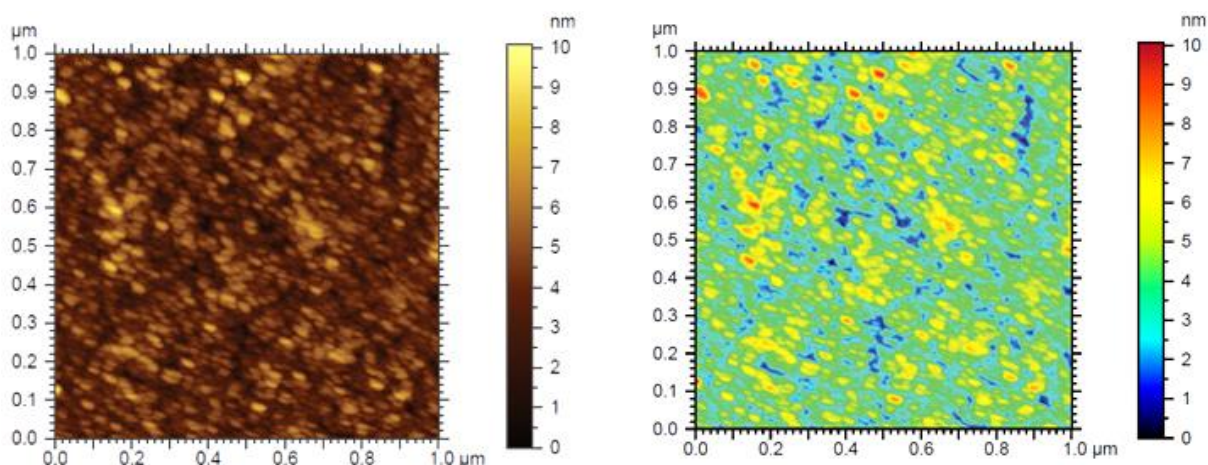


Figure 126 – Image AFM d'un échantillon Az17,5% de 5 couches greffé de protéines et d'anticorps

Sur cette image AFM, les anticorps sont visibles très rarement lorsque la rugosité est supérieure à environ 7 nm, et toutes les entités présentes font maximum 10 nm de hauteur, alors que des anticorps en position « debout » auraient une hauteur théorique de 11 nm en



l'absence de protéines [53]–[55]. Ce positionnement des anticorps « de côté » malgré la présence des protéines G a été identifié et est déjà connu dans la littérature [47].

**Les résultats précédemment établis semblent donc bien confirmer que les anticorps ont une bonne orientation « debout » si les protéines sont réparties de façon uniforme et sans agrégat en surface des microplots.** Par la suite, la bonne orientation des anticorps rend accessibles les sites de détection de l'antigène et devrait permettre de maximiser la sensibilité de détection du dispositif.

### III.6.5.6. Conclusions sur les tests avec différents couples de fluorochromes

En conclusion, les tests réalisés en voie liquide par spectrofluorimétrie ont permis de **mettre en évidence qu'il y a bien un effet FRET obtenu par mise en présence de l'antigène TrkB, pour les deux couples de fluorochromes AF488-AF594 et AF546-AF594. Cependant, cet effet FRET est moindre et indique qu'en voie liquide les fluorochromes sont déjà en partie en position de FRET avant mise en contact avec l'antigène.** Ceci tend à montrer que les protéines et les anticorps se greffent alors différemment en voie liquide, par rapport à la voie supportée où les protéines sont bien dispersées et de façon homogène sur les microplots. **Les échantillons qui présentent un mauvais greffage de protéines ou bien des amas de protéines tendraient alors systématiquement vers un mauvais greffage des anticorps, qui seraient orientés en « position couchée ».** Ceci résulterait en une mauvaise détection des antigènes, du fait de sites de détection non-accessibles, ainsi que de la possibilité d'avoir un effet « faux FRET » présent initialement, avant ajout de l'antigène.

**De plus, il semble que les couples de fluorochromes AF546-AF594 et AF488-AF594 soient tous deux adaptés pour réaliser des tests de détection par effet FRET avec les protéines et anticorps utilisés.** Le couple AF488-AF594 possède une valeur de  $R_0$  inférieure au couple AF546-AF594 (respectivement de 6,0 nm et 7,1 nm) et serait donc encore plus sélectif du point de vue de l'application finale, afin d'éviter au maximum la présence de faux positifs. D'autre part, le fluorochrome AF488 est très intéressant en raison de son rendement quantique élevé (0,92). Aussi, la source laser utilisée avec le couple AF488-AF594 permet de solliciter surtout le fluorochrome donneur, sans induire de fluorescence intense par rapport au fluorochrome accepteur. Ceci permettrait que l'augmentation d'émission du fluorochrome accepteur soit uniquement liée au transfert d'énergie de FRET. Autrement dit, **le couple AF488-AF594 utilisé avec une source d'excitation autour de 488 nm serait pertinent afin d'améliorer la fiabilité de détection, c'est-à-dire la précision du dispositif.**

**Ce couple AF488-AF594 a donc été utilisé pour réaliser des tests supplémentaires de détection.**



### III.6.6. Test du couple de fluorochromes AF488-AF594 sur modèle vivant (souris)

Le couple de fluorochromes AF488-AF594 a été testé *in situ* sur un modèle vivant, à savoir une souris ayant eu une greffe de tumeur. De façon similaire au marqueur TrkB, les cellules cancéreuses expriment à leur surface membranaire davantage de récepteurs cibles des facteurs de croissance épidermique ou EGFR [56], [57]. Pour détecter ce type de récepteur, il est nécessaire d'utiliser des anticorps complémentaires, c'est-à-dire des anticorps anti-EGFR, mais la préparation des échantillons reste similaire. Des microplots de silice mésoporeuse ont été imprimés sur lamelles de verre avec un sol Az10% dans les conditions standards et ont été clickés avec le pentynoate de NHS. Ils ont ensuite été greffés avec des protéines G marquées avec le fluorochrome AF594 ( $DOL(G_{AF594}) = 2$ ), puis avec des anticorps anti-EGFR marqués avec le fluorochrome AF488 ( $DOL(A_{CAF488}) = 3$ ). Les tests ont été réalisés avec des fibres optiques et les spectres ont été obtenus grâce au prototype développé.

Pour ces tests, chaque lamelle a été collée au bout d'une fibre. Une première fibre a été mise au contact d'un tissu sain de la souris pour prendre un spectre de référence. Une seconde fibre a ensuite été mise au contact de la tumeur. Ces conditions sont alors assez proches des conditions opératoires, lors d'une exploration faite par un praticien. Les spectres obtenus sont présentés en Figure 127.

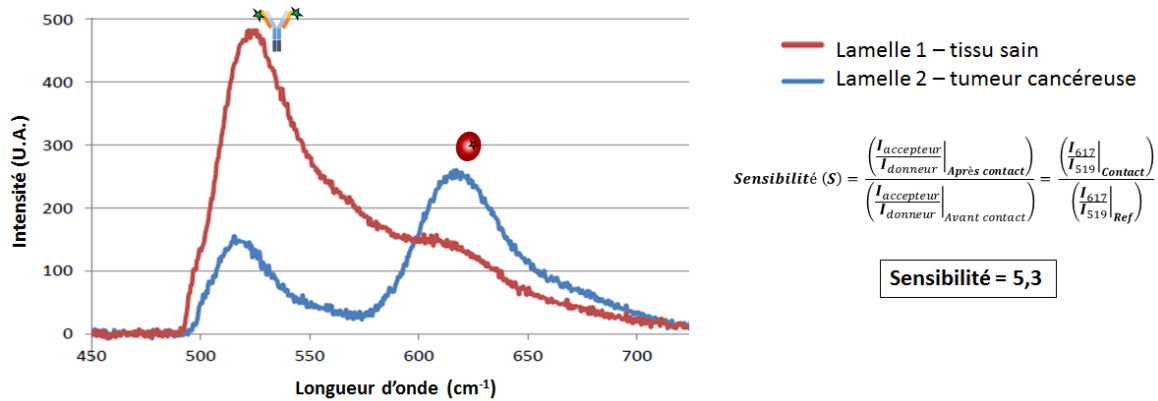


Figure 127 – Spectres de fluorescence obtenus grâce au prototype pour des lamelles collées en bout de fibres, dont l'une a été mise en contact d'un tissu sain et une autre en contact d'une tumeur

Les résultats ainsi obtenus montrent alors le basculement d'intensité, avec une diminution de l'intensité d'émission du fluorochrome donneur (AF488) et une augmentation de l'intensité d'émission du fluorochrome accepteur (AF594). **Ceci traduit alors bien un transfert d'énergie de FRET et la sensibilité mesurée pour cette configuration est de 5,3. La sonde traduit alors indirectement la présence des cellules cancéreuses, reflétée par la surexpression des récepteurs EGFR à la surface de la membrane de ces cellules.** La valeur élevée de sensibilité traduit cette surexpression de façon nette et indiscutable. Cette



valeur de sensibilité est supérieure aux valeurs de sensibilité obtenues pour le récepteur TrkB (sensibilité de 2,0 à 2,3 en fonction du type de tumeur), mais pour pouvoir comparer, il est nécessaire de quantifier l'expression de ces récepteurs, afin de pouvoir normaliser la réponse obtenue. Ces caractérisations, ainsi que des tests sur d'autres types de cellules cancéreuses, pourront être envisagées comme perspectives de ce travail.

Il est possible de noter que les échantillons testés sont différents et auraient donc initialement des réponses optiques différentes. De la même façon, il est possible que l'opérateur, en manipulant la fibre, induise des réponses optiques différentes au niveau de la sonde. **Néanmoins, l'intérêt de travailler avec deux fluorochromes permet de s'affranchir de ces problèmes, car la sensibilité est calculée sous forme de ratios d'intensités, ce qui permet d'une certaine façon de normaliser les spectres et de s'affranchir d'être rigoureusement dans les mêmes conditions optiques.** Ceci se rapprocherait alors des conditions réelles d'utilisation lors d'une exploration par un praticien.

**La détection du récepteur EGFR, surexprimé sur les cellules cancéreuses, a donc été mise en évidence grâce au prototype avec une valeur très prometteuse de sensibilité de 5,3. Différentes perspectives pourront venir consolider ces résultats.**





### III.6.7. Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés ont permis de transposer sur fibres optiques les protocoles de préparation des échantillons. Différentes techniques ont également pu être adaptées pour la caractérisation des microplots déposés sur ces fibres optiques. La porosité du matériau se comporte globalement de façon similaire sur fibres optiques par rapport aux lamelles de verre.

Les tests réalisés ont mis en évidence que **le greffage des protéines se fait de façon plus homogène et régulière pour des microplots de 5 couches avec un taux d'azotures de 10% ayant une structuration vermiculaire**. En dehors de ces conditions, le greffage des protéines se fait beaucoup moins bien, de façon inhomogène sous forme d'amas de protéines. Par la suite **la répartition des protéines influence grandement l'accroche des anticorps et la détection des antigènes**, comme l'ont montré les résultats sur modèle vivant de CAM de poulet : **les fibres avec 10% d'azotures permettent une détection maximale avec des microplots de 5 couches** (structuration vermiculaire) par rapport à des microplots de 1 couche (structuration rectangulaire centrée). **Des tests de greffage d'une protéine G-cystéine peuvent être envisagés**. En effet, cette protéine possède à l'une de ses extrémités un grand nombre de fonctions thiols (-SH), permettant une orientation spécifique de la protéine, là où la protéine G standard est orientée aléatoirement. Ceci permettrait aussi de greffer davantage d'anticorps [55], tout en étant sûr qu'ils soient en configuration « debout ». Cependant, cela requiert de changer la fonctionnalisation et la formulation du sol utilisé.

**Différents problèmes ont été identifiés et pour la plupart résolus, notamment la présence de FRET avant mise en contact avec l'antigène**. Afin de s'en affranchir, le couple de fluorochromes doit être choisi de façon pertinente. **Les tests ont montré que le couple AF594-AF647 n'est pas un bon candidat en raison de la faible intensité d'émission du fluorochrome AF647, qui met en doute la présence de l'effet FRET**.

**Les couples AF546-AF594 et AF488-AF594 sont de très bons candidats pour la configuration envisagée**, avec une valeur de rayon de Förster  $R_0$  compatible avec les dimensions des protéines et des anticorps. **Ces deux couples ont donné des résultats très intéressants *in situ* sur différents modèles vivants, avec des valeurs de sensibilité qui traduisent bien la surexpression des marqueurs liés au cas de cancers**. Pour le couple AF546-AF594, une sensibilité de 2,0 a été obtenue avec l'anticorps anti-TrkB sur le modèle CAM de poulet avec une tumeur issue de cellules HCT 116 (cancer colorectal) et une sensibilité de 2,3 pour une tumeur issue de cellules HEK TrkB+ surexprimant le récepteur TrkB. **Pour le couple AF488-AF594, une sensibilité de 5,3 a été obtenue avec l'anticorps anti-EGFR sur un modèle vivant de souris présentant une tumeur xénotreffée**. Les tests ont aussi permis de mieux appréhender la gestion du signal optique (prise de blanc et traitement informatique du signal), pour un protocole d'utilisation simplifié pour les praticiens.



Différents marqueurs cancéreux pourraient être étudiés, en fonctionnalisant les microplots grâce aux anticorps complémentaires. **De plus, différentes voies existent pour contrôler la position du fluorochrome sur l'anticorps, parmi lesquelles, la synthèse d'anticorps de type « *flashbody* » [58].** Généralement utilisés pour cibler des antigènes, ces anticorps fluorescents sont synthétisés en insérant dans leur séquence peptidique une protéine fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) [59]. **Cette méthode permettrait de maîtriser à la fois la position des fluorochromes et leur nombre par anticorps, assurant ainsi une reproductibilité du taux de marquage (DOL) des anticorps.**

**Par la suite, quand les conditions relatives aux protéines et aux anticorps utilisés seront établies, il faudrait reconfirmer le choix du couple de fluorochromes utilisé et trouver un ratio de fluorochromes donneurs/accepteurs maximisant le transfert d'énergie de FRET.** En effet, les travaux de Ko et Grant [45] ont montré qu'un tel ratio existe et sa valeur diffère en fonction des biomolécules utilisées. De plus, s'il y a recours à la protéine G cystéine, il semble pertinent de maintenir le fluorochrome accepteur au niveau de la protéine, en raison de l'accroche possible de plusieurs anticorps, qui seraient donc porteurs des fluorochromes donneurs. Cette configuration pourrait garantir un transfert d'énergie de FRET maximal.

**Enfin, des tests sur différents modèles vivants (souris, cochons, etc.) pourront être répétés dans des conditions toujours plus optimales et pour tester encore davantage de marqueurs cancéreux.** A terme, des tests cliniques de certification seront nécessaires en vue de commercialiser les sondes de détection. Auparavant, des tests sont réalisables sur des prélèvements de patients atteints de cancers, par la mise en place d'un protocole de recherche, avec par exemple des oncologues et praticiens du CHU de Limoges. Cela permettrait de dresser des données de sensibilité représentatives, relativement au type de marqueurs cancéreux et à leur expression et déterminer de façon fiable dans quels cas de cancers le dispositif peut être indiqué. **La préparation des sondes par le biais de l'impression jet d'encre trouverait aussi toute son utilité, grâce à la potentialité de fonctionnaliser une sonde avec différents types de marqueurs, en adaptant la formulation des microplots et les étapes de fonctionnalisation (Figure 128).**

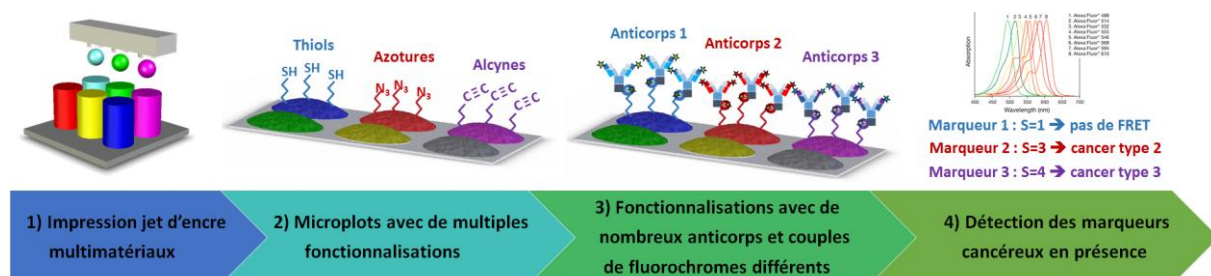


Figure 128 – Détection multiple de marqueurs cancéreux permise par l'impression jet d'encre



## Sources – Chapitre 3

---

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn, et K. B. Sharpless, « Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, n° 11, p. 2004-2021, juin 2001.
- [2] J. E. Moses et A. D. Moorhouse, « The growing applications of click chemistry », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, n° 8, p. 1249-1262, 2007.
- [3] R. Huisgen, « 1,3-Dipolar cycloaddition chemistry. », *Journal of Heterocyclic Chemistry*, vol. 23, n° 6, p. 1899-1899, nov. 1986.
- [4] C. W. Tornøe, C. Christensen, et M. Meldal, « Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides », *J. Org. Chem.*, vol. 67, n° 9, p. 3057-3064, mai 2002.
- [5] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, et K. B. Sharpless, « A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 41, n° 14, p. 2596-2599, juill. 2002.
- [6] F. Himo *et al.*, « Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 1, p. 210-216, janv. 2005.
- [7] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, et M. G. Finn, « Mechanism of the Ligand-Free Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, n° 15, p. 2210-2215, avr. 2005.
- [8] M. Meldal et C. W. Tornøe, « Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 8, p. 2952-3015, août 2008.
- [9] B. T. Worrell, J. A. Malik, et V. V. Fokin, « Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions », *Science*, vol. 340, n° 6131, p. 457, avr. 2013.
- [10] L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, et G. Bertrand, « Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne “click reaction” », *Sci Adv*, vol. 1, n° 5, p. e1500304, juin 2015.
- [11] J. E. Hein et V. V. Fokin, « Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, n° 4, p. 1302-1315, 2010.
- [12] K. Sonogashira, Y. Tohda, et N. Hagihara, « A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines », *Tetrahedron Letters*, vol. 16, n° 50, p. 4467-4470, janv. 1975.
- [13] J. García-Álvarez, J. Díez, J. Gimeno, F. J. Suárez, et C. Vincent, « (Iminophosphorane)copper(I) Complexes as Highly Efficient Catalysts for 1,3-Dipolar Cycloaddition of Azides with Terminal and 1-Iodoalkynes in Water: One-Pot Multi-Component Reaction from Alkynes and in situ Generated Azides », *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2012, n° 35, p. 5854-5863, déc. 2012.



- [14] N. Moitra, J. J. E. Moreau, X. Cattoën, et M. Wong Chi Man, « Convenient route to water-sensitive sol–gel precursors using click chemistry », *Chem. Commun.*, vol. 46, n° 44, p. 8416-8418, 2010.
- [15] W. G. Lewis, F. G. Magallon, V. V. Fokin, et M. G. Finn, « Discovery and Characterization of Catalysts for Azide–Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, n° 30, p. 9152-9153, août 2004.
- [16] C. J. Burrows et J. G. Muller, « Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission », *Chem. Rev.*, vol. 98, n° 3, p. 1109-1152, mai 1998.
- [17] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, et M. G. Finn, « Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry », *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, n° 10, p. 1912-1916, oct. 2010.
- [18] D. Soriano del Amo *et al.*, « Biocompatible Copper(I) Catalysts for in Vivo Imaging of Glycans », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 47, p. 16893-16899, déc. 2010.
- [19] C. Besanceney-Webler *et al.*, « Increasing the Efficacy of Bioorthogonal Click Reactions for Bioconjugation: A Comparative Study », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n° 35, p. 8051-8056, août 2011.
- [20] D. C. Dieterich et A. Link, « Click Chemistry in Protein Engineering, Design, Detection and Profiling », 2009, p. 309-325.
- [21] A. Ambrogelly, S. Palioura, et D. Söll, « Natural expansion of the genetic code », *Nature Chemical Biology*, vol. 3, p. 29, déc. 2006.
- [22] M. Mougnot, « Réalisation par un procédé d'impression jet d'encre de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2007.
- [23] O. De Los Cobos, « Capteurs biologiques multifonctionnels (bio-puces) mis en forme par impression jet d'encre ». Thèse d'université, Université de Limoges, 2013.
- [24] R. Mohammad, M. Ahmad, et Y. L. Heng, « An Amperometric Biosensor Utilizing a Ferrocene-Mediated Horseradish Peroxidase Reaction for the Determination of Capsaicin (Chili Hotness) », *Sensors*, vol. 13, n° 8, 2013.
- [25] X. Luo, T. M.-H. Lee, et I.-M. Hsing, « Immobilization-Free Sequence-Specific Electrochemical Detection of DNA Using Ferrocene-Labeled Peptide Nucleic Acid », *Anal. Chem.*, vol. 80, n° 19, p. 7341-7346, oct. 2008.
- [26] Z. Sun, L. Deng, H. Gan, R. Shen, M. Yang, et Y. Zhang, « Sensitive immunosensor for tumor necrosis factor  $\alpha$  based on dual signal amplification of ferrocene modified self-assembled peptide nanowire and glucose oxidase functionalized gold nanorod », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 39, n° 1, p. 215-219, janv. 2013.
- [27] G. Liu, S. M. Khor, S. G. Iyengar, et J. J. Gooding, « Development of an electrochemical immunosensor for the detection of HbA1c in serum », *Analyst*, vol. 137, n° 4, p. 829-832, 2012.
- [28] Z. Wang, M. Etienne, F. Quilès, G.-W. Kohring, et A. Walcarius, « Durable cofactor immobilization in sol–gel bio-composite thin films for reagentless biosensors and bioreactors using dehydrogenases », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 32, n° 1, p. 111-117, févr. 2012.



- [29] V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi, et H. Ju, « A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multiwall carbon nanotubes for biosensing application », *Biomaterials*, vol. 27, n° 7, p. 1167-1174, mars 2006.
- [30] O. De Los Cobos *et al.*, « Tunable Multifunctional Mesoporous Silica Microdots Arrays by Combination of Inkjet Printing, EISA, and Click Chemistry », *Chem. Mater.*, vol. 24, n° 22, p. 4337-4342, nov. 2012.
- [31] J. L. Bartels, P. Lu, A. Walker, K. Maurer, et K. D. Moeller, « Building addressable libraries: a site-selective click-reaction strategy for rapidly assembling mass spectrometry cleavable linkers (Supporting Information) », *Chem. Commun.*, n° 37, p. 5573-5575, 2009.
- [32] Z. Zhu, H. Chen, S. Li, X. Yang, E. Bittner, et C. Cai, « Tripodal amine ligands for accelerating Cu-catalyzed azide–alkyne cycloaddition: efficiency and stability against oxidation and dissociation », *Catal. Sci. Technol.*, vol. 7, n° 12, p. 2474-2485, 2017.
- [33] A. A. El-Saharty, N. H. El-Hammamy, et H. A. El-Araby, « Sodium diethyldithiocarbamate as accelerator of the rate of copper cementation », *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, vol. 41, n° 4, p. 289-293, déc. 2015.
- [34] J. P. Derrick et D. B. Wigley, « The Third IgG-Binding Domain from Streptococcal Protein G: An Analysis by X-ray Crystallography of the Structure Alone and in a Complex with Fab », *Journal of Molecular Biology*, vol. 243, n° 5, p. 906-918, nov. 1994.
- [35] J. Deisenhofer, « Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution », *Biochemistry*, vol. 20, n° 9, p. 2361-2370, avr. 1981.
- [36] A. Barth, « Infrared spectroscopy of proteins », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1767, n° 9, p. 1073-1101, sept. 2007.
- [37] A. A. Lykina *et al.*, *Raman spectra analysis of human blood protein fractions using the projection on latent structures method*. 2017.
- [38] D. Punihale *et al.*, « UV Resonance Raman Investigation of the Aqueous Solvation Dependence of Primary Amide Vibrations », *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, n° 10, p. 3931-3939, mars 2015.
- [39] M. J. E. Fischer, « Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach », in *Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols*, N. J. Mol et M. J. E. Fischer, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, p. 55-73.
- [40] H. Akil, A. Perraud, M.-O. Jauberteau, et M. MATHONNET, « Tropomyosin-related kinase B/brain derived neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer », *World Journal of Gastroenterology*, vol. 22, n° 2, p. 490-500, 2016.
- [41] M. Hecht, J. H. Schulte, A. Eggert, J. Wilting, et L. Schweigerer, « The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness », *Carcinogenesis*, vol. 26, n° 12, p. 2105-2115, déc. 2005.
- [42] « Fluorescence quantum yields (QY) and lifetimes ( $\tau$ ) for Alexa Fluor dyes ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/fluorescence-quantum-yields-and-lifetimes-for-alexa-fluor-dyes.html>. [Consulté le: 01-févr-2018].



- [43] « Antibody Basics », *Sigma-Aldrich*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>. [Consulté le: 01-févr-2018].
- [44] S. Brown et C. Poujol, « Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie confocale, Formation Permanente CNRS ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www6.inra.fr/rmui/content/download/3110/31340/version/2/file/BROWN11-fluorochromes.pdf>. [Consulté le: 01-févr-2018].
- [45] S. Ko et S. A. Grant, « A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium* », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 7, p. 1283-1290, janv. 2006.
- [46] « R<sub>0</sub> values for some Alexa Fluor dyes ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/r0-values-for-some-alexa-fluor-dyes.html>. [Consulté le: 01-févr-2018].
- [47] A. K. Trilling, J. Beekwilder, et H. Zuilhof, « Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview », *Analyst*, vol. 138, n° 6, p. 1619-1627, 2013.
- [48] K. Bonroy *et al.*, « Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers », *Journal of Immunological Methods*, vol. 312, n° 1, p. 167-181, mai 2006.
- [49] K. L. Brogan, K. N. Wolfe, P. A. Jones, et M. H. Schoenfisch, « Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold », *Analytica Chimica Acta*, vol. 496, n° 1, p. 73-80, oct. 2003.
- [50] E.-S. Kim, C.-K. Shim, J. W. Lee, J. W. Park, et K. Y. Choi, « Synergistic effect of orientation and lateral spacing of protein G on an on-chip immunoassay », *Analyst*, vol. 137, n° 10, p. 2421-2430, 2012.
- [51] M. Tashiro et G. T. Montelione, « Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins », *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 5, n° 4, p. 471-481, août 1995.
- [52] W. L. Hoffman et D. J. O'Shannessy, « Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports », *Journal of Immunological Methods*, vol. 112, n° 1, p. 113-120, août 1988.
- [53] H. Xu, J. R. Lu, et D. E. Williams, « Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin », *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n° 4, p. 1907-1914, févr. 2006.
- [54] H. Chen, J. Huang, J. Lee, S. Hwang, et K. Koh, « Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 147, n° 2, p. 548-553, juin 2010.
- [55] J. M. Lee, H. K. Park, Y. Jung, J. K. Kim, S. O. Jung, et B. H. Chung, « Direct Immobilization of Protein G Variants with Various Numbers of Cysteine Residues on a Gold Surface », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 7, p. 2680-2687, avr. 2007.



- [56] A. S. Englhard *et al.*, « Confocal laser endomicroscopy in head and neck malignancies using FITC-labelled EpCAM- and EGF-R-antibodies in cell lines and tumor biopsies », *Journal of Biophotonics*, vol. 10, n° 10, p. 1365-1376, oct. 2017.
- [57] E. Ben Brahim *et al.*, « Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal cancer: An immunohistochemical study », *Arab Journal of Gastroenterology*, vol. 19, n° 3, p. 121-124, sept. 2018.
- [58] D. Wongso, J. Dong, H. Ueda, et T. Kitaguchi, « Flashbody: A Next Generation Fluobody with Fluorescence Intensity Enhanced by Antigen Binding », *Anal. Chem.*, vol. 89, n° 12, p. 6719-6725, juin 2017.
- [59] A. Schots et J. M. van der Wolf, « Green Fluorescent Protein Fluobody Immunosensors », in *Green Fluorescent Protein: Applications and Protocols*, B. W. Hicks, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2002, p. 265-273.



<b>Chapitre IV. Application pour de la thérapie de cancers précoces par Photothérapie Dynamique (PDT) .....</b>	<b>193</b>
IV.1. Objectifs de l'étude concernant la thérapie .....	194
IV.2. Fonctionnalisation <i>one-pot</i> par la porphyrine tétra-triéthoxysilane.....	195
IV.2.1. Etude de la cinétique de condensation du sol porphyrine $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$ .....	195
IV.2.2. Impression de microplots mésoporeux fonctionnalisés avec la porphyrine .....	196
IV.2.3. Validation de la présence de porphyrine au sein des dépôts réalisés.....	198
IV.2.4. Caractérisations de la structuration poreuse des dépôts réalisés .....	201
IV.3. Fonctionnalisation par chimie <i>click</i> de phénalénone propargylée.....	203
IV.4. Caractérisation de l'activité des échantillons fonctionnalisés par les photosensibilisateurs : description de la problématique .....	205
IV.5. Mise en évidence de la production d'oxygène singulet : tests sur des fibres optiques fonctionnalisées avec la porphyrine en voie <i>one-pot</i> .....	206
IV.5.1. Choix des conditions opératoires pour la quantification de l'oxygène singulet ..	206
IV.5.2. Choix de la puissance à appliquer avec le laser 405 nm .....	207
IV.5.3. Validation de la production d'oxygène singulet par voie fibrée.....	207
IV.6. Validation de l'activité des photosensibilisateurs : tests de mort cellulaire .....	209
IV.6.1. Tests réalisés <i>in vitro</i> sur cellules de cancer du sein (MCF-7) .....	209
IV.6.1.1.1. Expériences préliminaires : détermination du protocole d'évaluation de la mort cellulaire et de conditions efficaces de PDT .....	209
IV.6.1.2. Tests <i>in vitro</i> réalisés avec des échantillons de microplots déposés sur des lamelles de verre et fonctionnalisés par les photosensibilisateurs.....	210
IV.6.1.3. Tests <i>in vitro</i> avec des fibres optiques fonctionnalisées avec la phénalénone .....	212
IV.6.2. Tests biologiques réalisés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> avec un laser 405 nm et des fibres fonctionnalisées avec la phénalénone .....	213
IV.6.2.1. Tests réalisés <i>in vitro</i> sur cellules MCF-7.....	213
IV.6.2.2. Tests <i>in vivo</i> avec des fibres optiques fonctionnalisées avec la phénalénone : modèle vivant <i>zebrafish</i> .....	215
IV.7. Conclusions et perspectives .....	217
Sources – Chapitre 4.....	218







## Chapitre IV. Application pour de la thérapie de cancers précoces par Photothérapie Dynamique (PDT)

La **photothérapie dynamique (PDT)** est une méthode alternative et innovante de traitement de cancers utilisant un **photosensibilisateur (PS)** et de l'oxygène moléculaire. L'utilisation d'un photosensibilisateur permet, par désexcitation de photons (Figure 11-a), de produire de l'**oxygène singulet ( $^1O_2$ )** dans le milieu cellulaire, occasionnant un stress oxydatif pour les cellules et déclenchant leur mort par **apoptose** [1]–[4].

La fonctionnalisation de réseaux de microplots de silice mésoporeuse a été réalisée de façon préalable grâce à des porphyrines. La fixation par réaction *click* de porphyrine mono-alcyne ou tétra-alcyne (Figure 129) sur des microplots azotures a donné des résultats peu encourageants. **Les porphyrines sont de taille trop importante pour pouvoir venir se clicker à l'intérieur des pores des microplots de silice.**

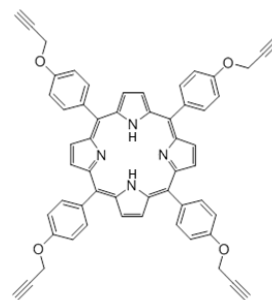


Figure 129 – Porphyrine tétra-alcyne

**Aussi, l'étude a alors porté sur deux voies alternatives :**

- 1) Une fonctionnalisation par voie *one-pot*, en incorporant directement la porphyrine dans l'encre préparée. Dans ce but, une porphyrine tétra-triéthoxysilane (Figure 11-b) a été synthétisée. Ce composé est capable de se co-condenser avec le TEOS.
- 2) Une fonctionnalisation par chimie *click* avec un photosensibilisateur de taille plus petite : la phénalénone propargylée (Figure 11-c).

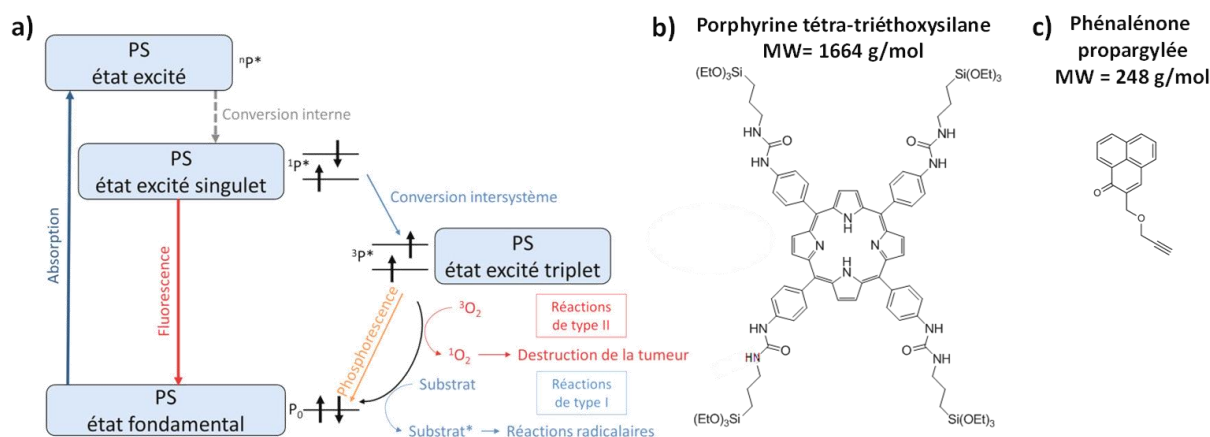


Figure 130 – Principe physique de la Photothérapie Dynamique (PDT) : diagramme de Jablonski (a). Structure chimique de la porphyrine tétra-triéthoxysilane (b) et de la phénalénone (c).



Des analyses thermiques ATD/ATG sous air ont permis de montrer que la porphyrine ne subit pas d'altération avant 220 °C, et serait donc compatible avec le traitement de consolidation à 130 °C dans le cadre de la voie *one-pot*. De même, la phénalénone ne subit pas de transformation avant 100 °C et est donc compatible pour une réaction de *click chemistry* en solution à 50 °C. **Les deux voies sont donc envisageables sans qu'il n'y ait a priori d'altération des photosensibilisateurs lors des traitements envisagés.**

#### IV.1. Objectifs de l'étude concernant la thérapie

Chacune des deux voies envisagées présente à la fois des avantages et des inconvénients et ont donc été menées en parallèle. **La voie *one-pot*** (Figure 131-a) **permet de simplifier les étapes et de diminuer le temps de préparation des échantillons**, mais cela peut générer beaucoup de pertes au niveau des coûts, du fait d'une quantité importante d'encre qui n'est pas utilisée (retenue dans le réservoir puis jetée).

**La voie *click*** (Figure 131-b) **permet de réutiliser les résultats déjà démontrés précédemment** : la structuration de la mésoporosité des microplots azotures (cf. Chapitre II), ainsi que les conditions optimisées de fonctionnalisation par chimie *click* (cf. Chapitre III). La voie *click* nécessite néanmoins davantage d'étapes (lavage de la porosité, réaction, lavages post-réaction) mais permettrait de préparer à l'avance les réseaux de microplots et de les conserver jusqu'au moment de réaliser la fonctionnalisation par chimie *click*.

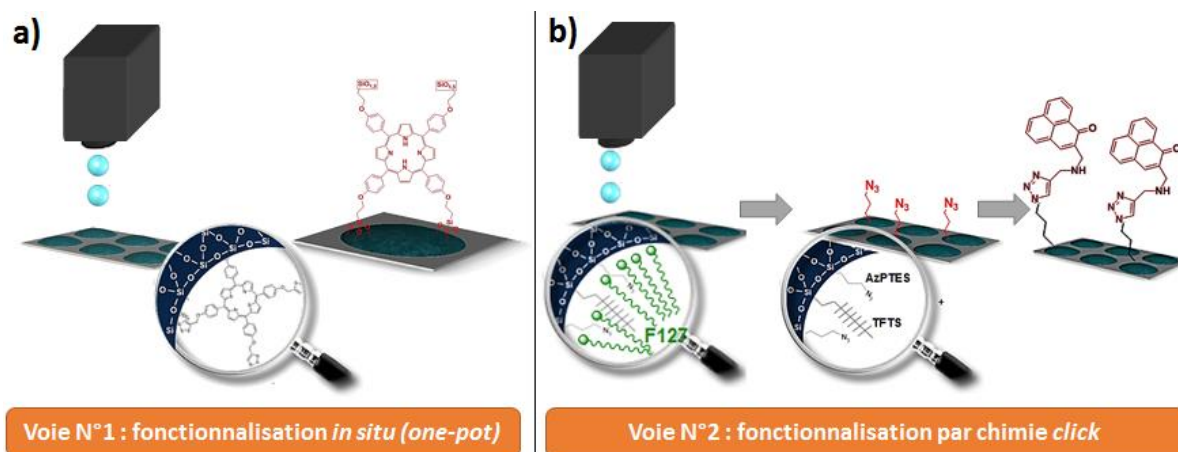


Figure 131 – Illustration des deux voies testées : voie *one-pot* avec la porphyrine tétra-triéthoxysilane (a) ou voie *click* avec la phénalénone propargylée (b)

**Le but principal de cette partie est de montrer qu'il est possible de fonctionnaliser des réseaux de microplots de silice mésoporeuse par des photosensibilisateurs. Ensuite, des tests seront envisagés pour estimer le rendement en terme de production d'oxygène singulet pour chacune des deux voies, et seront à mettre en regard d'expériences biologiques de mort cellulaire. Par la suite, les deux voies seront comparées afin de sélectionner celle qui donne les meilleurs résultats.**



## IV.2. Fonctionnalisation *one-pot* par la porphyrine tétra-triéthoxysilane

La porphyrine tétra-triéthoxysilane a été synthétisée au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges, selon le protocole décrit en Annexe 16.1. La quantité de porphyrine finale utilisable pour préparer une encre étant très limitée, **le pourcentage molaire de porphyrine par rapport au TEOS a été fixé à 1%, soit la formulation  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$** , étant donné que les autres constituants sont maintenus en proportions similaires par rapport à celles du sol de référence ( $\text{TTf}_{0,025}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$ ).

### IV.2.1. Etude de la cinétique de condensation du sol porphyrine $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$

La cinétique de condensation du sol porphyrine a été étudiée par RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$  (cf. Annexes 4.1 et 4.3) et comparée à celle du sol de référence. Les spectres RMN font apparaître des différences notables entre les deux sols en termes de vitesse de condensation :

- **Entre 0 h et 12 h, le sol porphyrine condense moins rapidement que le sol de référence**, ce qui est visible notamment par la diminution moins rapide des espèces  $\text{Q}_0$  et  $\text{Q}_1$ , ainsi que par l'apparition moins rapide des espèces  $\text{Q}_3$  pour le sol porphyrine par rapport au sol de référence.
- **A 24 h, les spectres sont similaires pour les deux sols**, avec des quantités de  $\text{Q}_1$ ,  $\text{Q}_2$  et  $\text{Q}_3$  similaires. **Ceci montre que le sol porphyrine a rattrapé son retard au niveau de sa condensation**, par rapport au sol de référence.
- **A 48 h et jusqu'à 96 h, la condensation du sol porphyrine est retardée**, ce qui est visible par une quantité de  $\text{Q}_3$  moins importante pour le sol porphyrine par rapport au sol de référence.

**Le sol porphyrine possède donc un comportement singulier par rapport au sol de référence et a une cinétique de condensation globalement plus lente que le sol de référence.** Cette faible condensation du sol porphyrine peut être liée à l'encombrement stérique de la porphyrine. De plus, ses groupements silylés sont très espacés entre eux, ce qui pourrait limiter les interactions avec le TEOS.

Les espèces  $\text{Q}_2$  et  $\text{Q}_3$  ont été quantifiées par intégration des spectres RMN sur leurs intervalles respectifs, ceci afin de déterminer le temps de vieillissement à appliquer au sol porphyrine (Figure 132, erreur de mesure de  $\pm 2,5\%$ ) et qui intervient lorsque  $\text{Q}_2 \approx \text{Q}_3$ , en vue de l'impression de ce sol.

Les tracés illustrent bien que **la condensation du sol porphyrine est plus lente, car l'égalité  $\text{Q}_2 = \text{Q}_3$  intervient plus tardivement pour le sol de référence, à environ 40 h contre environ 34 h pour le sol de référence.**



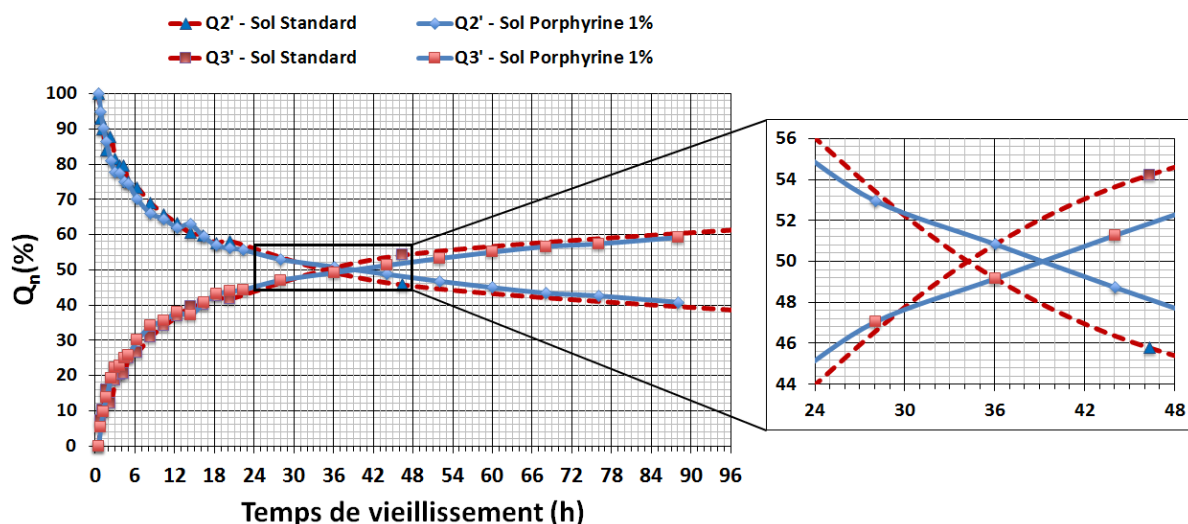


Figure 132 – Variation des espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  (somme normalisée à 100%) au cours du temps de vieillissement des sols  $Tf_{0,025}F_{0,006}E_5Et_{20}$  et  $Tf_{0,025}Po_{0,01}F_{0,006}E_5Et_{20}$

En tenant compte de l'erreur de mesure ( $\pm 2,5\%$ ), les deux sols peuvent donc être imprimés avec un temps de vieillissement médian. **Un temps de vieillissement de 36 h a donc été adopté pour les deux sols  $Tf_{0,025}F_{0,006}E_5Et_{20}$  et  $Tf_{0,025}Po_{0,01}F_{0,006}E_5Et_{20}$ .** Des impressions ont par la suite été réalisées avec ces deux sols afin de fabriquer des échantillons.

#### IV.2.2. Impression de microplots mésoporeux fonctionnalisés avec la porphyrine

En vue d'imprimer les deux sols  $Tf_{0,025}F_{0,006}E_5Et_{20}$  et  $Tf_{0,025}Po_{0,01}F_{0,006}E_5Et_{20}$ , leurs caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées afin de déterminer le rapport d'éjection des sols (Tableau 25), à 36 h correspondant au début des impressions et à 72 h à titre indicatif.

Tableau 25 – Propriétés physico-chimiques à 36 h et 72 h pour les sols utilisés

Solution testée	Temps	Densité $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Tension de surface $\gamma$ (mN/m)	Viscosité $\eta$ (mPa.s)	Rapport d'éjection $\frac{Re}{\sqrt{We}} = \frac{\sqrt{\rho r \gamma}}{\eta}$
Erreur liée à la mesure		$\pm 0,01$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	/
Sol Référence	36 h	0,85	23,4	3,8	6,0
	72 h	0,85	23,4	4,4	5,2
Sol Porphyrine	36 h	0,86	23,5	4,8	4,8
	72 h	0,86	23,5	6,5	3,6



Les propriétés physico-chimiques des sols laissent apparaître une viscosité et une tension de surface plus faibles que celles préconisées par les constructeurs (cf. Annexe 5), mais **le rapport d'éjection est compris entre 1 et 10 et permet d'envisager l'éjection des sols. Des impressions ont alors été réalisées à 36 h de vieillissement des sols, dans des conditions standards d'impression** : un réseau hexagonal compact, avec des microplots de 5 couches, espacés entre eux de 40  $\mu\text{m}$  et déposés suivant une stratégie libre.

**Un problème est apparu avec le sol porphyrine, à savoir un bouchage important du filtre à 1  $\mu\text{m}$** , utilisé lors de l'injection de l'encre dans le réservoir d'impression afin d'éliminer les grosses particules (il n'y avait pas ce problème avec le sol de référence). **Cette observation laisse à penser que, pour le sol porphyrine à 36 h de vieillissement, les oligomères de silice étaient de très grande taille**, très probablement à cause de l'encombrement de la porphyrine qui est une grosse molécule.

Une analyse par DLS (cf. Annexe 5.1.3), réalisée à 48 h de vieillissement sur les sols non filtrés (Figure 133), a permis de confirmer cette hypothèse. Le sol de référence a été utilisé tel quel et le sol porphyrine a été dilué 8 fois pour permettre l'analyse, du fait de la forte coloration de la porphyrine en solution.

Le sol standard laisse apparaître une répartition plurimodale de particules, avec des particules d'environ 7,9 nm et des particules de plus grande taille, autour de 300 nm et 2400 nm (Figure 133-a). **En revanche le sol porphyrine ne laisse apparaître que des particules de très grosses tailles, d'environ 7400 nm** (Figure 133-b). Ceci s'explique par la taille de la porphyrine, car bien que la condensation soit moindre pour ce sol, les oligomères sont alors plus gros, du fait d'une porphyrine de taille importante par rapport au TEOS.

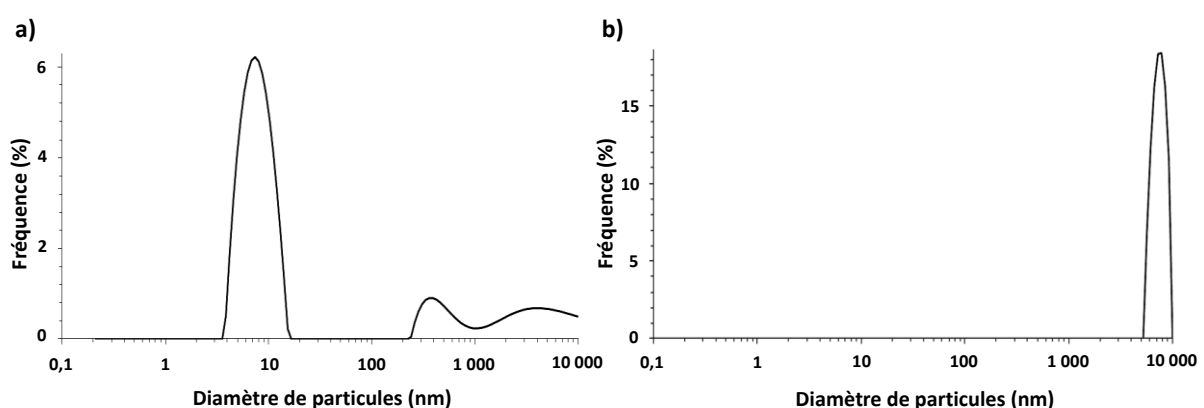


Figure 133 – Analyse par DLS (en mode intensité) après un temps de vieillissement de 48 h, pour le sol standard  $\text{TTf}_{0,025}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  (a) et pour le sol porphyrine  $\text{TTf}_{0,025}\text{PO}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  (b)

Malgré le problème de filtration observé, des échantillons ont tout de même pu être fabriqués à partir du sol porphyrine. Des analyses chimiques doivent être réalisées afin de confirmer la présence de la porphyrine dans ces échantillons.



### IV.2.3. Validation de la présence de porphyrine au sein des dépôts réalisés

Afin d'identifier la présence de la porphyrine au sein des microplots déposés dans le cas du sol  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$ , la **spectroscopie infrarouge s'avère pertinente** pour identifier les liaisons chimiques au sein du matériau. Le spectre de référence de la porphyrine tétrasilylée a été obtenu en utilisant la technique infrarouge en mode ATR (Figure 134).

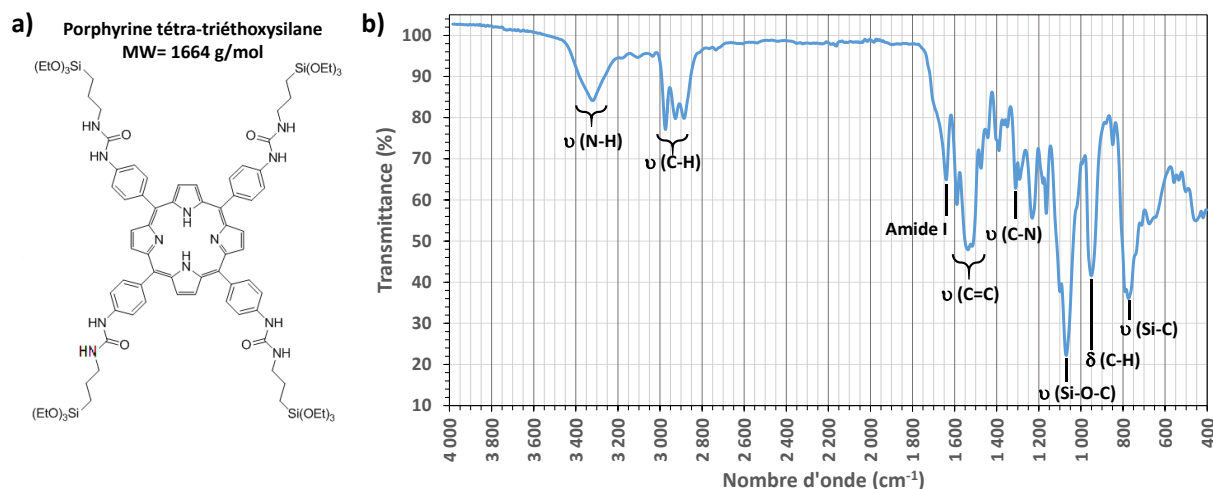


Figure 134 – Chimie de la porphyrine tétra-triéthoxysilane (a) et spectre infrarouge correspondant (b)

Sur le spectre de la porphyrine tétra-triéthoxysilane, sont présentes les bandes caractéristiques de la porphyrine : celle de la liaison N-H (élongation autour de 3300 cm<sup>-1</sup>), celles de la liaison =C-H des cycles aromatiques (élongation vers 3000 cm<sup>-1</sup> et déformation vers 950 cm<sup>-1</sup>), celles des liaisons peptidiques (entre 1570 et 1650 cm<sup>-1</sup>), celles de la liaison C-N aromatique (élongation vers 1300 cm<sup>-1</sup>), ainsi que celle de la liaison Si-O-C (élongation entre 1000 et 1100 cm<sup>-1</sup>) et celle de la liaison Si-C (élongation autour de 800 cm<sup>-1</sup>).

Les dépôts des sols  $\text{TTf}_{0,025}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  et  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  ont été réalisés sur wafers de silicium pour les caractériser par infrarouge en transmission (Figure 135).

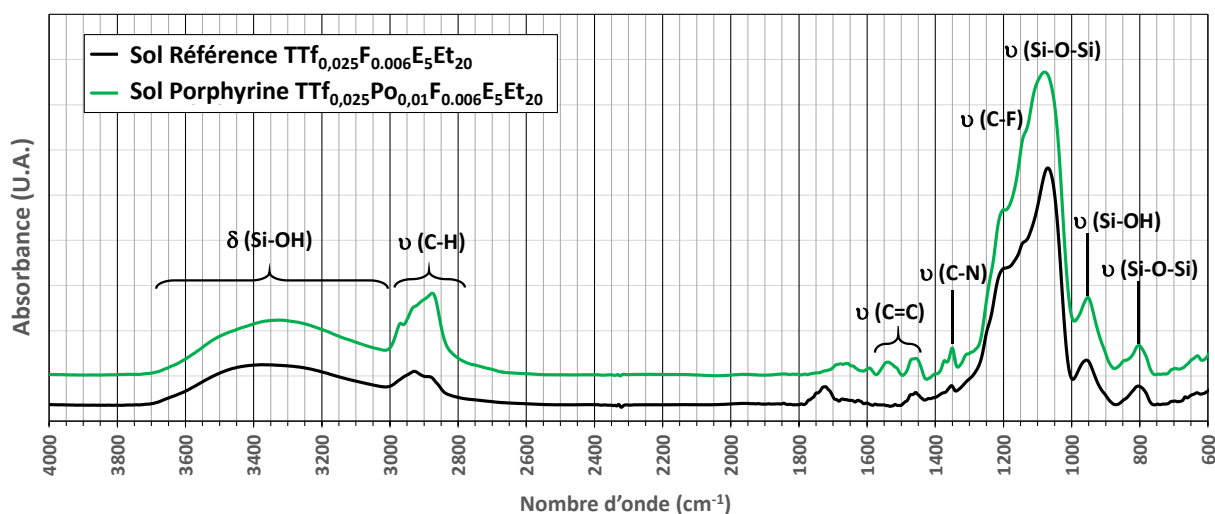


Figure 135 – Spectres infrarouge d'échantillons réalisés avec le sol de référence  $\text{TTf}_{0,025}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  ou avec le sol à base de porphyrine  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$



La présence de la porphyrine tétra-triéthoxysilane dans les dépôts réalisés avec le sol  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  est mise en évidence par la modification du massif situé entre  $2800$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$ , liée à la présence des modes C-H correspondant aux liaisons - $\text{CH}_2$  linéaires et =C-H aromatiques de la porphyrine tétra-triéthoxysilane.

Une autre méthode pour attester de la présence de la porphyrine tétra-triéthoxysilane au sein des dépôts réalisés avec le sol  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  est de s'intéresser à une correspondance de signature par **spectroscopie UV-visible** (cf. Annexe 6.1.4). Cette technique est utilisée en mode double faisceau afin d'enlever la contribution optique des substrats lamelles de verre (Figure 136). **La porphyrine possède des bandes caractéristiques, dont une bande forte à 430 nm correspondant au maximum d'absorption (dite bande de Soret) et des bandes plus faibles à 520, 560 et 650 nm, comme l'atteste la signature de la porphyrine en voie liquide dans du DMF.**

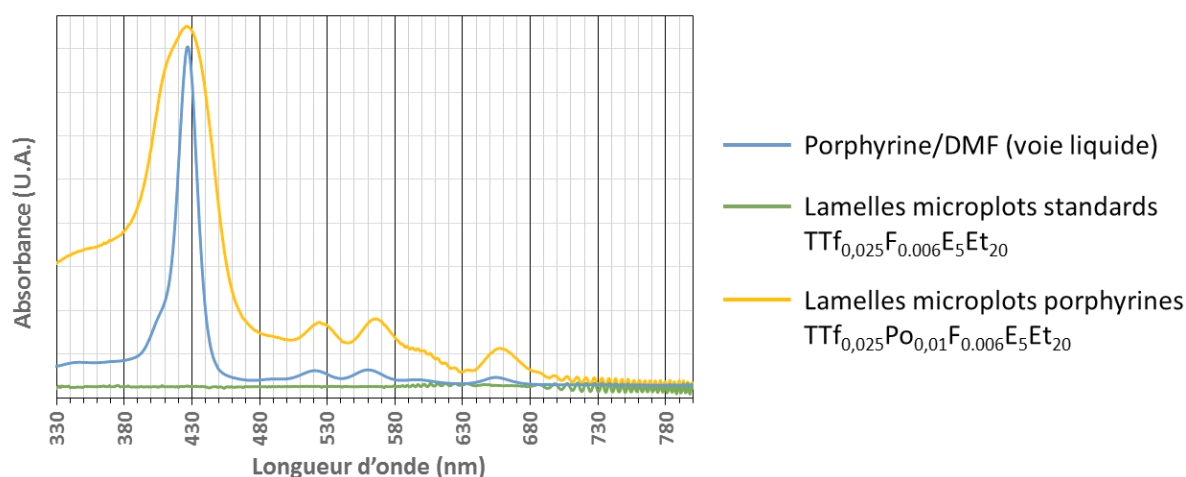


Figure 136 – Spectres UV-visible d'échantillons réalisés à partir du sol  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$

Les échantillons de microplots réalisés à partir du sol  $\text{TTf}_{0,025}\text{Po}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  possèdent également les bandes caractéristiques de la porphyrine, telle que la bande de Soret à 430 nm et les bandes plus faibles à 520, 560 et 650 nm. Un élargissement de la bande de Soret est visible et correspond à un phénomène classiquement observé lorsque les photosensibilisateurs sont fixés sur des matériaux ou surfaces [5]. La présence de la signature de la porphyrine confirme qu'elle est bien présente au sein des microplots de silice.

Afin de vérifier l'intégrité de la porphyrine par rapport à sa fonction de photosensibilisateur, il est également possible de vérifier l'émission de fluorescence de la porphyrine, lorsqu'elle est excitée. Pour cela, la microscopie confocale (cf. Annexe 10) a été utilisée avec comme source une diode laser à 405 nm. L'illumination à 405 nm permet d'exciter la porphyrine au niveau de la bande de Soret (Figure 136), se traduisant par une émission de fluorescence des microplots (Figure 137).





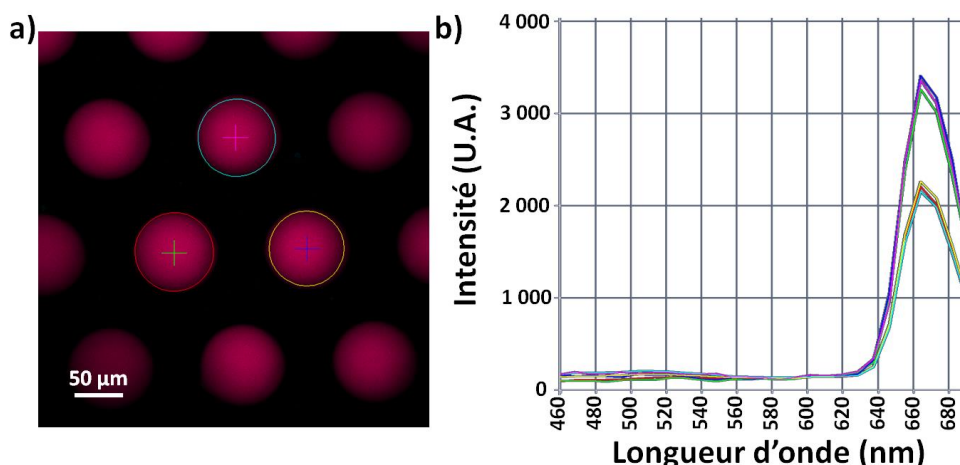


Figure 137 – Image en microscopie confocale (a) et spectres d'émission associés (b)

La microscopie confocale permet alors de vérifier que **la signature de fluorescence est homogène au sein des microplots observés** (Figure 137-a) et que **l'émission est reproductible entre les différents plots** (Figure 137-b). La présence de la porphyrine au sein des échantillons est alors bien validée par la présence d'une émission autour de 665 nm, qui traduit la désexcitation du photosensibilisateur par émission de photon (Figure 11-a).

**De plus, la porphyrine ne semble pas dégradée initialement du point de vue de sa signature en fluorescence.** En effet, lorsqu'elle est excitée trop longtemps, la porphyrine subit un phénomène d'extinction de sa fluorescence ou photoblanchiment, qui est également observable par microscopie confocale (Figure 138). Ceci montre également que **les échantillons ne sont pas réutilisables après sollicitation lumineuse de la porphyrine**, ce qui nécessite d'avoir plusieurs échantillons identiques en vue des caractérisations de l'activité du photosensibilisateur (production d'oxygène singulet et efficacité sur la mort cellulaire).

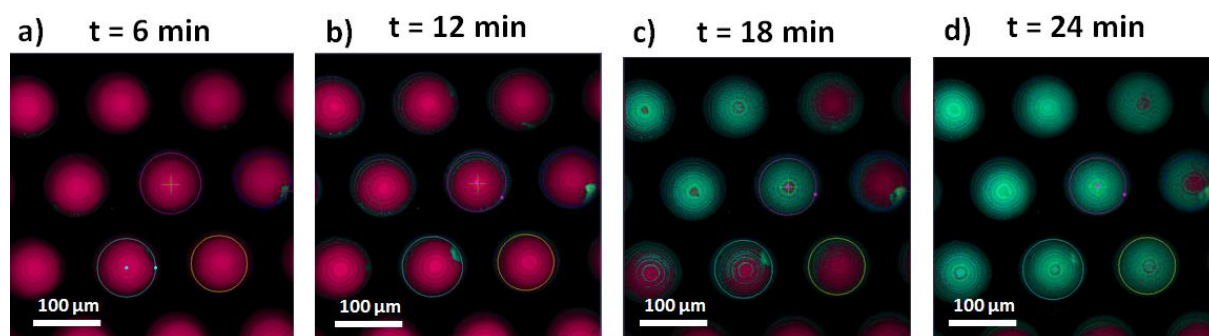


Figure 138 – Observation du photoblanchiment de la porphyrine à différents temps d'excitation



#### IV.2.4. Caractérisations de la structuration poreuse des dépôts réalisés

Avant d'étudier l'activité de la porphyrine incorporée au sein des microplots de silice, il est intéressant de caractériser l'organisation de la porosité des matériaux. En effet, la structuration de la porosité pourrait avoir une influence sur la diffusion de l'oxygène singulet produit par la porphyrine, afin de pouvoir cibler plus efficacement les cellules cancéreuses dans le cadre de la thérapie.

Afin d'étudier la structuration de la porosité en volume, des caractérisations ont été effectuées par GISAXS et MET sur des échantillons de microplots préparés à partir des deux sols  $\text{TTf}_{0,025}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  et  $\text{TTf}_{0,025}\text{PO}_{0,01}\text{F}_{0,006}\text{E}_5\text{Et}_{20}$  (Figure 139).

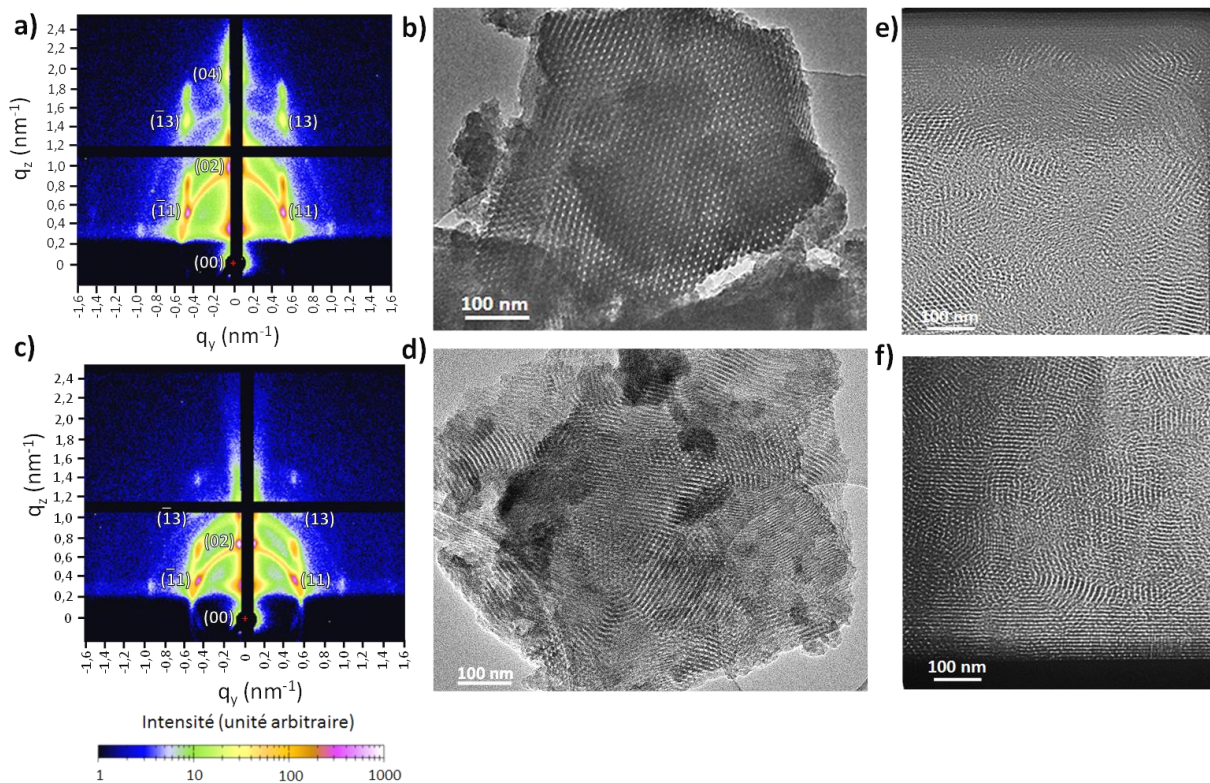


Figure 139 – Caractérisations structurales par GISAXS et MET de réseaux de microplots sans porphyrine (a)(b), et avec porphyrine (c)(d). Section d'un microplot avec porphyrine, préparée par FIB : en surface (e) ou au niveau du substrat (f).

Les clichés GISAXS laissent apparaître les taches caractéristiques de la **structure rectangulaire centrée**, à la fois pour l'échantillon de référence (Figure 139-a), et aussi pour celui avec 1% de porphyrine (Figure 139-b). Néanmoins, **cette structure n'est pas organisée de façon similaire suivant les deux types de sol**. En effet, les clichés de microscopie électronique en transmission laissent apparaître **une seule orientation des pores pour l'échantillon sans porphyrine**, là où l'échantillon avec porphyrine présente **des orientations très variées des pores**, phénomène qui se vérifie dans toute la section des microplots, à la fois en surface (Figure 139-e) et au niveau du substrat (Figure 139-f).



Ces différences d'orientation des pores trouvées sur les échantillons avec porphyrine pourraient s'expliquer par **une différence au niveau de la taille et de la morphologie des oligomères, en raison de la structure chimique de la porphyrine**. En effet, l'analyse par DLS avait montré la présence d'oligomères de grande taille pour le sol avec porphyrine, par rapport au sol de référence (Figure 133). **La présence d'oligomères de taille plus importante et de morphologie différente expliquerait ensuite que, lors de l'auto-assemblage, l'arrangement des micelles sous formes de domaines se fasse différemment**, avec des domaines à forte teneur en TEOS ayant une seule orientation des pores, mais qui viendraient percoler autour des oligomères à base de porphyrine.

**Les spectres GISAXS viennent confirmer cette hypothèse d'oligomères de taille plus importante**. En effet, les positions des taches diffèrent en  $q_z$  entre le sol de référence et le sol avec la porphyrine. Un traitement de données permet de déduire les dimensions caractéristiques de la maille du réseau poreux (Tableau 26). **Il apparaît que la structure du réseau poreux est plus dilatée hors du plan (b) pour les échantillons de microplots avec porphyrine**, et ce, malgré la contraction qui intervient durant la consolidation des échantillons.

Tableau 26 – Caractéristiques de maille pour un réseau de plots sans porphyrine ou avec porphyrine

Tâches	Référence Sans Porphyrine TTf <sub>0,025</sub> F <sub>0,006</sub> E <sub>5</sub> Et <sub>20</sub>				Microplots Avec Porphyrine TTf <sub>0,025</sub> PO <sub>0,01</sub> F <sub>0,006</sub> E <sub>5</sub> Et <sub>20</sub>			
	q <sub>y</sub> (nm <sup>-1</sup> )	q <sub>z</sub> (nm <sup>-1</sup> )	a (nm)	b (nm)	q <sub>y</sub> (nm <sup>-1</sup> )	q <sub>z</sub> (nm <sup>-1</sup> )	a (nm)	b (nm)
(02)	0	0,8685	//	14,5	0	0,6769	//	18,6
(11)	0,4313	0,4552	14,6	13,8	0,4312	0,3534	14,6	17,8
(13)		1,2994		14,5		1,0602		17,8

**La présence de porphyrine au sein du sol conduit à un réseau organisé avec un ordre à courte distance, avec une taille de domaines d'environ 100 nm** (Figure 139-d,e,f), là où le sol sans porphyrine présente un ordre à grande distance, avec des domaines de taille supérieure à 500 nm (Figure 139-b). De plus, une question subsiste, quant à **savoir si la porphyrine tétra-triéthoxysilane est présente à l'intérieur des murs de silice** (par condensation totale), **ou bien si elle est présente en surface des pores** (par condensation partielle), **ce qui pourrait jouer un rôle au niveau de l'activité du photosensibilisateur pour la photothérapie dynamique**. Des tests ultérieurs pourront cependant répondre à cette question, notamment par la possibilité de métaller la porphyrine par diffusion d'un métal dans les pores, puis par dosage afin de déterminer la proportion de porphyrine active.

La voie par chimie *click* de phénalénone propargylée assure quant à elle que le photosensibilisateur soit bien en surface des pores, par réaction avec les fonctions azotures accessibles dans les pores. Cette voie *click* a été testée en parallèle de la voie *one-pot*.



### IV.3. Fonctionnalisation par chimie *click* de phénalénone propargylée

La phénalénone propargylée a été synthétisée au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges, selon le protocole décrit en Annexe 16.2. **Afin d'augmenter l'efficacité de la phénalénone, il est pertinent de maximiser son taux de fixation par la réaction de *click chemistry* sur les échantillons.**

**Dans ce but, un sol avec 17,5% d'AzPTES est utilisé et les réseaux de microplots sont imprimés dans des conditions standards**, comme établies au chapitre II : des plots de 5 couches, espacés entre eux de 40  $\mu\text{m}$  et imprimés en mode continu selon un réseau hexagonal. Ces échantillons ont été clickés avec la phénalénone grâce au protocole décrit comme optimal au chapitre III. Pour préparer la solution *click*, 40 équivalents de phénalénone dans du DMSO sont ajoutés à 40 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté dans de l'eau osmosée, ainsi que 40 équivalents d'ascorbate de sodium dans de l'eau osmosée (avec un rapport volumique DMSO/H<sub>2</sub>O de 1). La réaction se déroule durant 24 h à 50 °C. Les échantillons sont ensuite lavés selon le protocole de lavage post-click décrit au chapitre III.

**Les échantillons réalisés sur lamelles de verre possèdent en spectroscopie UV d'absorption la même signature que celle de la phénalénone, avec une large bande d'absorption entre 330 et 480 nm (Figure 140).**

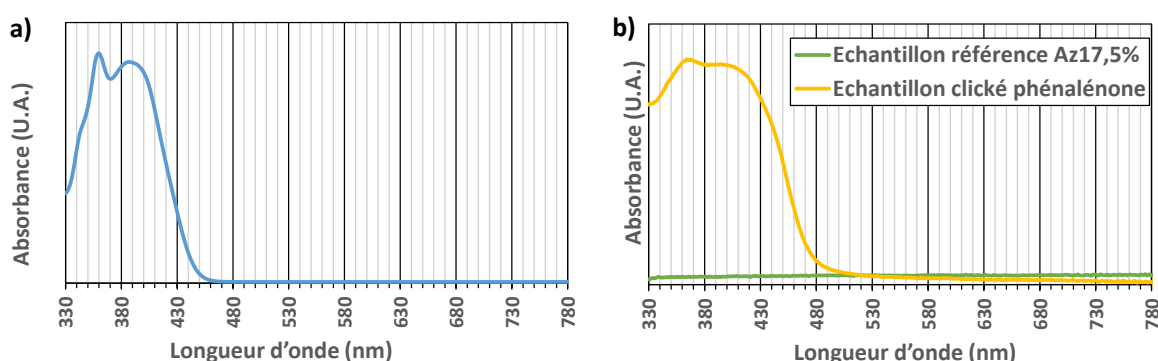


Figure 140 – Spectre UV d'absorption de la phénalénone propargylée dans du DMF (a) et après click sur des microplots Az17,5% déposés sur lamelles de verre (b)

**La spectroscopie infrarouge a ensuite été utilisée pour valider chimiquement la présence de la phénalénone après réaction *click*** sur les microplots, par réaction des alcynes de la phénalénone avec les azotures des microplots. Le spectre de référence de la phénalénone propargylée a été obtenu grâce à la **spectroscopie infrarouge en mode ATR** (Figure 141). Sur le spectre, sont notamment présentes les bandes caractéristiques de la liaison  $\equiv\text{C-H}$  des alcynes autour de 3300  $\text{cm}^{-1}$  (élongation) et une autre autour de 700  $\text{cm}^{-1}$  (déformation hors du plan), ainsi que la bande de la liaison  $\text{C}\equiv\text{C}$  des alcynes autour de 2140-2100  $\text{cm}^{-1}$  (élongation). Les cycles aromatiques sont présents entre 1600 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  (élongation). D'autres liaisons sont visibles, comme la bande de la liaison cétone aromatique



C=O autour de  $1600\text{ cm}^{-1}$  (élongation) et celle de la liaison éther aliphatique C-O-C autour de  $1000\text{ cm}^{-1}$  (élongation).

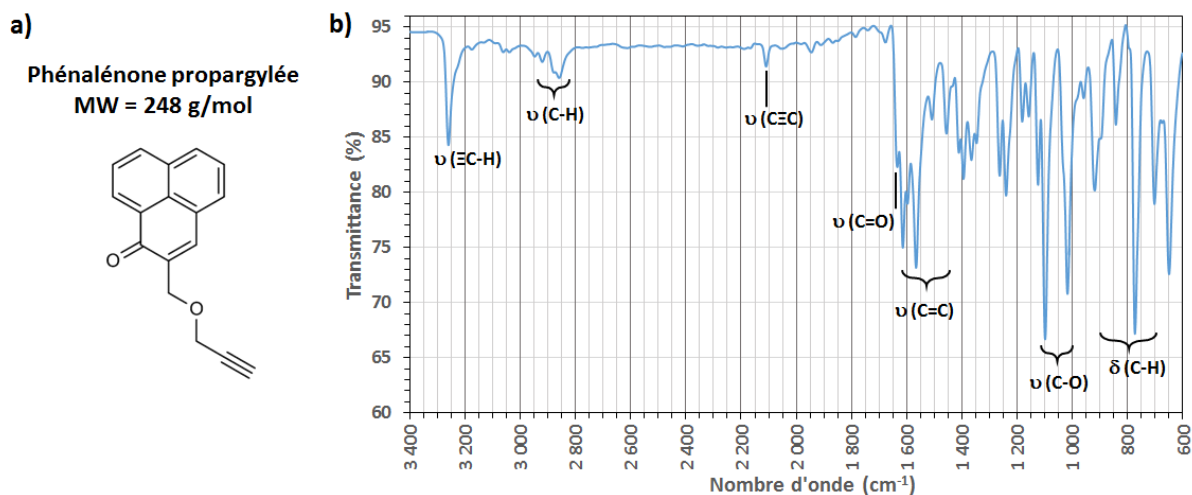


Figure 141 – Chimie de la phénalénone propargylée (a) et spectre infrarouge correspondant (b)

Les dépôts sur wafers de silicium ont été clickés avec la phénalénone et caractérisés par spectroscopie infrarouge en transmission (Figure 142). Les résultats montrent une forte diminution de la bande azoture  $\text{N}_3$  autour de  $2100\text{ cm}^{-1}$ , ainsi que l'apparition d'une bande intense entre  $1500$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$ , relatives aux liaisons C=C aromatiques traduisant la présence des noyaux aromatiques de la phénalénone. La variation relative de l'aire de la bande azotures autour de  $2100\text{ cm}^{-1}$  permet d'estimer le taux de conversion de la réaction.

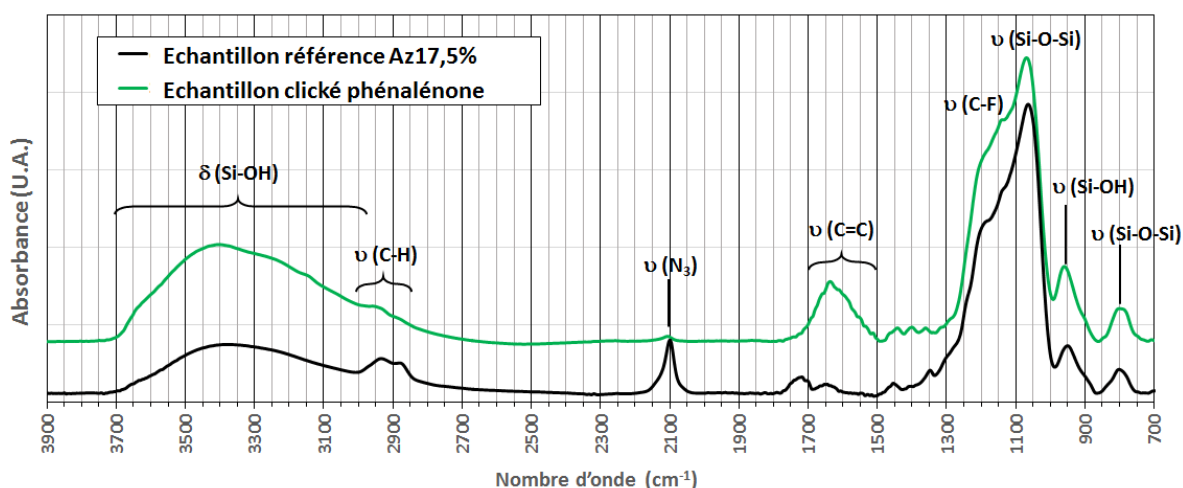


Figure 142 – Spectres infrarouge d'échantillons de référence avec 17,5% d'azotures sans traitement, et d'échantillons clickés avec la phénalénone propargylée

Ceci valide donc la fonctionnalisation par la phénalénone pour des microplots avec 17,5% d'azotures. De plus, la réaction s'effectue avec un taux de conversion très important ( $> 90\%$ ), qui valide qu'une forte proportion de photosensibilisateur se trouve dans les pores du matériau.



#### IV.4. Caractérisation de l'activité des échantillons fonctionnalisés par les photosensibilisateurs : description de la problématique

Lorsqu'il est excité par une source lumineuse, un photosensibilisateur produit de l'oxygène singulet par désexcitation (Figure 11, page 193). **L'oxygène singulet ainsi produit est une preuve de l'activité chimique du photosensibilisateur.** En phase gazeuse, l'oxygène singulet a une durée de vie d'environ 72 minutes, contre quelques microsecondes à quelques nanosecondes lorsqu'il est en solution [6].

Il existe deux manières pour caractériser l'activité du photosensibilisateur et son rôle dans le mécanisme de PDT, à savoir : la **quantification directe ou indirecte de l'oxygène singulet produit**, ainsi que **l'observation d'une mort cellulaire**, lorsque les échantillons fonctionnalisés sont excités par une source lumineuse compatible.

L'étude doit permettre de comparer les deux types de photosensibilisateur. Cependant, cette comparaison est difficile, pour plusieurs raisons :

- **Les deux photosensibilisateurs ont des maxima d'absorption différents**, à savoir un maximum d'absorption autour de **430 nm pour la porphyrine tétra-triéthoxysilane** et deux maxima **pour la phénalénone, autour de 370 et 390 nm.**
- **Les deux photosensibilisateurs sont dans des proportions très différentes** au sein des échantillons préparés, à savoir un taux de porphyrine plus faible (1%) que celui de la phénalénone clickée (~ 17,5% en raison du fort taux de conversion).
- **La structure de la porosité est différente pour les deux voies** : vermiculaire désordonnée pour la voie *click* de phénalénone (Az17,5%) et rectangulaire centrée désordonnée mais localement ordonnée pour la voie *one-pot* avec la porphyrine. De plus, il n'est pas sûr que la porphyrine soit en surface de la porosité car elle pourrait être enfermée dans les murs de silice lors de la condensation du sol.

En considérant que la phénalénone et la porphyrine n'ont pas leur maximum d'absorption à la même longueur d'onde, une source d'excitation à une longueur d'onde intermédiaire sera utilisée. Pour cela, deux lasers ont été mis à disposition par la société Kamax Innovative System, un premier laser à 405 nm, de puissance maximum 10 mW et réglable par pas de 10% et un second laser à 420 nm non réglable.

**Les tests consisteront alors d'abord à mettre en évidence la production d'oxygène singulet pour quantifier chimiquement l'activité des photosensibilisateurs. Par la suite, des tests réalisés en présence de cellules viseront à montrer qu'il y a mort cellulaire lorsque les photosensibilisateurs sont excités par une source lumineuse.**



## IV.5. Mise en évidence de la production d'oxygène singlet : tests sur des fibres optiques fonctionnalisées avec la porphyrine en voie *one-pot*

### IV.5.1. Choix des conditions opératoires pour la quantification de l'oxygène singlet

Dans la littérature, diverses études ont porté sur la mise en évidence de l'oxygène singlet de façon indirecte, par le biais de molécules réagissant avec cette espèce réactive [7]–[9]. Parmi ces molécules, **le 9,10-diméthylantracène (DMA) est un bon candidat pour quantifier la production d'oxygène singlet avec des porphyrines** [10]. En effet, **la structure chimique du DMA est modifiée sous l'action de l'oxygène singlet** (Figure 143-a) et conduit à la formation d'un endopéroxyde. **Cette oxydation du DMA se traduit par une disparition des bandes d'absorbance entre 350 et 410 nm** (Figure 143-b) [11].

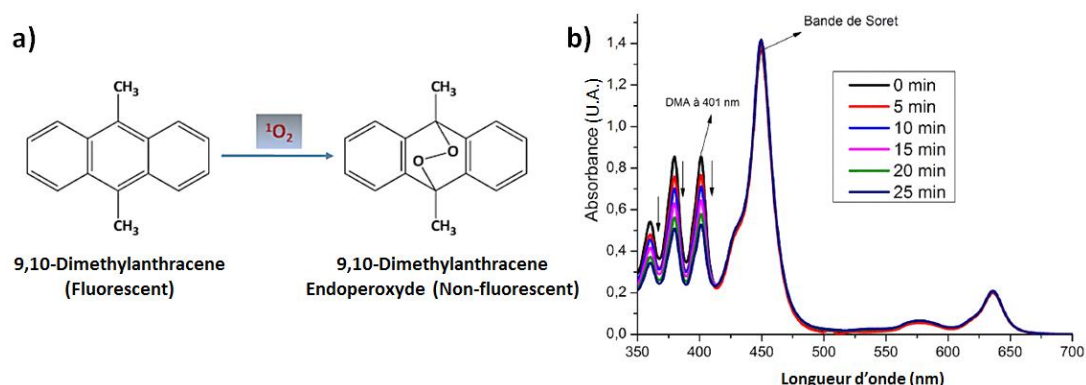


Figure 143 – Modification de la structure chimique du DMA en présence d'oxygène singlet (a) et observation de sa dégradation en solution dans du DMF ( $c = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) en présence d'une porphyrine ( $c = 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ ) éclairée par une lampe large spectre [11] (b)

**Le DMF utilisé pour solubiliser le DMA est remplacé par de l'éthanol pur, car le DMF pourrait dissoudre la gaine plastique de la fibre. La solubilisation du DMA dans l'éthanol induit un déplacement des bandes d'absorption, à 358, 377 et 398 nm.**

Le DMA a donc été utilisé en solution ( $c = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) pour mettre en évidence de façon indirecte la production d'oxygène singlet pour des fibres imprimées avec des microplots de 5 couches, grâce au sol contenant la porphyrine tétra-triéthoxysilane (voie *one-pot*). Les fibres ont été imprimées en mode continu et environ 32 plots sont déposés sur le cœur de la fibre (diamètre de 0,8 mm, Figure 144).

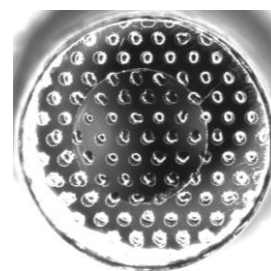


Figure 144 – Fibre imprimée avec le sol porphyrine (Po1%)

L'analyse a été réalisée par spectroscopie UV d'absorption sur solvant grâce à des cuves en quartz (3 mL par cuve), sur un spectromètre Cary UV/Vis/NIR 5000 en mode double faisceau, afin de corriger la ligne de base. La source d'excitation pour la porphyrine est le laser



405 nm (10 mW) de puissance ajustable. Avant de procéder aux analyses, un bullage d'oxygène gazeux a été réalisé dans la solution stock DMA/EtOH afin de l'enrichir en oxygène.

#### IV.5.2. Choix de la puissance à appliquer avec le laser 405 nm

La puissance laser à appliquer doit être la plus élevée possible afin de maximiser le taux d'oxygène singulet produit. Cependant, cette puissance doit aussi assurer que la molécule à doser ne soit pas dégradée sous l'effet du laser.

**Afin de valider qu'il n'y a pas d'interaction sous l'effet de l'irradiation laser, la solution DMA/EtOH a été irradiée avec le laser au travers d'une fibre vierge trempant dans la solution. Les tests préliminaires ont montré que l'illumination à puissance maximale du laser (100%, soit 10 mW) provoque la dégradation du DMA, visible par une diminution des trois bandes d'absorption à 358, 377 et 398 nm, en l'absence de photosensibilisateur (Figure 145).**

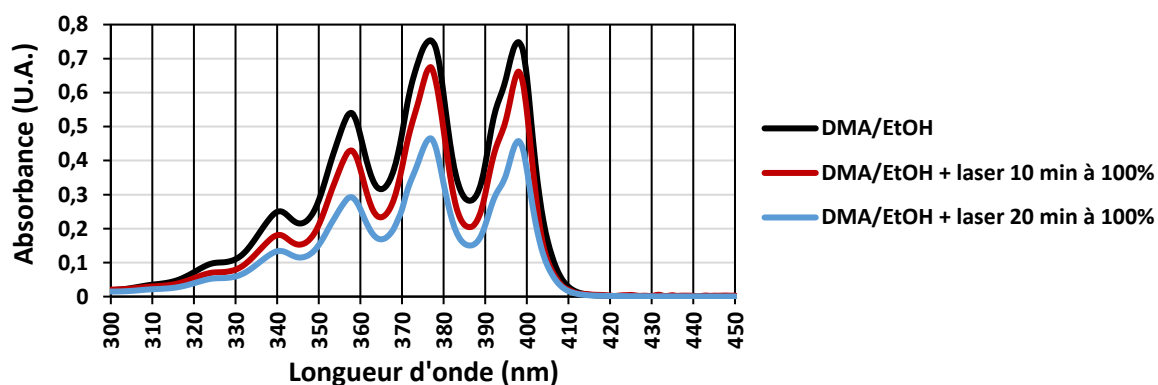


Figure 145 – Dégradation du DMA observée sous l'effet de l'irradiation laser à 405 nm

Cependant, d'autres tests ont permis de montrer qu'il n'y a pas de dégradation du DMA pour une puissance du laser de 0 à 50%. La puissance laser de 50% est donc retenue pour la suite des tests, afin de s'affranchir de la dégradation du DMA par le laser, tout en maximisant la sollicitation du photosensibilisateur.

#### IV.5.3. Validation de la production d'oxygène singulet par voie fibrée

Afin de valider la production d'oxygène singulet dans le cas de microplots déposés sur des fibres optiques, les échantillons considérés sont des fibres optiques imprimées avec le sol porphyrine Po1% et des microplots de 5 couches. **Le laser est utilisé à 50% de puissance.**

Le protocole de mesure est similaire à celui utilisé précédemment, à savoir de l'éthanol pur placé dans la cuve référence du spectromètre et la solution DMA/EtOH ( $c = 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) placée dans la cuve échantillon (3 mL). La cuve échantillon est éclairée tout d'abord avec une





fibre vierge durant 20 min à 50% du laser, afin de vérifier l'absence de dégradation de la porphyrine. Par la suite, la cuve échantillon est nettoyée et renouvelée avec la solution stock de DMA/EtOH, éclairée cette fois-ci avec une fibre porphyrine durant 20 min à 50% du laser, afin d'étudier la dégradation du DMA. Les résultats obtenus lors de ces caractérisations sont présentés en Figure 146.

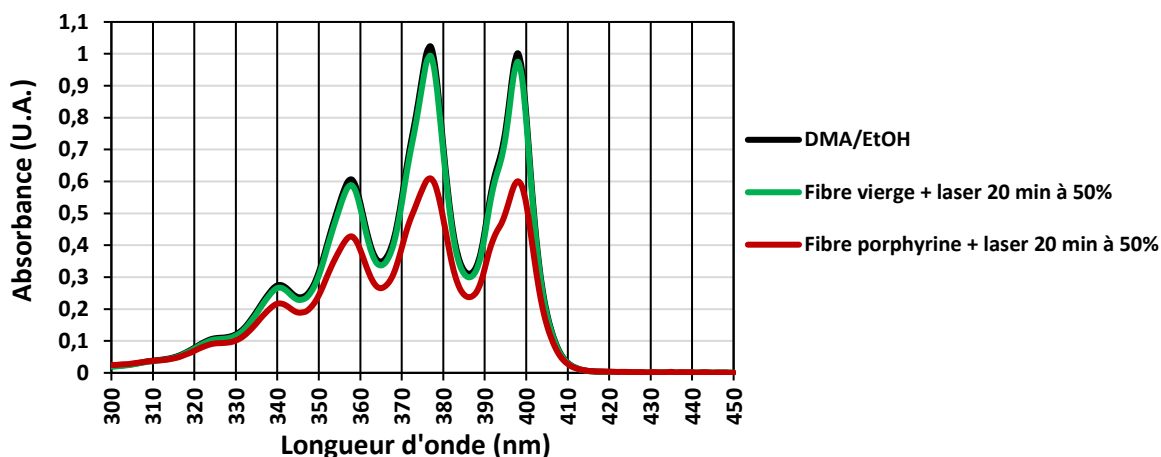


Figure 146 – Signature UV d'absorption de la solution DMA/EtOH après sollicitation avec le laser 405 nm à 50% durant 20 minutes, via une fibre vierge ou bien une fibre imprimée de microplots porphyrine

Les résultats font apparaître une diminution négligeable de l'absorbance dans le cas d'une irradiation pendant 20 minutes à 50% de puissance, au travers d'une fibre vierge (diminution d'absorbance de 0,03 sur la bande à 377 nm). Ceci confirme dans ces conditions une dégradation négligeable du DMA sous l'effet du laser. Or, dans ces mêmes conditions d'irradiation laser, **une forte diminution de l'absorbance est observée lors de l'utilisation d'une fibre imprimée de microplots porphyrine** (diminution d'absorbance de 0,4 sur la bande à 377 nm). **Ceci valide alors qu'il y a eu production d'oxygène singulet en présence de la porphyrine excitée à 405 nm durant 20 minutes.**

**La production d'oxygène singulet est donc validée dans le cas de la porphyrine.** Par la suite, cette production d'oxygène singulet peut être quantifiée de façon relative, par exemple pour étudier l'influence du nombre de couches déposées sur la quantité d'oxygène singulet produite. Ceci permettrait de savoir s'il est pertinent de travailler avec une quantité de matière importante (*i.e.* un nombre de couches élevé), ou bien si la production d'oxygène singulet n'est efficace que sur une certaine épaisseur en surface du matériau. De plus, les mesures devraient être effectuées avec la phénalénone afin de contrôler et d'estimer la production d'oxygène singulet dans ce cas également.

## IV.6. Validation de l'activité des photosensibilisateurs : tests de mort cellulaire

L'oxygène singulet produit par les photosensibilisateurs lors de la PDT possède un effet anti-tumoral et conduit à la mort de cellules cancéreuses par apoptose. En raison de sa faible durée de vie en solution [6], le photosensibilisateur doit être proche de sa cible.

**Des tests ont été réalisés au cours de cette étude afin de valider la mort cellulaire liée à l'activité des photosensibilisateurs.** Par la suite, l'expertise d'un laboratoire de biologie cellulaire, à savoir l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier, a été sollicitée afin de valider les résultats démontrés. Les tests réalisés *in vitro* sur cellules ont porté sur une souche de cellules de cancer du sein, à savoir des cellules MCF-7.

### IV.6.1. Tests réalisés *in vitro* sur cellules de cancer du sein (MCF-7)

**Dans cette partie, le laser utilisé est celui de longueur d'onde d'excitation 420 nm et de puissance non ajustable.** Cette longueur d'onde permet d'éclairer chacun des photosensibilisateurs à une longueur d'onde proche du maximum d'absorption. Les cellules MCF-7 ont été cultivées au laboratoire CAPTuR de la Faculté de Pharmacie de Limoges.

#### IV.6.1.1.1. Expériences préliminaires : détermination du protocole d'évaluation de la mort cellulaire et de conditions efficaces de PDT

Des tests préliminaires ont été réalisés pour permettre de déterminer un protocole pertinent concernant les conditions opératoires à appliquer pour la PDT (notamment en termes de conditions d'éclairage, de puissance du laser, de temps d'éclairage, etc.). Les deux voies ont été testées et les échantillons ont été préparés à partir des conditions décrites dans les paragraphes précédents (§IV.2, page 195 et §IV.3, page 203).

**Pour observer la mort cellulaire, il semblait pertinent d'utiliser du bleu de trypan,** qui colore les cellules mortes [13]. Cependant, il ne permet que l'observation des cellules mortes, et a été abandonné au profit d'un **autre composé qui permet de faire du dosage quantitatif** : le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, ou **sel de tétrazolium MTT** [14]. Les cristaux de formazan du MTT sont incorporés dans les cellules vivantes par leur activité métabolique, ce qui les colore (Figure 147).

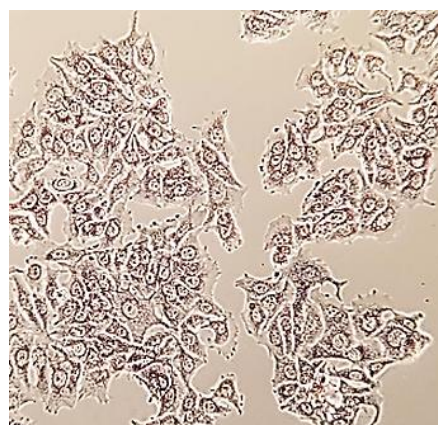


Figure 147 – Exemple de cellules MCF-7 ayant incorporé les cristaux de formazan

Il est alors possible de dissoudre les cellules dans un solvant agressif afin de solubiliser les cristaux de formazan violet et réaliser un dosage par absorption UV. **Ce dosage MTT** (cf.



protocole en Annexe 17) **permet de connaître la quantité de cellules vivantes, appelée viabilité, et d'étudier de façon relative la mort cellulaire** [15]. Ce dosage MTT est réalisé avec la longueur d'onde à 584 nm, correspondant à une absorbance élevée. L'absorbance mesurée sur les puits de contrôle sert à normaliser les valeurs de viabilité des autres puits.

**Les tests préliminaires réalisés ont conduit à considérer le protocole suivant pour quantifier la mort cellulaire sur les échantillons** : les cellules sontensemencées en plaques 24 puits (sur plastique) avec une attente en incubateur de 48 h pour atteindre la confluence (ou densité de cellules) maximale. La lamelle est rajoutée dans le puits considéré, avec les microplots vers le bas, en contact avec les cellules. Chaque lamelle est irradiée 30 minutes par le laser, sur toute la surface de la lamelle, afin de solliciter tous les microplots. Enfin, la durée entre l'excitation laser et le comptage cellulaire par MTT est fixée à 12 h.

#### IV.6.1.2. Tests *in vitro* réalisés avec des échantillons de microplots déposés sur des lamelles de verre et fonctionnalisés par les photosensibilisateurs

Le protocole a été utilisé afin d'évaluer la viabilité de cellules cultivées sur des microplots déposés sur lamelles de verre, pour les deux voies testées (Figure 148).

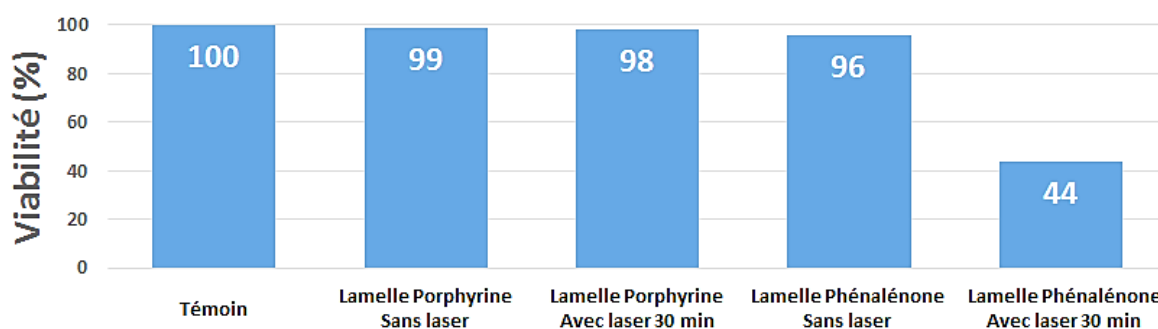


Figure 148 – Valeurs de viabilité obtenues pour les deux voies testées

Les résultats montrent une **viabilité autour de 100% pour les échantillons fonctionnalisés avec la porphyrine, indiquant que le nombre de cellules n'a pas grandement diminué**. La production d'oxygène singulet par la porphyrine n'est pourtant pas remise en cause. Il est possible qu'une mort cellulaire soit présente, bien que compensée par la prolifération des cellules. **La faible efficacité de la PDT dans ce cas pourrait notamment être liée à la très faible teneur en porphyrine dans les échantillons (1%)**.

**La voie *one-pot* avec la porphyrine ne semble donc pas indiquée pour une application thérapeutique. En revanche, dans le cas de la phénalénone, une viabilité de 44% est observée après irradiation laser, ce qui traduit une mort cellulaire importante.**

**Cette tendance avait pu être observée au microscope optique avant le dosage MTT, afin d'estimer le nombre de cellules** (Figure 149). Les puits sélectionnés présentaient initialement des densités de cellules équivalentes. Les conditions respectives ont été



appliquées aux échantillons (avec ou sans irradiation). Par la suite, le puits correspondant à l'échantillon sans phénalénone et illuminé avec le laser présentait une densité de cellules presque équivalente à son état initial. Il y a eu un possible ralentissement de la croissance cellulaire sur cet échantillon. En revanche, **le puits contenant un échantillon fonctionnalisé avec la phénalénone et excité avec le laser, a vu le nombre de ces cellules décroître de façon importante** (Figure 149).

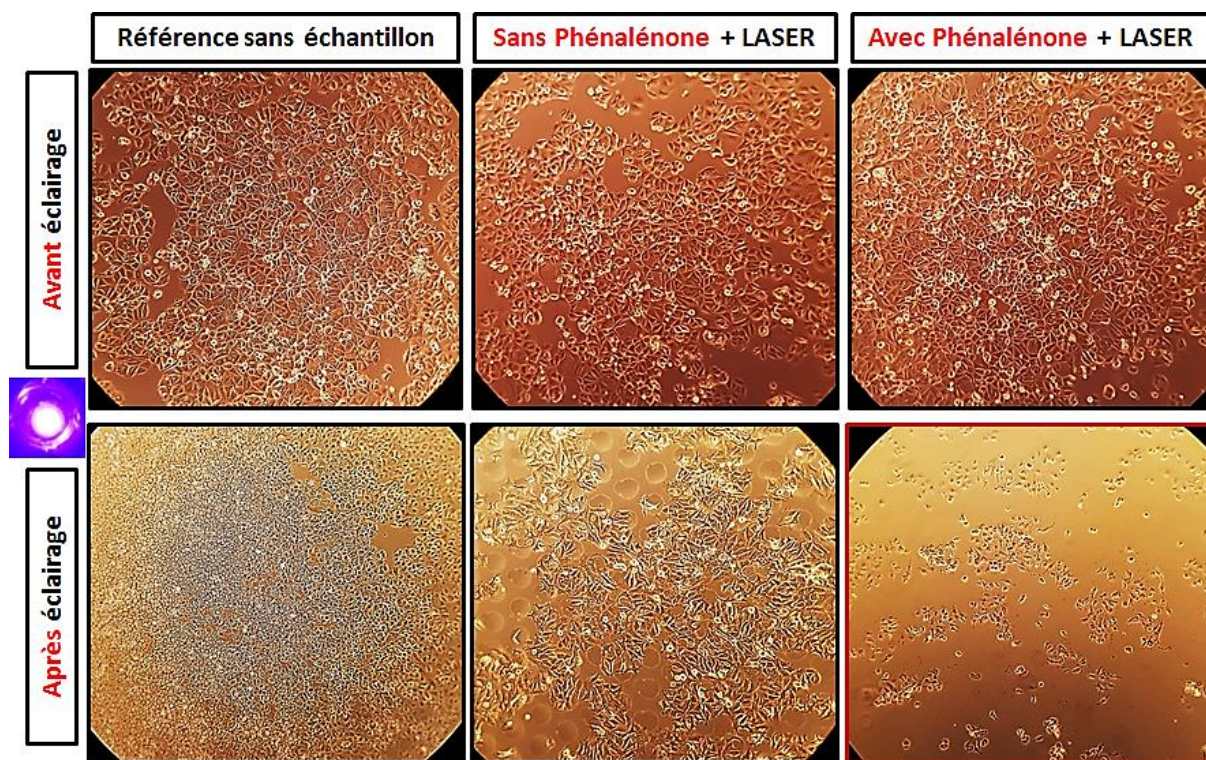


Figure 149 – Observation en contraste de phase (objectif x10) de cellules cultivées pendant 48 h sur du plastique de culture, présentes dans les puits à l'état initial (avant éclairage laser) et avant dosage MTT (12 h après éclairage) : sans échantillon, en présence d'une lamelle avec des microplots Az17,5% sans phénalénone, ou d'une lamelle avec des microplots Az17,5% avec phénalénone

En conclusion, les tests *in vitro* ont permis, grâce à un dosage MTT, d'estimer la mort cellulaire dans différentes conditions pour la voie *click* de phénalénone et la voie *one-pot* avec la porphyrine. **La voie *one-pot* a donné des résultats peu encourageants**, en raison d'une absence de mort cellulaire, du fait très probablement de la faible teneur en porphyrine et de la structuration de la porosité qui ne faciliterait pas la diffusion de l'oxygène singulet. **La voie *click* de phénalénone a quant à elle donné des résultats très satisfaisants** en terme de mort cellulaire. Cette voie a été retenue pour continuer les tests, cette fois-ci dans le cas de fibres optiques revêtues de microplots azotures Az17,5% et clickés avec la phénalénone.

#### IV.6.1.3. Tests *in vitro* avec des fibres optiques fonctionnalisées avec la phénalénone

Un dispositif a été développé par la société Kamax Innovative System pour mener les expériences de mort cellulaire sur des fibres optiques (Figure 150). Le montage consiste à fixer la fibre optique tête en bas sur le dispositif. Grâce à des vis micrométriques, le dispositif peut être déplacé en XY pour sélectionner un puits. L'axe en Z permet ensuite l'approche fine de la fibre jusqu'au contact avec le tapis cellulaire.

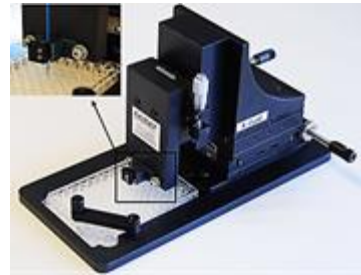


Figure 150 – Dispositif K-light développé, permettant l'approche fine d'une fibre au contact de cellules

Pour les tests sur fibres, il était pertinent de travailler avec des puits de taille la plus petite possible, à savoir pour des plaques 96 puits. Les cellules ont étéensemencées à 20 000 cellules, avec un délai de 48 h en incubateur à 37 °C afin d'atteindre la confluence. Cependant la confluence totale n'a pas été atteinte, et les zones à forte densité de cellules ont été repérées sur le pourtour des puits. Pour les tests, la fibre a été approchée avec le dispositif sur une zone repérée avec une forte densité de cellules, afin de tester au mieux la PDT sur cette zone (Figure 151-a). La zone a été irradiée pendant 30 min avec le laser à 420 nm, puis la plaque a été remise à l'incubateur. Le dosage MTT a été réalisé 12 heures après excitation lumineuse.

**Une observation au microscope optique a permis de montrer une absence de cellules au niveau de la zone irradiée (Figure 151-b). Cependant, un contrôle optique des fibres suggère que les cellules ne sont pas mortes à cause de la PDT, mais parce qu'elles ont été arrachées du puits (Figure 151-c et Figure 151-d), en raison d'une pression possiblement trop forte de la fibre au fond du puits.**

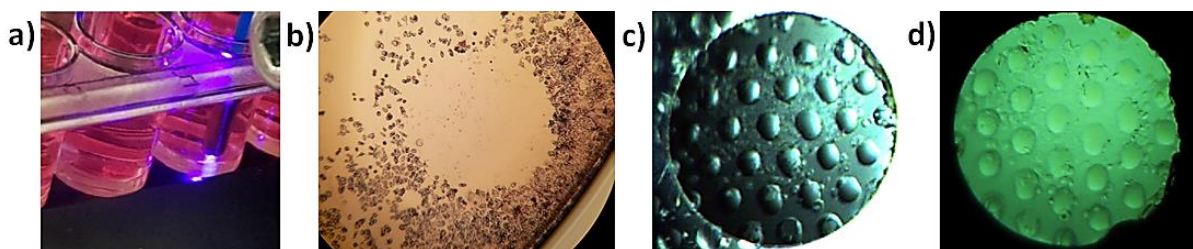


Figure 151 – Mise en contact de la fibre avec les cellules et éclairage avec le laser (a). Observation du puits testé (objectif x10), après coloration des cellules au MTT (b). Contrôle optique de la fibre utilisée, observée en réflexion (c) et en transmission (d).

**Ces expériences doivent donc être reconduites**, en limitant la pression de la fibre sur les cellules pour éviter un décollage (ce qui reviendrait à surestimer la mort cellulaire). **Une première solution a été trouvée : la possibilité d'ensemencer les cellules sur les fibres**, grâce à un dispositif développé pour maintenir les fibres au fond des puits d'une plaque 96 puits adaptée (Figure 152-a et b). **Une seconde alternative a été envisagée, à savoir**



**l'utilisation d'un montage compatible avec l'équipement K-light de mort cellulaire**, avec une caméra pour focaliser sur le tapis de cellules, puis de venir approcher la fibre et de s'arrêter quand la fibre est au contact, *i.e.* dans le plan focal de la caméra (Figure 152-c et d).

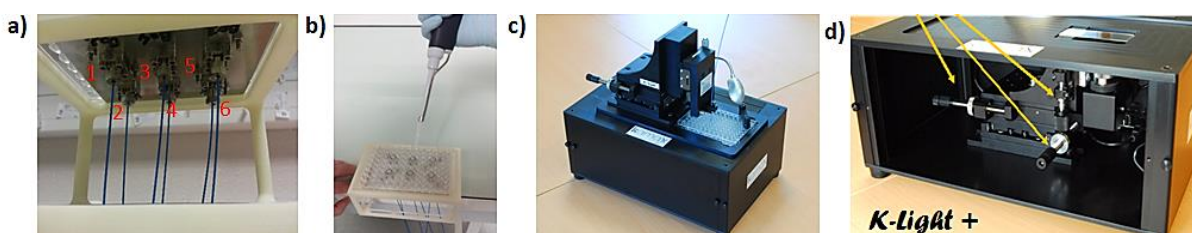


Figure 152 – Montage adaptatif qui permet le maintien des fibres en plaque 96 puits (a) et l'ensemencement sur les fibres (b). Montage K-light+ développé, compatible avec l'équipement K-light (c) et qui permet de focaliser sur le tapis de cellules au moyen d'une caméra (d)

#### **IV.6.2. Tests biologiques réalisés *in vitro* et *in vivo* avec un laser 405 nm et des fibres fonctionnalisées avec la phénalénone**

Les essais préliminaires réalisés au laboratoire IRCER sont encourageants, bien que perfectibles. Ils ont permis de mettre en place un protocole de mesure de la mort cellulaire, notamment au niveau des conditions d'excitation laser et du délai par rapport au comptage cellulaire. De plus, les expériences sur fibres nécessitaient des ajustements. Pour toutes ces raisons, **des tests biologiques ont été réalisés au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de Montpellier, qui possède à la fois le savoir-faire et l'expérience pour mener des tests biologiques de mort cellulaire.**

**Les tests réalisés à l'IBMM ont été menés uniquement pour la phénalénone (voie *click*) et avec le laser à 405 nm (10 mW), de puissance ajustable.** L'utilisation de ce laser est par ailleurs plus pertinente pour la phénalénone, par comparaison avec le laser 420 nm, car la phénalénone possède un maximum d'absorption autour de 410 nm (cf. Figure 140).

**Le but recherché dans la réalisation de ces tests est de montrer des résultats similaires voire meilleurs en termes de mort cellulaire, comme cela a été constaté avec les microplots déposés sur lamelles de verre et fonctionnalisés avec la phénalénone. De plus, l'utilisation des fibres sur modèle vivant constitue une étape à réaliser.**

##### **IV.6.2.1. Tests réalisés *in vitro* sur cellules MCF-7**

Des échantillons de microplots réalisés avec le sol Az17,5% ont été clickés avec la phénalénone puis envoyés à l'IBMM pour caractérisation. Des échantillons de microplots non-clickés ont aussi été envoyés pour réaliser des contrôles négatifs, c'est-à-dire pour vérifier qu'il n'y a pas de mort cellulaire liée à l'excitation du laser en l'absence de phénalénone. Le laser est utilisé à 100% de sa puissance avec un collimateur pour éclairer une zone de l'échantillon (diamètre du spot environ 2 mm).



Le protocole consiste à ensemercer les cellules sur les échantillons et laisser incuber jusqu'à confluence totale. Des zones différentes sont sélectionnées et identifiées afin de réaliser un suivi optique dans le temps. Un contrôle optique de chaque zone est réalisé avant tout traitement : une zone témoin qui ne subit aucun traitement, une deuxième zone qui subit une seule irradiation durant 20 min et une troisième zone qui subit deux irradiations de 10 minutes chacune, dont une initiale et une autre 24 h après la première irradiation.

**Le protocole est réalisé sur un échantillon de référence (Az17,5%) sans phénalénone** (Figure 153). Cet échantillon sert à contrôler qu'il n'y a pas de mort cellulaire imputée au laser. **L'équipe de l'IBMM ayant réalisé les tests a conclu à une absence de mort cellulaire liée au laser, ce qui est notamment visible par un comportement cellulaire analogue au niveau des trois zones traitées.** En effet, la croissance cellulaire est la même, les microplots sont visibles et les cellules colonisent tout l'échantillon (Figure 153).

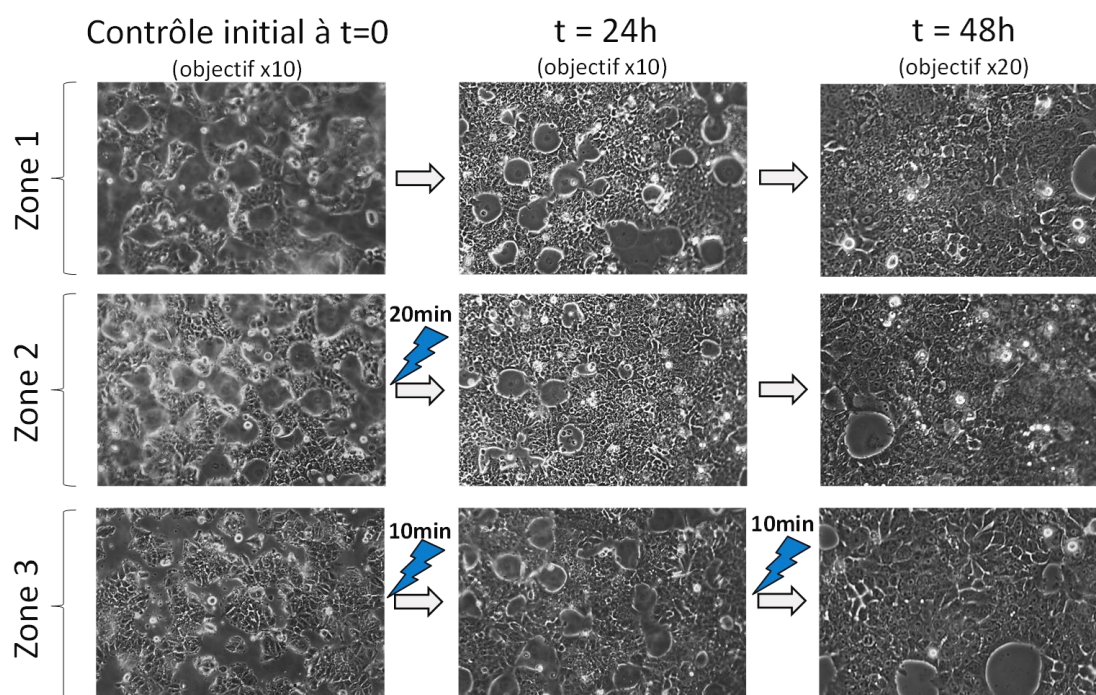


Figure 153 – Résultats du comportement cellulaire observé pour les différentes zones traitées dans le cas d'un échantillon de référence (Az17,5%) sans phénalénone

Par la suite, un échantillon Az17,5% clické avec la phénalénone a également été traité selon le protocole d'irradiation, afin d'estimer la mort cellulaire (Figure 154). L'équipe de l'IBMM a conclu à un fort ralentissement de la croissance cellulaire pour les deux conditions d'irradiation, par rapport à la zone non irradiée. En effet, après la première irradiation, les cellules ne colonisent plus le pourtour des microplots, et leur nombre diminue légèrement. L'effet est d'ailleurs plus marqué pour une irradiation de 20 minutes, par rapport à une irradiation de 10 minutes. En revanche, une seconde irradiation de 10 minutes réalisée à J+1 permet d'obtenir le même résultat en termes de mort cellulaire à J+2.



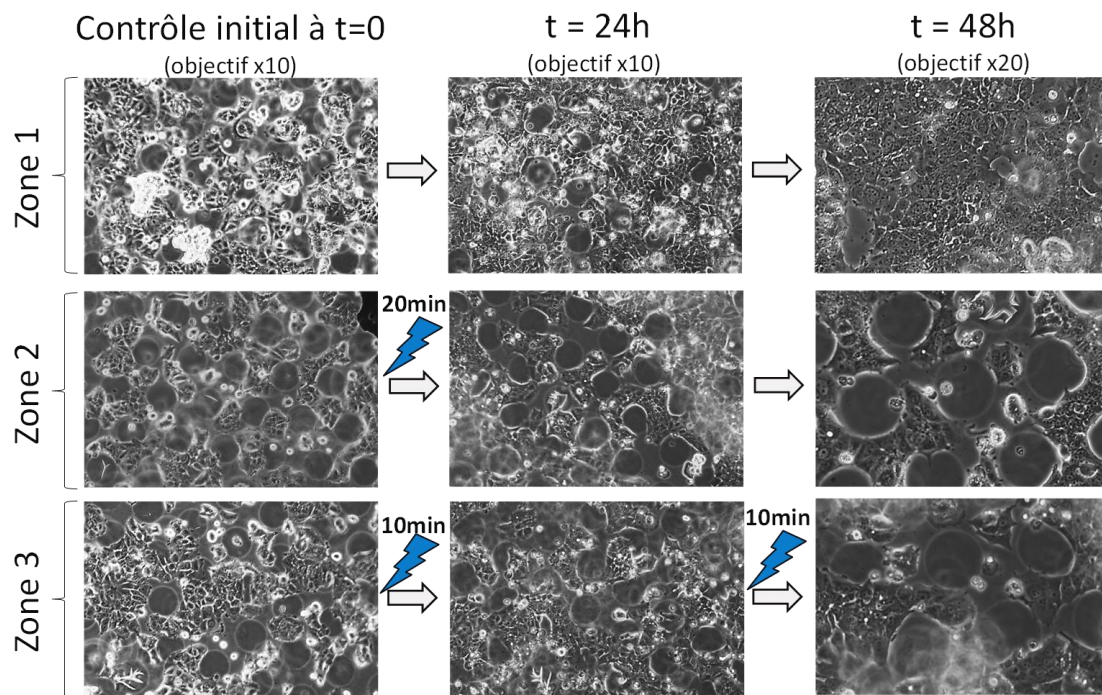


Figure 154 – Résultats du comportement cellulaire observé pour les différentes zones traitées dans le cas d'un échantillon Az17,5% clické avec la phénalénone

Les tests, réalisés à l'IBMM avec le laser 405 nm orientent donc également vers une mort cellulaire constatée sur les échantillons préparés avec la phénalénone. L'effet est très marqué pour un temps d'irradiation de 20 minutes et il semble possible de multiplier les irradiations pour maximiser le taux de mort cellulaire. Par ailleurs, les contrôles négatifs ont montré qu'il n'y a pas de mort cellulaire imputée au laser seul.

Par la suite, un modèle vivant a été sélectionné afin de réaliser des tests biologiques avec des fibres préparées et fonctionnalisées avec la phénalénone.

#### IV.6.2.2. Tests *in vivo* avec des fibres optiques fonctionnalisées avec la phénalénone : modèle vivant *zebrafish*

Pour les tests à réaliser grâce aux fibres optiques fonctionnalisées avec la phénalénone, un des modèles vivants pertinents pour l'étude de la mort cellulaire est le modèle *zebrafish*. Ce modèle est reconnu comme un excellent système biologique pour observer la mort cellulaire par apoptose [16]–[18].

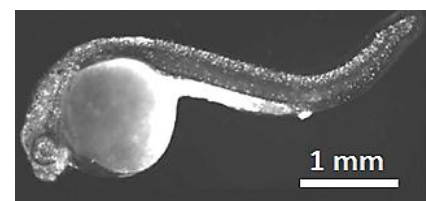


Figure 155 – Observation d'une larve de *zebrafish* [18]

En effet, l'embryon de *zebrafish* en développement présente une prolifération importante de ces cellules, comme les cellules cancéreuses qui ont un métabolisme très actif.

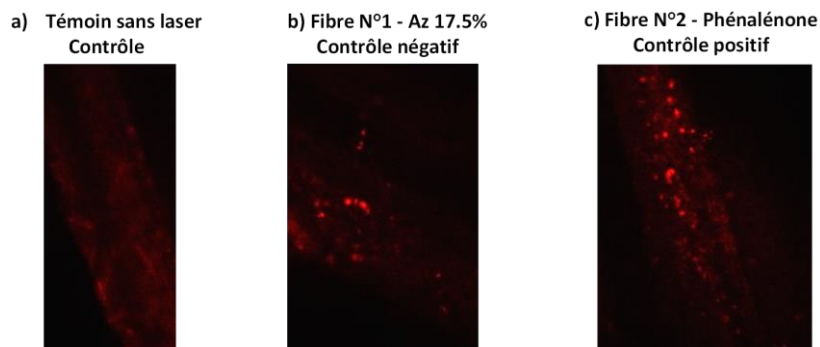
Le protocole proposé par l'équipe de l'IBMM consiste à mettre en évidence les cellules apoptotiques des larves par fluorescence, par coloration orange des zones mortes. Pour cela,





des larves *zebrafish* de la lignée *casper* (mutant transparent sans pigmentation) âgées de 48 heures (heures après la ponte) sont anesthésiées à la tricaine. La fibre optique à tester (référence ou bien fonctionnalisée phénalénone) est ensuite amenée au contact de la larve, puis l'irradiation laser s'effectue durant 5 minutes. La puissance laser est fixée à 20% afin de ne pas endommager la phénalénone (photoblanchiment possible à trop forte puissance). Puis, 24 h après irradiation, les larves sont traitées à l'acridine orange (5 µg/mL) pendant 20 minutes, ce qui colore les zones apoptotiques. Les larves sont ensuite anesthésiées à la tricaine et imagées (objectif x10, imagerie confocale, récupération de l'émission à 650 nm).

**Plusieurs fibres ont servi à réaliser ce protocole sur différentes larves, à savoir une fibre sans phénalénone (Az17,5%) et deux fibres Az17,5% clickées avec la phénalénone. Une autre larve n'ayant pas subi de traitement sert de témoin (Figure 156). La mort cellulaire apoptotique correspond aux points très fluorescents.**



*Figure 156 – Résultats obtenus sur larves de zebrafish dans le cas : d'une larve témoin (a), d'une fibre sans phénalénone avec irradiation laser (b), d'une fibre fonctionnalisée phénalénone et irradiée (c). La mort cellulaire apoptotique correspond aux points très fluorescents.*

D'après les analyses effectuées, il apparaît que la larve témoin ne présente pas de mort cellulaire apoptotique (Figure 156-a). **Une faible mort apoptotique est présente sur la larve mise au contact d'une fibre non fonctionnalisée (Az17,5% sans phénalénone) avec irradiation laser** (Figure 156-b), mais cette apoptose est localisée et pourrait être liée à l'effet du laser, le rayonnement à 405 nm étant ionisant et néfaste pour des cellules biologiques. Par ailleurs, **les larves mises au contact des fibres fonctionnalisées avec la phénalénone et irradiées avec le laser présentent une plus forte apoptose** (Figure 156-c), visible par la présence de nombreux points fluorescents sur une zone très étendue de la larve.

**Les résultats des tests conduits par l'équipe de l'IBMM sur le modèle *zebrafish* et grâce aux fibres optiques préparées conduisent donc à valider la mort cellulaire apoptotique qui intervient lorsque les fibres sont fonctionnalisées avec la phénalénone.** Ces résultats pourraient en outre être reconduits avec des temps d'irradiation et une puissance laser supérieurs afin d'évaluer si l'apoptose est plus importante, dans le but de rechercher une efficacité toujours plus optimale de l'activité de la phénalénone.



## IV.7. Conclusions et perspectives

L'étude du potentiel thérapeutique des fibres optiques fonctionnalisées avec des photosensibilisateurs grâce à la voie sol-gel a constitué une première approche prometteuse. **Deux voies ont été envisagées, à savoir la fonctionnalisation *one-pot* d'une porphyrine tétra-triéthoxysilane et la fonctionnalisation par chimie *click* d'une phénalénone propargylée.** Les travaux réalisés ont tout d'abord permis de caractériser les échantillons préparés, et d'assurer la bonne fonctionnalisation des dépôts pour les deux voies, ce qui a été confirmé par spectroscopie UV d'absorption mais également par spectroscopie infrarouge.

Pour la fonctionnalisation *one-pot* avec la porphyrine tétra-triéthoxysilane, un sol avec 1% de porphyrine a été étudié. L'étude RMN a permis de dégager un temps de vieillissement de ce sol de 36 h, et d'autres caractérisations ont mis en évidence un grossissement rapide des oligomères. Ceci se traduit par la suite au niveau des échantillons préparés par une épaisseur plus importante au niveau des murs de silice du matériau, comme l'a montré l'étude GISAXS. La porosité présente un ordre à très courte distance mais un désordre global, ce qui risque de nuire à l'accessibilité des pores du matériau et par conséquent à la diffusion de l'oxygène singulet produit pour cette voie. La fonctionnalisation par chimie *click* de phénalénone a quant à elle été réalisée sur des échantillons azotures (Az17,5%) et la réaction *click* a été validée par infrarouge avec un très bon rendement (> 90%).

Au niveau de l'activité des photosensibilisateurs, la quantification de l'oxygène singulet est possible pour une puissance maximale de 50% avec le laser 405 nm, en raison d'une dégradation du DMA par le laser pour une puissance supérieure à 50%. Les résultats confirment la production d'oxygène singulet par des microplots réalisés à partir du sol contenant la porphyrine, imprimés sur une fibre optique.

Les tests biologiques ont mis en évidence que la voie *one-pot* semble inefficace. Au contraire, les échantillons fonctionnalisés phénalénone donnent de bons résultats, avec une mort cellulaire importante (baisse de viabilité de 56%). Pour l'application thérapeutique avec des fibres optiques, l'activité de la sonde a été testée sur un modèle vivant de type *zebrafish* et les premiers résultats révèlent une bonne efficacité de cette fonction thérapeutique.

Par rapport aux perspectives, il est envisageable de quantifier la production d'oxygène dans le cas de la phénalénone. Les conditions d'irradiation et les caractéristiques des matériaux pourraient être encore optimisées afin d'améliorer encore ces résultats et les tests de mort cellulaire pourraient être réitérés sur modèle vivant ou sur cellules. De plus, une expérience *in situ* est possible en microscopie confocale, avec différents marqueurs pour suivre en même temps la production d'oxygène singulet, la viabilité et la mort cellulaire.



## Sources – Chapitre 4

---

- [1] Z. Huang, « A review of progress in clinical photodynamic therapy », *Technology in cancer research & treatment*, vol. 4, n° 3, p. 283-293, juin 2005.
- [2] C. Frochot *et al.*, « La thérapie photodynamique: état de l'art et perspectives », 2015.
- [3] G. Bauer, « The Antitumor Effect of Singlet Oxygen. », *Anticancer research*, vol. 36, n° 11, p. 5649-5663, 2016.
- [4] H. Guo, H. Qian, N. M. Idris, et Y. Zhang, « Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 6, n° 3, p. 486-495, 2010.
- [5] J.-P. Mbakidi *et al.*, « Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper », *Carbohydrate Polymers*, vol. 91, n° 1, p. 333-338, janv. 2013.
- [6] F. Wilkinson, W. P. Helman, et A. B. Ross, « Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation », *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 24, n° 2, p. 663-677, 1995.
- [7] Y. Robert Li, *Free Radical Biomedicine: Principles, Clinical Correlations, and Methodologies*. Bentham Science Publishers, 2012.
- [8] N. Soh, « Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 386, n° 3, p. 532–543, oct. 2006.
- [9] G. Garcia, F. Hammerer, F. Poyer, S. Achelle, M.-P. Teulade-Fichou, et P. Maillard, « Carbohydrate-conjugated porphyrin dimers: synthesis and photobiological evaluation for a potential application in one-photon and two-photon photodynamic therapy », *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 21, n° 1, p. 153—165, janv. 2013.
- [10] A. B. Ormond et H. Freeman, « Effects of substituents on the photophysical properties of symmetrical porphyrins », *Dyes and Pigments*, vol. 96, p. 440–448, 2013.
- [11] A. Jiblaoui, « Synthèse et caractérisations de nouveaux photosensibilisateurs à absorption bi-photonique en vue de leurs applications en thérapie photodynamique ». Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2013.
- [12] V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, et N. Tavernarakis, « Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1833, n° 12, p. 3448-3459, 2013.
- [13] L. C. Crowley, B. J. Marfell, M. E. Christensen, et N. Waterhouse, « Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy », *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2016, p. pdb.prot087155, 2016.
- [14] T. Mosmann, « Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays », *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, n° 1, p. 55-63, 1983.



- [15] M. D. Maines, « [32] - Heme Oxygenase 1 Transgenic Mice as a Model to Study Neuroprotection », in *Redox Cell Biology and Genetics Part B*, vol. 353, C. K. Sen et L. Packer, Éd. Academic Press, 2002, p. 374-388.
- [16] P. M. Eimon, « Chapter Sixteen - Studying Apoptosis in the Zebrafish », in *Regulated Cell Death Part A: Apoptotic Mechanisms*, vol. 544, A. Ashkenazi, J. Yuan, et J. A. Wells, Éd. Academic Press, 2014, p. 395-431.
- [17] T. J. van Ham, J. Mapes, D. Kokel, et R. T. Peterson, « Live imaging of apoptotic cells in zebrafish », *The FASEB Journal*, vol. 24, n° 11, p. 4336-4342, 2010.
- [18] D. Verduzco et J. F. Amatruda, « Chapter 2 - Analysis of Cell Proliferation, Senescence, and Cell Death in Zebrafish Embryos », in *The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology, Part B*, vol. 101, H. W. Detrich, M. Westerfield, et L. I. Zon, Éd. Academic Press, 2011, p. 19-38.





## Conclusion générale

---

L'objectif de ces travaux de thèse visait à **fiabiliser et optimiser la sensibilité de détection d'un dispositif préindustriel permettant le diagnostic de cancers, ainsi que d'évaluer l'efficacité en termes de thérapie non-invasive, et ceci en ayant recours à des sondes optiques fonctionnalisées.**

L'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre de ce mémoire, a montré la pertinence du dispositif développé, par rapport aux autres méthodes déjà existantes. En effet, les techniques endoscopiques actuelles constituent une aide au diagnostic, mais les études comparatives réalisées ne montrent pas de réelle prédominance de l'une des techniques par rapport aux autres. Ceci peut s'expliquer par la multitude et la variété des cas de cancers, ce qui complexifie leur mise en évidence. En effet, les cancers se déclinent en plusieurs types (carcinomes, sarcomes, leucémies, lymphomes, etc.), ils sont présents sous ces différentes formes à de multiples localisations dans le corps (œsophage, estomac, intestin, colon, poumon, sein, vessie, utérus, etc.) et à plusieurs stades d'évolution. **Le dispositif développé vise à cibler des marqueurs surexprimés à la surface de tout type de cellules cancéreuses, à savoir les marqueurs TrkB ou EGFR, afin de déterminer par simple contact avec la zone suspecte si celle-ci est cancéreuse ou non.** Le dispositif présente alors un intérêt majeur, car il n'existe à ce jour aucune méthode de diagnostic *in situ*, ce diagnostic étant laissé à l'appréciation visuelle des praticiens ou étant réalisé par le biais de prélèvements (biopsies). Par la suite, la mise en évidence d'autres marqueurs biologiques permettraient d'identifier de façon plus précise le type de cancer en présence, ce qui revêt un intérêt majeur pour l'établissement du plan de soin du patient. **Le dispositif vise également à réaliser la thérapie locale de la zone préalablement diagnostiquée, et le couplage diagnostic-thérapie est inédit pour un tel dispositif. De plus, la thérapie étant locale et ciblant majoritairement les cellules cancéreuses, ceci présenterait moins de risques invasifs et moins de complications post-opératoires par rapport à d'autres méthodes existantes ou actuellement en développement.**

L'étude présente également un aspect pluridisciplinaire important, car se situe à l'interface de différents domaines : matériau, chimie, biologie et optique. En effet, le dispositif est constitué de fibres optiques à la surface desquelles sont déposés des microplots de silice mésoporeuse par utilisation du procédé d'impression jet d'encre. Ces microplots sont réalisés à partir d'un sol contenant un composé « AzPTES » qui apporte des fonctions azotures au matériau et permet ainsi de le fonctionnaliser ultérieurement par chimie *click* avec des composés alcyne. Dans le cadre du diagnostic, ces microplots sont fonctionnalisés tout d'abord par un espaceur alcyne de type pentynoate de NHS, permettant ensuite l'accroche de



protéines G et des anticorps anti-TrkB ou anti-EGFR. Ces anticorps assurent la détection spécifique des marqueurs TrkB ou EGFR, surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Ces protéines et anticorps sont préalablement marqués par des fluorochromes pour réaliser un suivi de la fluorescence par le dispositif. **Le principe de détection repose sur une modification de la signature en fluorescence, résultant d'un transfert d'énergie de fluorescence (effet FRET), intervenant lors de la reconnaissance de sa cible par l'anticorps, qui change de conformation.** Dans le cadre de la thérapie, les microplots azotures sont fonctionnalisés par chimie *click* au moyen de photosensibilisateurs, qui, lorsqu'ils sont excités par une source compatible, induise une production d'oxygène singulet occasionnant une mort cellulaire par apoptose.

Au cours du deuxième chapitre, la structure de la porosité du matériau a été étudiée en fonction de plusieurs paramètres du procédé. **L'objectif visait à déterminer s'il existe une structure de porosité qui maximise la fonctionnalisation ultérieure des microplots** (par chimie *click* et pour le greffage des biomolécules), **et également de pouvoir conclure sur des conditions d'impression permettant d'aboutir à la structure de porosité recherchée.** En premier lieu, il est utile de préciser que la porosité est obtenue à partir d'un mécanisme d'auto-assemblage du matériau, et résulte des cinétiques d'hydrolyse-condensation du sol utilisé lors de l'impression. Ces cinétiques d'hydrolyse-condensation ont été suivies par RMN liquide du <sup>29</sup>Si pour étudier le comportement des sols à différents taux d'AzPTES (10%, 15% et 17,5%). **Les résultats de ces analyses ont mis en avant le fait que les sols avec 10% et 15% d'AzPTES ont une condensation similaire et pourraient donc présenter des tailles de pores et des distances entre pores assez proches.** Ces deux sols présentent une bonne incorporation du composé AzPTES et peuvent être imprimés pour un temps de vieillissement de 48 h. Le sol Az17,5% présentait un comportement singulier, avec une incorporation du composé AzPTES qui ne semble pas totale, mettant en avant une possible condensation des molécules d'AzPTES entre elles, donnant lieu par la suite à une inhomogénéité dans la répartition des fonctions azotures au sein du matériau. De plus, **le sol Az17,5% présente une condensation beaucoup plus lente que les deux autres sols**, avec un temps de vieillissement optimal autour de 61 h. Des réseaux de microplots ont été réalisés par impression jet d'encre à partir de ces sols.

**En vue de maximiser la densité de microplots en surface des échantillons, le réseau hexagonal a été adopté.** L'étude de l'influence des paramètres du procédé sur la structuration de la porosité a été réalisée, et des tests croisés ont aussi permis de savoir l'ordre de prédominance des facteurs entre eux. En effet, **le facteur ayant le plus d'influence sur la porosité du matériau est le taux d'AzPTES du sol, qui donne lieu à une structure rectangulaire centrée (ordonnée) en-dessous de 10% d'AzPTES, et une structure**



**vermiculaire (désordonnée) au-dessus de 10%.** Le taux de 10% d'AzPTES semble intermédiaire car les deux types de structuration sont parfois observés pour cette formulation, en fonction des autres paramètres utilisés. **L'augmentation du nombre de couches déposées favorise l'apparition de la structure vermiculaire**, ce qui serait attribué à une accumulation de solvant dans le matériau, qui n'aurait alors pas le temps de s'organiser et verrait sa structure d'autant plus désorganisée par le dépôt de la couche suivante. L'espacement entre les plots et la stratégie de dépôts (impression continue ou bien un plot sur deux, une ligne sur deux) ont également une influence sur la porosité. En effet, **l'augmentation de l'espacement entre microplots favorise une structure de type vermiculaire**, car l'écartement des microplots augmenterait la vitesse de séchage, ce qui ne laisserait pas au matériau le temps de se structurer. **La stratégie de dépôt joue également un rôle, car le fait d'imprimer les microplots suivant une maille trapèze** (un plot sur deux et une ligne sur deux) **revient à espacer les dépôts successifs et à figer ainsi la structuration vermiculaire**, bien que la densité globale de microplots ne varie pas.

Aussi, **si la structure de type rectangulaire centrée est recherchée**, il convient alors d'adopter un taux d'AzPTES inférieur à 10%, un taux d'humidité d'environ 40%, pour un mode d'impression en stratégie libre et un faible nombre de couches (entre 1 et 5). **Si la structuration de la mésoporosité de type vermiculaire est recherchée**, les paramètres pourront être ajustés de la façon suivante : un taux d'AzPTES supérieur à 10% et inférieur à 17,5%, et la possibilité d'imprimer les microplots selon une stratégie de type trapèze.

Par ailleurs, des tests supplémentaires, concernant le temps de vieillissement et les conditions de recuit du matériau, ont été réalisés et ont montré une influence sur la porosité. **Un sol Az10% imprimé à 24 h de vieillissement présente une structuration rectangulaire centrée plus importante que pour un sol Az10% imprimé à 48 h de vieillissement.** Ceci peut être dû à une condensation incomplète des oligomères de silice à 24 h qui, lors du mécanisme d'auto-assemblage, auraient tendance à former des domaines plus étendus de structure rectangulaire centrée, du fait d'une réactivité plus forte des oligomères. Par ailleurs, **attendre plusieurs jours entre l'impression et le recuit des échantillons permet de favoriser la structuration rectangulaire centrée.** En effet, un recuit directement après impression favorise une structure vermiculaire dont les paramètres de réseau sont très hétérogènes, en termes de distance entre les pores et d'agencement des micelles cylindriques. D'autres tests ont porté sur un nouveau mode de recuit des échantillons qui permet de gagner beaucoup de temps par rapport à un recuit classique en étuve : le recuit photonique. Ce type de recuit consiste à éclairer les échantillons avec un flash lumineux de forte intensité qui permet la consolidation de réseaux poreux de types microplots ou autres types de couches minces. Lorsque les conditions sont bien ajustées, **il apparait que le recuit**





photonique permet de consolider efficacement le matériau, et d'éviter une contraction de la structure des dépôts. Ceci permet d'avoir des pores plus dilatés et des échantillons plus réactifs, notamment pour une fonctionnalisation par chimie *click*, comme l'ont montré les tests réalisés à cet effet.

Par la suite, le chapitre III a porté sur les différents aspects de fonctionnalisation du matériau : la fonctionnalisation par chimie *click* d'un espaceur de type pentynoate de NHS, puis le greffage de protéines G, permettant par la suite l'accroche des anticorps spécifiques et nécessaires à la reconnaissance des marqueurs cancéreux ciblés. Dans cette étude, les marqueurs ciblés ont été le marqueur de type TrkB principalement, ainsi que le marqueur EGFR, ces deux marqueurs étant surexprimés à la surface des cellules cancéreuses.

Dans un premier temps, l'étude a porté sur la fiabilisation et l'optimisation de la réaction *click*. Un traitement de lavage de la porosité était utilisé préalablement à cette réaction *click*, afin d'éliminer le tensioactif F127 et rendre accessibles les fonctions azotures présentes dans les pores du matériau. Il est apparu qu'un lavage en soxhlet n'était pas reproductible et entraînait par ailleurs une casse importante des microplots sur les échantillons. Diverses conditions de lavage ont été étudiées : en soxhlet, en bain marie, sous ultrasons et avec différents solvants. En réalité, la réaction *click* se fait très bien sans cette étape préalable de lavage de la porosité, du fait d'une bonne diffusion du F127 une fois les échantillons immergés dans la solution *click*. Pour cette raison, le lavage a été maintenu mais réduit à environ 1 h en bain marie dans de l'éthanol chaud pour éliminer un maximum de F127.

De plus, lors de la réaction *click* du pentynoate de NHS, des problèmes de reproductibilité avaient été constatés très tôt, au niveau du greffage ultérieur des biomolécules (protéines ou anticorps). Ceci semblait indiquer un mauvais greffage du pentynoate de NHS utilisé ou bien sa possible dégradation. Le pentynoate de NHS est donc stocké en dessiccateur dès sa réception, ce qui permet de le garder à l'abri de l'humidité et le conserver plus longtemps. Les conditions de la réaction *click* ont été ajustées afin de fiabiliser et optimiser cette étape. Différents systèmes catalytiques ont été testés pour essayer de travailler en conditions anhydres, car la présence d'eau accentue la dégradation des microplots de silice. Les solvants utilisés n'ont pas montré de nette amélioration de la réaction et le solvant DMSO/Eau en rapport volumique 1:1 a été conservé. Chauffer la solution au cours de la réaction s'est avéré pertinent pour améliorer la cinétique, et obtenir des rendements bien supérieurs à ceux obtenus précédemment. De plus, les quantités (en équivalents molaires) utilisées pour préparer la solution *click* ont été adaptées afin d'obtenir un rendement très supérieur (> 90%) et qui s'avère reproductible : 40 équivalents de



pentynoate de NHS, 40 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté et 40 équivalents d'ascorbate de sodium.

Une fois le protocole de la réaction *click* défini, celui-ci a été utilisé pour fonctionnaliser des échantillons pour des conditions d'impression différentes. En particulier, **pour un même taux d'azotures, les échantillons présentant une structuration de la porosité de type vermiculaire s'avèrent mieux fonctionnalisés que des échantillons ayant une structuration de type rectangulaire centrée.** Ceci s'explique par une meilleure accessibilité de la porosité lorsqu'elle est de type vermiculaire. **L'augmentation du taux d'azotures dans les échantillons va également en faveur d'une meilleure fonctionnalisation,** en considérant les résultats de façon relative, c'est-à-dire le nombre de fonctions azotures clickées par rapport au nombre de fonctions azotures total. Cette réaction *click* obéit à une cinétique de type diffusion, comme l'ont montré les tests avec différents nombres de couches : **des échantillons avec un faible nombre de couches (donc une plus faible épaisseur de diffusion) sont mieux fonctionnalisés que des échantillons avec un nombre de couches plus important,** qui présentent par ailleurs une casse plus importante. Il semble cependant inutile que les échantillons soient fonctionnalisés avec le pentynoate de NHS dans tout leur volume, car le greffage des protéines, en raison de leur encombrement par rapport aux pores, se ferait préférentiellement en surface des microplots.

Enfin, des tests ont porté sur le lavage post-réaction *click*, nécessaire à l'élimination du cuivre résiduel au sein du matériau, ce dernier étant toxique pour l'organisme. **Les protocoles de lavage ont pu être optimisés afin de maximiser l'élimination du cuivre, tout en diminuant le nombre de lavages.** Dans une optique d'industrialisation du procédé, ces étapes pourraient par la suite être réalisées par des automates. Ainsi, les travaux portant à la fois sur l'optimisation des protocoles de lavage de la porosité, de réaction *click* et de lavage post-réaction *click* ont permis de **réduire considérablement le temps de préparation des échantillons, qui était de 4 jours auparavant, et est désormais de 8 heures.**

**Dans un deuxième temps, la fonctionnalisation a porté sur l'étude du greffage des protéines G.** Tout d'abord, l'étude a porté sur le protocole de marquage des protéines en fluorescence, et de montrer sa fiabilité, bien que du fluorochrome libre puisse parfois échapper à l'étape de filtration en colonne. Par la suite, **le protocole de greffage des protéines a été vérifié et met en évidence que la concentration utilisée (150 µg/mL) est optimale pour greffer les protéines de façon dense sur les échantillons.** Ce protocole de greffage des protéines a ensuite été testé pour différents types de matériau. D'une part, **l'étude a montré que le greffage est plus efficace pour des échantillons présentant la structuration de type vermiculaire en surface, plutôt que des échantillons avec une structuration de type rectangulaire centrée, pour un même taux d'azotures (10%).** D'autre part, l'augmentation



**du taux d'azotures (de 10% à 17,5%) ne privilégie en revanche pas une meilleure accroche des protéines**, en raison d'une répartition inhomogène des fonctions azotures pour 17,5%. Il faudrait tester ceci pour un taux d'azotures de 15% et voir si la répartition des protéines est aussi homogène que pour un taux d'azotures de 10%, ce qui s'avérerait alors intéressant afin de maximiser le nombre de protéines en surface des échantillons. Par la suite, il est apparu que **le greffage des anticorps suit la tendance de greffage des protéines, avec un greffage qui apparait homogène et avec une bonne densité pour les échantillons avec 10% d'azotures et de structuration vermiculaire, mais qui n'est pas homogène pour les autres conditions testées**. Encore une fois, il serait pertinent de tester des échantillons avec 15% d'azotures et voir si le greffage des protéines et des anticorps est encore meilleur pour ce taux. En outre, la connaissance des données physiques des fluorochromes (rendement quantique, coefficient d'extinction molaire) ainsi que le taux de marquage (DOL) et la mesure des intensités d'émission de ces fluorochromes **permettent de déterminer un nombre d'anticorps greffé par protéine**, donnée importante par la suite en vue de caractériser la sensibilité de détection du dispositif.

Enfin, **le chapitre III a permis d'aboutir à des tests de détection des cellules cancéreuses, par des tests de reconnaissance des antigènes cibles des anticorps utilisés lors de la fonctionnalisation des sondes**. Dans un premier temps, les protocoles d'impression et de fonctionnalisation ont pu être adaptés pour la préparation de fibres optiques. En parallèle, des tests de détection ont été réalisés, avec l'utilisation de plusieurs couples de fluorochromes, à la fois en voie liquide et en voie supportée, c'est-à-dire sur des échantillons de microplots fonctionnalisés. **Il est apparu que le couple de fluorochromes AF594-AF647 n'était pas un bon candidat, en raison notamment d'une faible intensité d'émission du fluorochrome AF647**. Aussi, pour ce couple, le rayon de Förster ( $R_0$ , distance des fluorochromes correspondant à 50% d'intensité du transfert d'énergie), ne semble pas compatible avec les tailles des protéines et anticorps utilisés, et risquerait d'induire la présence d'un effet FRET en absence des marqueurs ciblés, ce qui se traduirait par un fort risque de faux-positifs ce qui est à exclure. **Les couples AF546-AF594 et AF488-AF594 sont compatibles avec l'utilisation recherchée et ont montré des résultats très intéressants *in situ* sur deux modèles vivants** : une membrane d'embryon de poulet ainsi qu'un modèle de souris, préalablement greffées avec une tumeur précancéreuse. **Les valeurs de sensibilité obtenues dans les conditions testées ont bien traduit la surexpression des marqueurs TrkB ou EGFR**. Des contrôles, réalisés systématiquement, ont également permis de vérifier dans chaque cas que la réponse était spécifique aux cellules cancéreuses, ce qui permet de discriminer les cellules cancéreuses des cellules saines.

Concernant les perspectives à exploiter par rapport aux tests de détection, il apparaît que **les valeurs de détection obtenues sont propres à la souche cancéreuse, qui se traduit par un degré d'expression différent des marqueurs d'une souche de cancer à une autre.** Il faudrait donc quantifier l'expression de ces marqueurs pour chaque configuration testée. Plusieurs types de souches peuvent être testés pour établir des efficacités de détection par les sondes préparées. Ceci pourrait être réalisé une fois les sondes optimisées. Pour cela, il apparaît pertinent de tester un taux d'azotures de 15% en vue de maximiser le nombre de protéines greffées sur les échantillons, ce qui maximiserait le nombre d'anticorps. **Certains paramètres n'ont pas été testés mais semblent intéressants, comme la variation des rapports de DOL donneur/accepteur, ainsi que la variation des rapports des nombres de biomolécules anticorps/protéines.** Ceci pourrait être réalisé de plusieurs façons, notamment en utilisant une protéine G cystéine, qui permettrait un greffage de davantage d'anticorps et favoriserait une accroche de l'anticorps perpendiculairement à la surface des microplots. Par ailleurs, la synthèse d'anticorps de type « *flashbody* », c'est-à-dire incorporant une protéine fluorescente lors de leur synthèse, permettrait de maîtriser la chimie de l'anticorps, à savoir notamment la position du fluorochrome sur l'anticorps ainsi que le degré de marquage, afin de fiabiliser d'autant plus le procédé de fabrication des sondes. **Une fois les différentes conditions établies, des tests sur modèles vivants pourront être réitérés afin de quantifier la sensibilité pour différentes souches de cancers et différentes configurations.** Ceci permettrait d'obtenir des données de référence, nécessaires avant toute commercialisation des sondes. La reconnaissance de plusieurs souches de cancers en une seule fois pourra être envisagée, du fait de l'adaptabilité du procédé jet d'encre et la possibilité de réaliser des sondes multimatériaux avec différentes fonctionnalisations.

Enfin, **le dernier chapitre a porté sur les tests de thérapie**, par la fonctionnalisation des sondes grâce à des photosensibilisateurs permettant de produire de l'oxygène singulet et de détruire les cellules cancéreuses. Les tests préliminaires avaient montré une mauvaise réaction *click* avec des porphyrines mono-alcynes ou même tétra-alcynes, du fait très probablement d'une taille trop importante de la porphyrine. Deux voies ont été envisagées pour pallier à cela, à savoir la **fonctionnalisation *one-pot* d'une porphyrine tétra-triéthoxysilane (avec 1% de porphyrine) qui s'intégrerait au sein du réseau de silice par co-condensation avec le TEOS, ainsi que la fonctionnalisation par chimie *click* d'une molécule plus petite, une phénalénone propargylée (clickée sur un réseau azotures Az17,5%).** Les résultats ont permis de **valider la production d'oxygène singulet dans le cas d'une fibre optique fonctionnalisée avec la porphyrine.** Cette production d'oxygène singulet produite en 20 minutes par une fibre avec 32 microplots a été estimée à 0,12  $\mu\text{mol}$



pour une intensité du laser de 50% à 405 nm. La quantification de l'oxygène singulet produit dans le cas de la phénalénone reste à déterminer.

Par ailleurs, toujours dans le cadre de la thérapie, **des tests biologiques préliminaires ont permis d'établir un protocole pour réaliser des tests *in situ* grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo***. Les tests préliminaires réalisés ont mis en évidence que la voie *one-pot* semblait inefficace en termes de mort cellulaire. Au contraire, **les échantillons fonctionnalisés avec la phénalénone donnent de bons résultats, avec une mort cellulaire importante (baisse de viabilité de 56%)**. L'activité de sondes fonctionnalisées avec la phénalénone a également été testée sur un modèle vivant de type *zebrafish* et **les résultats orientent vers une bonne efficacité de cette fonction thérapeutique**. En perspective, il est possible d'améliorer davantage les conditions d'irradiation et les conditions matériaux afin d'améliorer l'efficacité des sondes en termes de mort cellulaire. Des tests pourraient être réitérés sur modèle vivant ou sur cellules, et avec différents types de souches cancéreuses pour caractériser l'efficacité de la PDT dans chaque cas. De plus, une expérience *in situ* est possible en microscopie confocale, en atmosphère contrôlée, pour suivre en même temps la production d'oxygène singulet, la viabilité et la mort cellulaire, au moyen de différents marqueurs fluorescents.

**Ces travaux s'avèrent donc prometteurs en vue du développement d'un outil qui serait pertinent pour réaliser à la fois le diagnostic et la thérapie de cancers précoces**. De façon globale, ces travaux ont permis de mieux comprendre le comportement des échantillons réalisés grâce à l'impression jet d'encre, notamment en termes de structuration et son influence sur les étapes de fonctionnalisation. Les protocoles de fonctionnalisation ont été optimisés et surtout fiabilisés, pour obtenir des résultats reproductibles.

**Un dépôt de brevet a eu lieu au cours de ces travaux de thèse, qui souligne notamment les avancées réalisées en vue de l'industrialisation des procédés de réalisation et de fonctionnalisation des sondes**. Ceci vient valoriser le travail réalisé sur un sujet complexe, avec une interdépendance entre différents domaines comme les sciences des matériaux, la chimie des matériaux, la biologie ou l'optique.







## Annexes

- Annexe 1. Marqueurs jouant un rôle dans le développement d'un cancer
- Annexe 2. Principaux traitements anti-cancéreux, description et risques
- Annexe 3. Impression jet d'encre : équipement Ceraprinter X series
  - 3.1 Descriptif de l'appareil utilisé
  - 3.2 Ajustement de l'éjection des encres
  - 3.3 Configuration des réseaux à imprimer par tranchage CAO
  - 3.4 Dépôts de microplots par impression jet d'encre : paramètres de réglage
- Annexe 4. Caractérisation des sols par suivi en RMN liquide du <sup>29</sup>Si
  - 4.1 Introduction à la technique
  - 4.2 Spectres RMN de sols avec différents taux d'AzPTES : 10, 15 et 17,5%
  - 4.3 Spectres RMN d'un sol porphyrine, par comparaison avec un sol standard
- Annexe 5. Caractérisations des propriétés physico-chimiques des sols
  - 5.1 Descriptif des techniques utilisées
    - 5.1.1 Mesure de viscosité
    - 5.1.2 Mesure de tension de surface
    - 5.1.3 Mesure de taille d'oligomère par diffusion dynamique de la lumière (DLS)
  - 5.2 Résultats des caractérisations des sols
- Annexe 6. Caractérisations par spectroscopie
  - 6.1 Descriptif de plusieurs techniques utilisées
    - 6.1.1 Spectroscopie FTIR
    - 6.1.2 Spectroscopie IR en mode ATR
    - 6.1.3 Spectroscopie Raman
    - 6.1.4 Spectroscopie UV-visible
  - 6.2 Contrôle de la composition des encres par spectroscopie FTIR
  - 6.3 Caractéristiques des molécules utilisées
- Annexe 7. Techniques pour caractériser la structuration de la mésoporosité
  - 7.1 Microscopie électronique en transmission
  - 7.2 Microscopie à force atomique (AFM)
  - 7.3 Diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante (GISAXS)
- Annexe 8. Principe du recuit photonique
- Annexe 9. Protocole de biofonctionnalisation des microplots mésoporeux
- Annexe 10. Caractérisation par microscopie confocale
- Annexe 11. Protocole de synthèse du pentynoate de NHS
- Annexe 12. Protocole de marquage des Protéines G
- Annexe 13. Protocole de marquage des Anticorps anti-TrkB
- Annexe 14. Estimation de la quantité d'alcyne clickés par dosage UV-visible de p-nitrophénol
- Annexe 15. Démonstrations d'équations utilisées pour traiter les données de fluorescence
  - 15.1 Caractéristiques des fluorochromes utilisés
  - 15.2 Démonstration des équations de fluorescence
  - 15.3 Calcul de l'intégrale  $J(\lambda)$  pour les couples de fluorochromes
- Annexe 16. Protocole de synthèse des photosensibilisateurs





16.1 Protocole de synthèse de la porphyrine tétra-triéthoxysilane

16.2 Protocole de synthèse de la phénalénone propargylée

Annexe 17. Protocole de dosage MTT pour estimer la viabilité cellulaire

17.1 Préparation de la solution stock de MTT

17.2 Préparation de la solution de solubilisation

17.3 Incorporation du MTT par les cellules

17.4 Dosage par spectroscopie UV



## Annexe 1. Marqueurs jouant un rôle dans le développement de cancers

Capacité	Marqueur / Gène / protéine affilié(e)	Description des effets
Maintien de la propagation des signaux	Récepteur de surface, tyrosine kinase	Les récepteurs de surface favorisent la réception des signaux externes et des transducteurs favorisent l'envoi d'informations
Maintien de la croissance cellulaire	Protéases, sulfatases, enzymes dans la membrane cellulaire	Régulent les facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses produisent des ligands récepteurs et induisent ainsi une autostimulation de croissance
Mutations du génome	PI3-kinase muté (transducteur Akt/PKB)	Promulgue la naissance de la tumeur.
	B-Raf protéine mutée	Promulgue la division cellulaire par stimulation des récepteurs MAP-kinase ( <i>mitogen-activated protein</i> )
	Ras gène muté	Compromet l'activité de la Ras GTPase, qui permet de vérifier la bonne transmission des signaux cellulaires
Dérégulation des mécanismes de contrôles	PTEN et mTOR inhibés	Amplification des fonctions de PI3K PTEN et mTOR sont des agents dans la régulation de la croissance et du métabolisme cellulaires
Régulation des populations de cellules cancéreuses	Oncoprotéines RAS, MYC, RAF	Induisent le vieillissement cellulaire prolongé (senescence) ou la mort cellulaire programmée (apoptose)
	Enzyme $\beta$ -galactosidase	Induit le vieillissement cellulaire prolongé (senescence)
Esquive des supresseurs de croissance	TP53	Stoppe la prolifération cellulaire si présence d'un stress oxydatif et peut induire la senescence ou l'apoptose
	RB	Capte les signaux extracellulaires et décide si la cellule doit réaliser son cycle de croissance/division
Inhibition de la croissance	Gène NF2, Merlin	Merlin est un cytoplasmide régulant l'inhibition de croissance par contact et réduit les signaux de mitose en séquestrant les récepteurs de facteurs de croissance
	LKB1, protéine épithéliale	Rôle de supresseur de certaines cellules si leur prolifération est inappropriée
	$\beta$ -TGF	Effet d'anti-prolifération des cellules cancéreuses à des stades précoces. Pour des tumeurs en stade avancé, induit la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, productrices de cellules malignes.



Capacité	Marqueur / Gène / protéine affilié(e)	Description des effets
<b>Résistance face à la mort cellulaire</b>	Protéines Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w-Mcl-1, A1	Concentration plus forte en présence de cancer. Inhibent la mort cellulaire par apoptose, par liaison d'inactivation avec des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak
	Bax et Bak	Rompent la membrane mitochondriale, relâchant des protéines de signal pro-apoptotique, dont le cytochrome c
	Cytochrome c, capcases 8 et 9	Le cytochrome c active la production des capcases, protéases détruisant la cellule
	BH3-only protéines (telles Noxa, Puma,...)	Concentration plus faible si cancer. Rôle pro-apoptotique par interaction avec des protéines Bcl-2. Surexprimée par TP53.
	Myc oncoprotéine	Favorise l'apoptose (par le biais de Bim, une BH3-only protéine)
<b>Résistance face à l'autophagie</b>	PI3K, AKT, mTOR	Apoptose et autophagie induites si peu de signaux détectés par PI3K, qui est maintenu en cas de cancers, donc pas d'autophagie.
<b>Inflammation par nécrose, favorable au développement de la tumeur</b>	IL-1 $\alpha$	La nécrose de certaines cellules cancéreuses permet de disséminer leur contenu (comme IL-1 $\alpha$ qui promulgue la prolifération cellulaire), et de recruter des cellules du système immunitaire.
<b>Réplication à l'infini</b>	Téломérase (ADN polymérase)	Répare la dégradation progressive de l'ADN lors de la réplication des cellules, induit une résistance à l'apoptose et à la senescence.
<b>Création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse)</b>	Gene VEGF-A VEGFR (1 à 3)	Inducteurs d'angiogenèse
	FGF	Aide au maintien de l'angiogenèse
	TSP-1	Contre-acteur dans le mécanisme d'angiogenèse
<b>Invasion et métastase</b>	E-cadhérine (adhésion des cellules épithéliales entre elles) N-cadhérine	Une augmentation importante de l'E-cadhérine ou la N-cadhérine joue un rôle dans l'invasion et la métastase. Migration par le biais des voies sanguines et lymphatiques.
	CCL5/RANTES	CCL5 produit par les cellules souches mésenchymateuses, qui stimulent le caractère invasif des cellules.
	Macrophages TAMs IL-4 & EGF	Enzymes apportés par les macrophages et favorisant l'invasion en détruisant la matrice cellulaire. Macrophages recrutés par le biais du marqueur IL-4



## Annexe 2. Principaux traitements anti-cancéreux, description et risques

Traitement	Principe d'action	Risques et complications possibles
<b>Chirurgie :</b> Opération locale	<b>Enlever la majeure partie de la tumeur (résection) sur une zone plus large que la tumeur</b> (déterminé par biopsie). Un examen extemporané peut servir de contrôle à la qualité de la résection. Un <b>curage ganglionnaire</b> peut être réalisé.  La chirurgie peut également être reconstructrice (ex : cancer des os).	<b>Infection, hémorragie, fistule</b> (canal de communication anormal entre deux organes), <b>douleur, insuffisance d'organe, complications d'anesthésie</b>  N'est pas réalisée si la fonction de l'organe ne peut pas être maintenue après résection (ex : insuffisance rénale, respiration précaire)
<b>Radiothérapie :</b> Application externe ou bien au contact (curiethérapie)	<b>Utilisation de rayonnements ionisants.</b> Altère directement les molécules biologiques. Radiolyse de l'eau et formation de radicaux libres fortement oxydants.  La dose à délivrer est déterminée avant, et doit maximiser la dose reçue par la tumeur tout en minimisant celle reçue par les tissus sains.	<b>Risques de cancers secondaires. Diarrhées, vomissements, dysphagie, œsophagite. Pas d'exposition au soleil pendant un an.</b>  <b>Protections nécessaires des yeux, des organes génitaux et des dents</b> , avec port post-exposition de gouttières fluorées en bouche (5 min par jour à vie).
<b>Chimiothérapie :</b> Administration d'anti-cancéreux par voie intraveineuse	<b>Molécules entraînant l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort cellulaire</b> , sur toutes les cellules (saines et cancéreuses), action privilégiée sur les cellules cancéreuses qui réalisent davantage leur cycle cellulaire.  <b>Faite avant chirurgie pour diminuer la taille de la tumeur ou après chirurgie pour diminuer les risques de rechute.</b>	<b>Toxicité importante pour tous les organes.</b>  <b>Anémie, leucémie, nausées et vomissements fréquents, diarrhées ou constipation, éruption cutanée, insuffisance cardiaque, pneumopathie, insuffisance rénale aiguë, hépatite, cystite, stérilité.</b>
<b>Thérapies ciblées :</b> Administration par voie intraveineuse ou application locale	<b>Inhibition d'un mécanisme précis de prolifération du cancer ciblé. Action sur les cellules cancéreuses uniquement.</b>  <b>Exemples :</b> inhibiteur de protéine tyrosine kinase BCR-ABL (leucémie), anti-HER2 (cancer du sein), anticorps monoclonal anti-récepteur EGF ou anti-VEGF	Moins d'effets secondaires que les chimiothérapies (traitement ciblé).  <b>Insuffisance cardiaque réversible, allergies, syndrome hémorragique, troubles digestifs, anémie, diarrhées, éruption cutanée.</b>
<b>Hormonothérapie :</b> Cas des cancers du sein, de la prostate et de l'endomètre	<b>Bloquer les communications hormonales utilisées par les tumeurs</b> , soit en diminuant la production hormonale, soit en bloquant le récepteur hormonal	<b>Introduction initiale peut provoquer une croissance rapide de la tumeur et des métastases</b> (surtout osseuses).  <b>Andropause dans le cas du cancer de la prostate :</b> trouble de la libido, dysfonction érectile, prise de poids  <b>Ménopause induite dans le cas du cancer du sein :</b> bouffées de chaleur, irritabilité, prise de poids. <b>Risque de cancer de l'endomètre et ostéoporose.</b>
<b>Immunothérapie :</b> Voie intraveineuse	<b>Stimulation de la réponse immunitaire et restauration de l'immunité naturelle</b>	Syndrome pseudo-grippal, dépression, manifestations auto-immunes, diarrhées, fatigue, nausées, vomissements.



## Annexe 3. Impression jet d'encre : équipement Ceraprinter X series

### 3.1 Descriptif de l'appareil utilisé

Le dispositif utilisé dans le cadre de ces travaux est un **équipement de type Ceraprinter X-Série, commercialisé par la société Ceradrop, Groupe MGI** (Figure A157-a). Il est composé de 5 axes, dont trois axes de translation x, y et z classiques, ainsi que deux axes de rotation  $\theta$  et  $\varphi$  (Figure A157-b).

Ce procédé de prototypage rapide permet, grâce à ses 3 têtes d'impression, la fabrication de structures bi ou tridimensionnelles multimatériaux par dépôts successifs de suspensions de particules céramiques<sup>1</sup> ou de solutions de précurseurs (Figure A157-c). **Cet équipement permet en particulier de réaliser des dépôts de type « microplots », correspondant à l'impact de gouttes individualisées sur un substrat, selon une configuration prédéfinie comme explicité ci-après.**

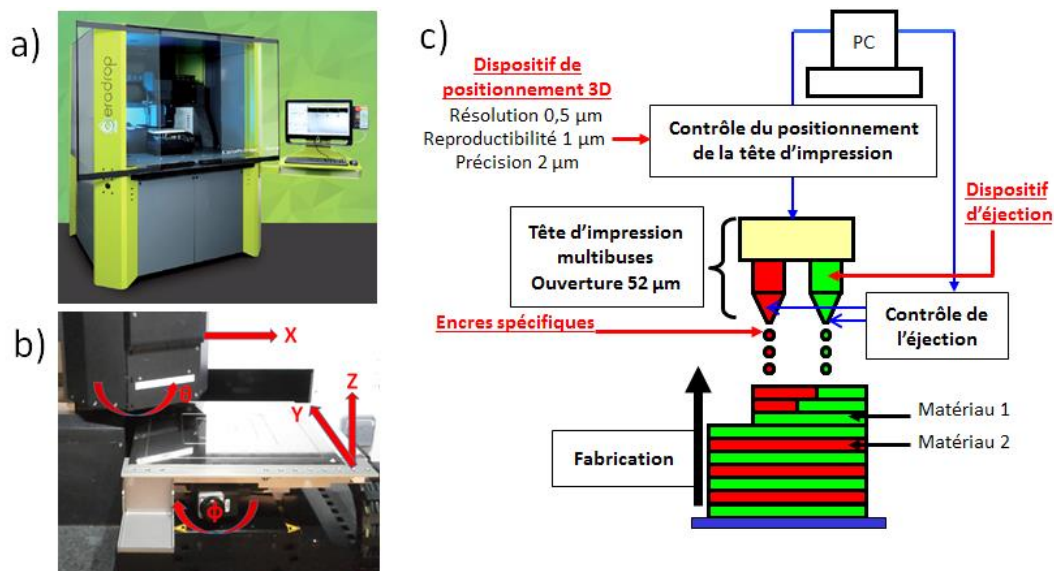


Figure A157 – Dispositif Ceraprinter X-Série utilisé (a) présentant 3 axes de translation et 2 axes de rotation (b) et permettant la fabrication d'objets multi-matériaux à architectures complexes (c)

Cet équipement présente une très grande précision concernant les dépôts réalisés, grâce à des caractéristiques techniques performantes (Tableau A27). Afin de garantir des dépôts de très grande qualité, il faut non seulement **ajuster l'éjection du sol**, ainsi que **définir une configuration des dépôts** qui évite notamment la coalescence des gouttes, dans le cas où l'espacement prédéfini ne serait pas suffisant.

<sup>1</sup> Lejeune *et al.*, Procédé de fabrication d'un composant multimatériaux tridimensionnel par impression du type jet d'encre.



Tableau A27 – Caractéristiques du système de micro-positionnement du Ceraprinter X-Série

Système de micro-déplacement motorisé XYZ0	Surface de travail XY	300 × 300 mm <sup>2</sup>
	Course de l'axe Z	30 mm
	Course angulaire Thêta	+/- 160°
	Vitesse maximale	500 mm.s <sup>-1</sup>
	Accélération maximale	2000 mm.s <sup>-2</sup>
	Précision absolue statique sur l'axe de fabrication	+/- 1,5 µm
	Précision dynamique sur l'axe de fabrication à vitesse constante	+/- 3 µm
	Répétabilité dans le plan XY	+/- 0,5 µm
	Précision absolue de l'axe de rotation	+/- 0,01°

### 3.2 Ajustement de l'éjection des encres

Une fois les spécifications des encres atteintes (cf. Annexe 5), **l'éjection des gouttes est ajustée par le biais du pulse électrique appliqué aux transducteurs piézoélectriques des buses de la tête** (Figure A158-a & b), afin de garantir la stabilité de l'éjection dans le temps. Le pulse électrique se scinde en trois intervalles de temps (Figure A158-c) : une **montée en tension (Tm)**, une **stabilisation (Tp)** à une amplitude choisie en fonction de la tension appliquée (V) et une **descente en tension (Td)**. Ces paramètres permettent de contrôler la taille et la vitesse des gouttes éjectées.

L'éjection est visualisée au moyen d'un stroboscope et d'une caméra CCD. **Une bonne stabilisation permet d'assurer une éjection reproductible dans le temps** pour la ou les buse(s) choisie(s), qui consiste en l'éjection d'une goutte principale, rattrapée par une goutte satellite avant d'atteindre le substrat (Figure A158-d).

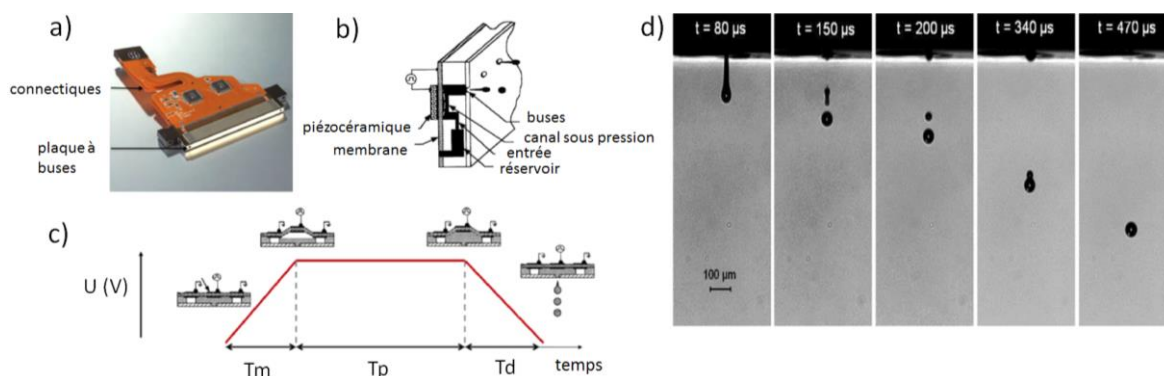


Figure A158 – Image d'une tête d'impression SL-128 AA (Dimatix) utilisée dans cette étude (a) et schéma de principe de l'éjection des gouttes grâce aux composants piézoélectriques (b). Exemple de pulse électrique (c) permettant d'ajuster l'éjection des sols (d)

La tête d'impression est constituée de 128 buses de 50 µm de diamètre, et est revêtue d'une couche d'or hydrophobe, pour permettre l'éjection d'encres à caractères hydrophiles. La composition des sols a été ajustée avec un agent hydrophobe (TFTS) pour limiter les phénomènes de nappage qui peuvent se produire et résulteraient en une éjection instable qui mettraient en défaut la qualité des dépôts obtenus.



### 3.3 Configuration des réseaux à imprimer par tranchage CAO

En parallèle de l'ajustement de l'éjection, **un logiciel de tranchage de type CAO (CeraSlice) permet de renseigner les paramètres géométriques des impressions à réaliser, à savoir le type de réseau (Figure A159-a), la stratégie de dépôt (Figure A159-b), le nombre de couches (N) et l'espacement entre les microplots (E).** Ceci permet de réaliser des dépôts ajustables selon le motif souhaité (Figure A160).

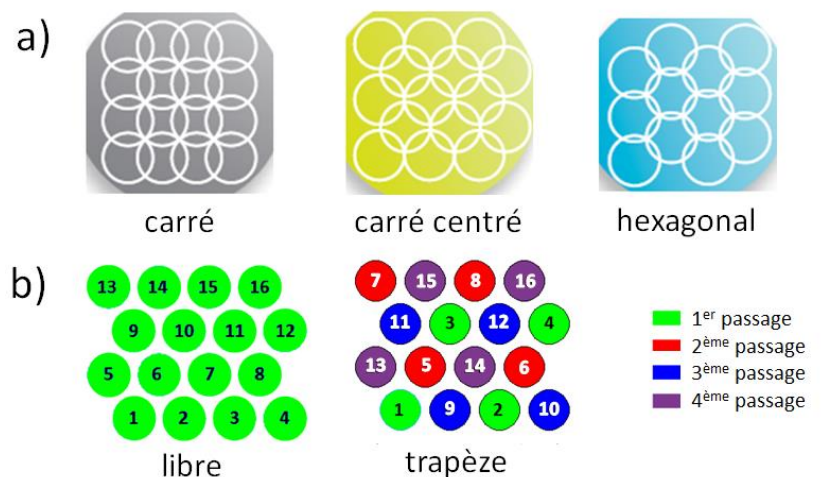


Figure A159 – Différents types de réseaux réalisables (a) et différentes stratégies de dépôts des gouttes déterminées par les buses sollicitées à chaque passage de la tête (b)

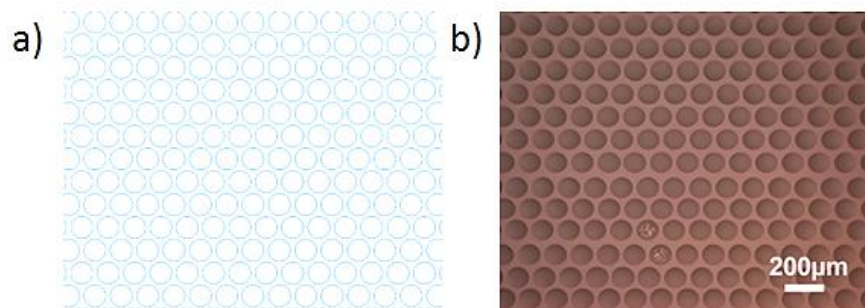


Figure A160 – Exemple de réseau souhaité renseigné dans le fichier CAO (a) et dépôt réalisé (b)

Les réseaux de microplots multicouches sont générés par dépôts successifs de gouttes les unes sur les autres. Le temps de séchage entre deux gouttes successives varie en fonction des paramètres d'impression et de la surface du motif à imprimer, ajustable dans le logiciel CAO également. En se basant sur les travaux précédents<sup>2</sup>, **un temps minimum de 10 min de séchage entre chaque couche** a été appliqué.

<sup>2</sup> Mougnot, « Réalisation par un procédé d'impression jet d'encre de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée ».



### 3.4 Dépôts de microplots par impression jet d'encre : paramètres de réglage

Une fois l'éjection stabilisée par le biais du pulse choisi, et le motif créé par le biais du logiciel de tranchage, ces deux informations peuvent être compilées dans le logiciel pilotant l'impression (Driver Ceraprinter). D'autres paramètres sont nécessaires à l'impression :

- **la fréquence d'éjection, gardée constante à 1000 Hz.** La vitesse de déplacement de la tête d'impression est adaptée en fonction de cette valeur, et en fonction également de l'espacement entre les plots.
- **l'épaisseur du substrat (e)** à renseigner afin de permettre à l'équipement de savoir à quelle cote se placer en Z, garantissant une très bonne précision et reproductibilité. Les substrats sont maintenus par aspiration sur le support d'impression (*chuck*), afin d'éviter tout déplacement en cours d'impression. Plusieurs substrats ont été utilisés<sup>3</sup>.
- **la distance de travail (Wd)** ou distance entre la tête d'impression et la face supérieure du substrat. Il est impératif que la goutte satellite rejoigne la goutte principale avant de dépasser la distance de travail, au risque de voir se déposer deux gouttes au lieu d'une seule. Cette distance de **Wd a été fixée à 500 µm**, cette valeur ayant permis d'obtenir des dépôts très bien définis.

Lors de l'impression, la tête se déplace par défaut de gauche à droite et de bas en haut (Figure A161). Il est aussi possible avec le logiciel de **programmer des actions à réaliser en cours d'impression**, comme le fait de **prendre des photos** entre chaque couche afin de vérifier les dépôts successifs, **ou bien de réaliser des traitements comme du séchage UV ou infrarouge**, en fonction des modules présents sur l'équipement, qui permettraient par exemple de consolider la couche déposée avant impression de la couche suivante.

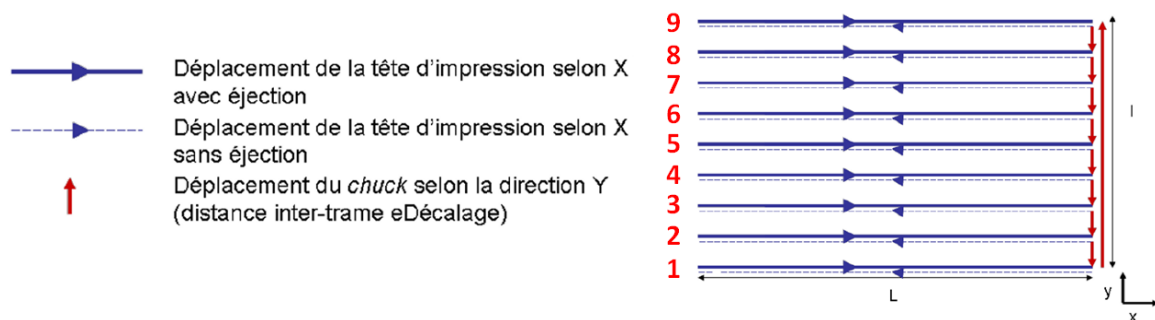


Figure A161 – Déplacement de la tête d'impression et ordre d'impression des trames

<sup>3</sup> Substrat de type lamelles de verre pour la microscopie (e = 0,3 mm) ou bien des wafers de silicium pour analyses FTIR, orientés selon le plan cristallographique (111) dopés p au bore (e = 0,6 mm)





## Annexe 4. Caractérisation des sols par suivi en RMN liquide du $^{29}\text{Si}$

### 4.1 Introduction à la technique

Les cinétiques d'hydrolyse et de condensation régissent la formation des matériaux sol-gel. Ceci est illustré pour le TEOS par la concentration en espèces  $Q_n$  (oligomères de silice) et pour l'AzPTES et le TFTS par les espèces  $T_i$ , contenues dans la solution (Figure 17).

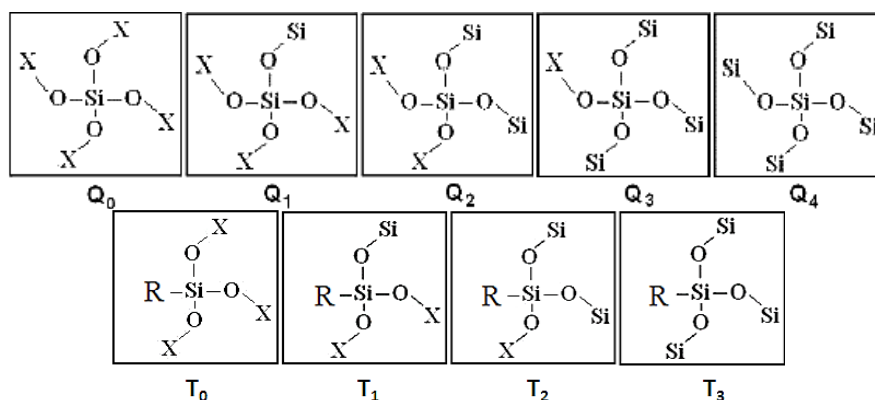


Figure A162 – Espèces  $Q_i$  ( $0 \leq i \leq 4$ ) obtenues lors de la condensation du TEOS ( $X = \text{H}$  ou  $X = \text{C}_2\text{H}_5$ ) et espèces  $T_i$  ( $0 \leq i \leq 3$ ) obtenues par condensation de l'AzPTES et du TFTS avec le TEOS

La **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)** est une propriété des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire, qui permet de quantifier ces espèces  $Q_n$  et  $T_n$ . En présence d'un rayonnement électromagnétique, ces noyaux atomiques absorbent puis relâchent l'énergie du rayonnement sous forme d'une résonance correspondant à une fréquence précise.

Pour l'étude des sols concernés, des analyses par **RMN liquide de l'élément silicium  $^{29}\text{Si}$**  ont été réalisées par François Ribot à l'Institut des Matériaux de Paris-Centre (IMPC), sur un spectromètre 500 SB de la marque Brüker, à **500 MHz et 25 °C**.

**Une mesure de référence est réalisée afin d'effectuer les réglages d'homogénéité du champ magnétique à appliquer.** Pour cela, le tétraméthylsilane (TMS) est généralement utilisé ( $\delta = 0$  ppm). Pour les mesures, la solution mesurée est placée dans un tube de 10 mm de diamètre, dans lequel est placé un second tube de 5 mm contenant un « solvant de lock » (acétone  $d_6$ ) et la référence (TMS).

Pour les solutions analysées, la concentration en silicium est faible ( $[\text{Si}] \approx 0,5$  mol/L) et induirait un temps de relaxation long. **De l'acétylacétonate de chrome III ( $\text{Cr}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ , noté  $\text{Cr}(\text{acac})_3$ ), est introduit à une teneur de 20 mg pour 2,3 mL de solution, afin de diminuer le temps de relaxation de la solution.** Ceci permet d'acquérir les spectres RMN durant 30 minutes d'accumulation (NS = 1600) tout en ayant un rapport signal/bruit satisfaisant, contre environ 6 heures de mesure en l'absence de  $\text{Cr}(\text{acac})_3$ . En effet, le délai imposé entre deux



acquisitions ( $D_1$ ), doit être au moins aussi important que le temps de relaxation des espèces présentes en solution (c'est-à-dire 10 s).

Les expériences réalisées au cours de cette étude ont utilisé un écho de spin basé sur deux impulsions radiofréquences espacées d'un temps mort  $\tau$  de 10 ms et la séquence ainsi appliquée est du type  $\pi/2 - \tau - \pi - \tau$ . Cette pratique a pour but d'**éliminer le signal du verre des deux tubes contenant la solution et la référence**. Cependant, ce signal éliminé apparaît au même endroit que les espèces  $Q_4$  issues de la condensation du TEOS et le rapport signal/bruit ne permet pas d'exploiter le signal des espèces  $Q_4$  de façon quantitative. **Cette méthode constitue donc une analyse qualitative plutôt que quantitative, puisqu'elle ne tient pas compte de toutes les espèces.**

Concernant l'exploitation des spectres RMN, les déplacements chimiques et attributions des bandes des espèces  $Q_n$  sont connues (Tableau A28), et les espèces  $T_n$  ont déjà été observées par utilisation du TFTS dans une étude précédente<sup>4</sup>.

Tableau A28 – Attribution des déplacements chimiques (ppm) lors de la condensation du TEOS <sup>5,6</sup>

Espèces		TEOS/H <sub>2</sub> O/EtOH 1/1/4	TEOS/H <sub>2</sub> O/EtOH 1/2/1
Q <sub>0</sub>	Si(OH) <sub>4</sub>	-71,9	-72,0
	Si(OR)(OH) <sub>3</sub>	-74,0	-73,8
	Si(OR) <sub>2</sub> (OH) <sub>2</sub>	-76,2	-76,0
	Si(OR) <sub>3</sub> (OH)	-78,6	-78,3
	Si(OR) <sub>4</sub>	-81,5	-81,3
Q <sub>1</sub>	Si(OR)(OH) <sub>2</sub> (OSi)	-83,6	-83,3
	Si(OR) <sub>2</sub> (OH)(OSi)	-85,3	-85,6
	Si(OR) <sub>3</sub> (OSi)	-85,8	-88,2
Q <sub>2</sub>	Si(OR)(OH) <sub>2</sub> (OSi) <sub>2</sub> cycl-3	-87,4	-86,8
	Si(OR) <sub>2</sub> (OSi) <sub>2</sub> cycl-3	-88,4	-91,0
	Si(OR)(OH)(OSi) <sub>2</sub> cycl-4	-92,4	-92,3
	Si(OR)(OH)(OSi) <sub>2</sub> lin.	-93,5	-93,0
	Si(OR) <sub>2</sub> (OSi) <sub>2</sub> cycl-4	-94,8	-94,6
	Si(OR) <sub>2</sub> (OSi) <sub>2</sub> lin.	-95,8	-95,5
Q <sub>3</sub>	Si(OR)(OSi) <sub>3</sub> et Si(OH)(OSi) <sub>3</sub>	De -97 à -102	De -98 à -102

<sup>4</sup> Mougnot, « Réalisation par un procédé d'impression jet d'encre de réseaux de microplots de silice mésoporeuse fonctionnalisée ».

<sup>5</sup> Delattre, « Caractérisation structural des étapes d'élaboration par voie sol-gel de matériaux hybrides organiques-inorganiques ».

<sup>6</sup> Gualandris, « Oxycarbures de silicium à partir de polysiloxanes préparés par voie sol-gel : caractérisation par résonance magnétique nucléaire ».



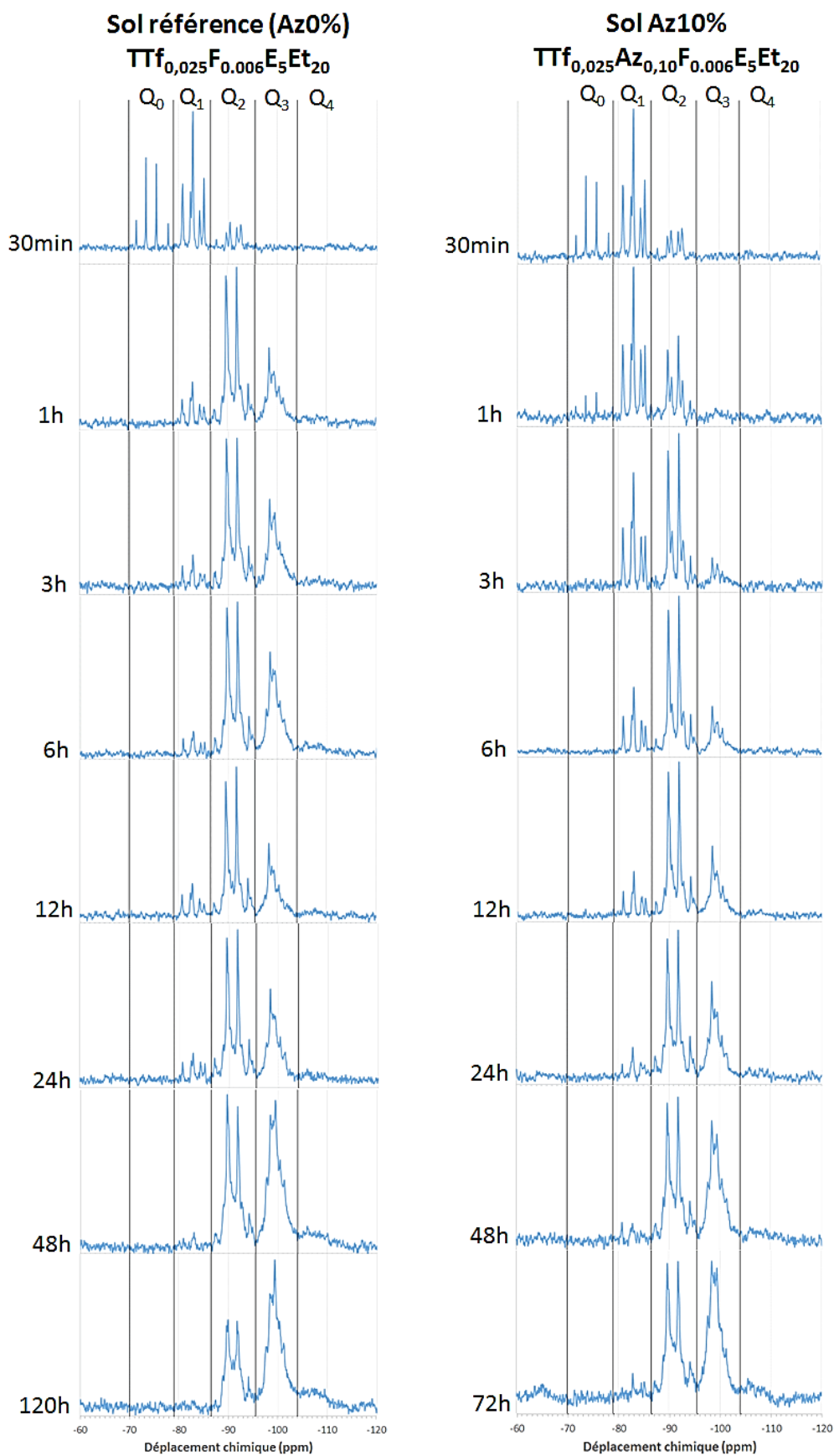


Figure A163 – Exemples de spectres obtenus à différents temps et qui montrent la condensation plus lente du sol avec 10% d’AzPTES par rapport au sol sans AzPTES



#### 4.2 Spectres RMN de sols avec différents taux d'AzPTES : 10, 15 et 17,5%

Des mesures réalisées par RMN liquide du  $^{29}\text{Si}$  ont permis **d'obtenir l'évolution des espèces  $Q_n$**  (Figure A164) **et  $T_n$**  (Figure A165) **pour différents taux d'AzPTES**. Ceci permet de s'intéresser à l'état de condensation des sols au cours du temps, et de déterminer un temps de vieillissement jugé optimal quand les espèces  $Q_2$  et  $Q_3$  sont environ en égales proportions.

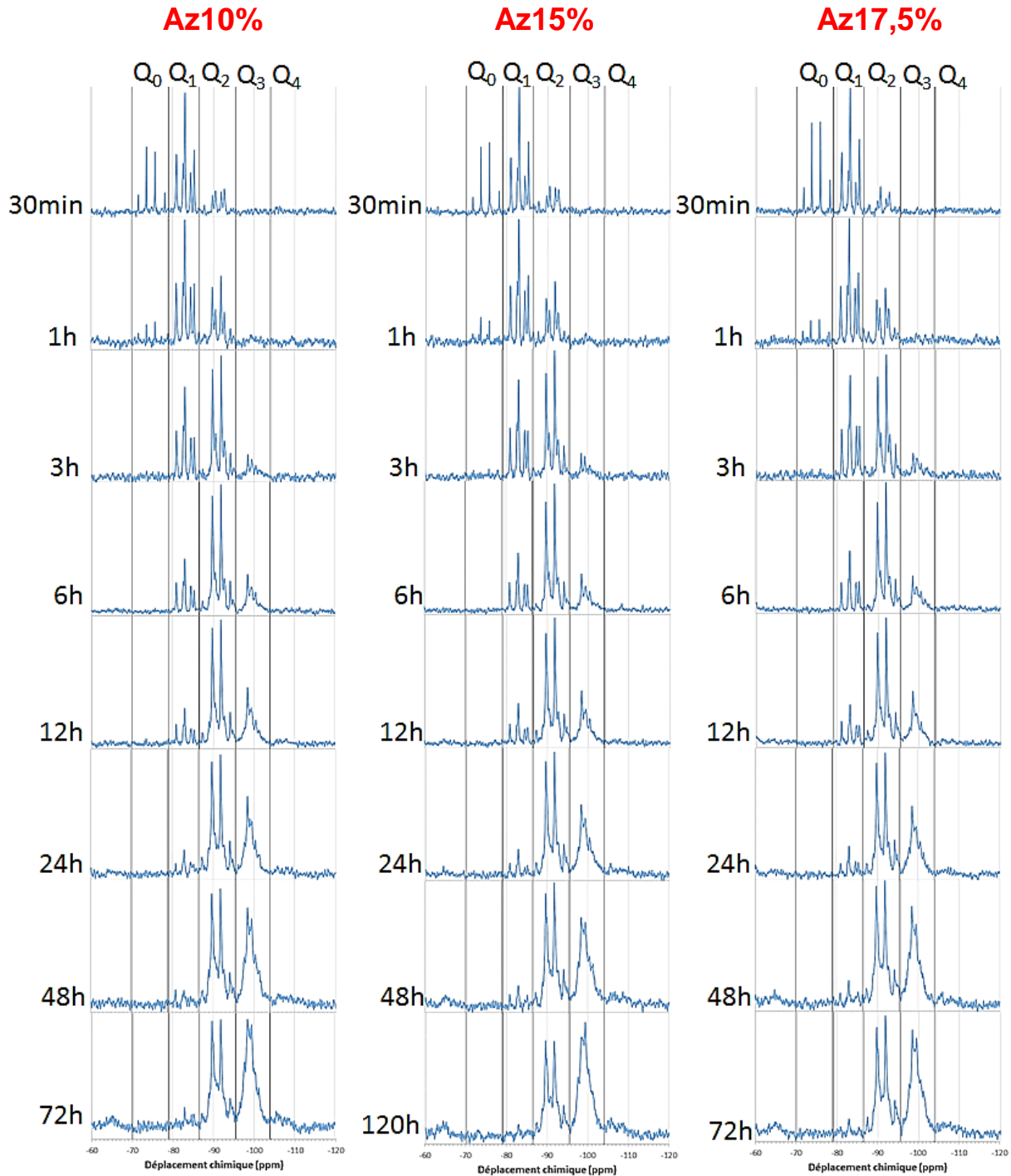


Figure A164 – Evolution des espèces  $Q_n$  à différents temps de vieillissement pour les sols  $TTf_{0,025}AZ_{0,10}F_{0,006}E_5Et_2$ ,  $TTf_{0,025}AZ_{0,15}F_{0,006}E_5Et_2$  &  $TTf_{0,025}AZ_{0,175}F_{0,006}E_5Et_2$



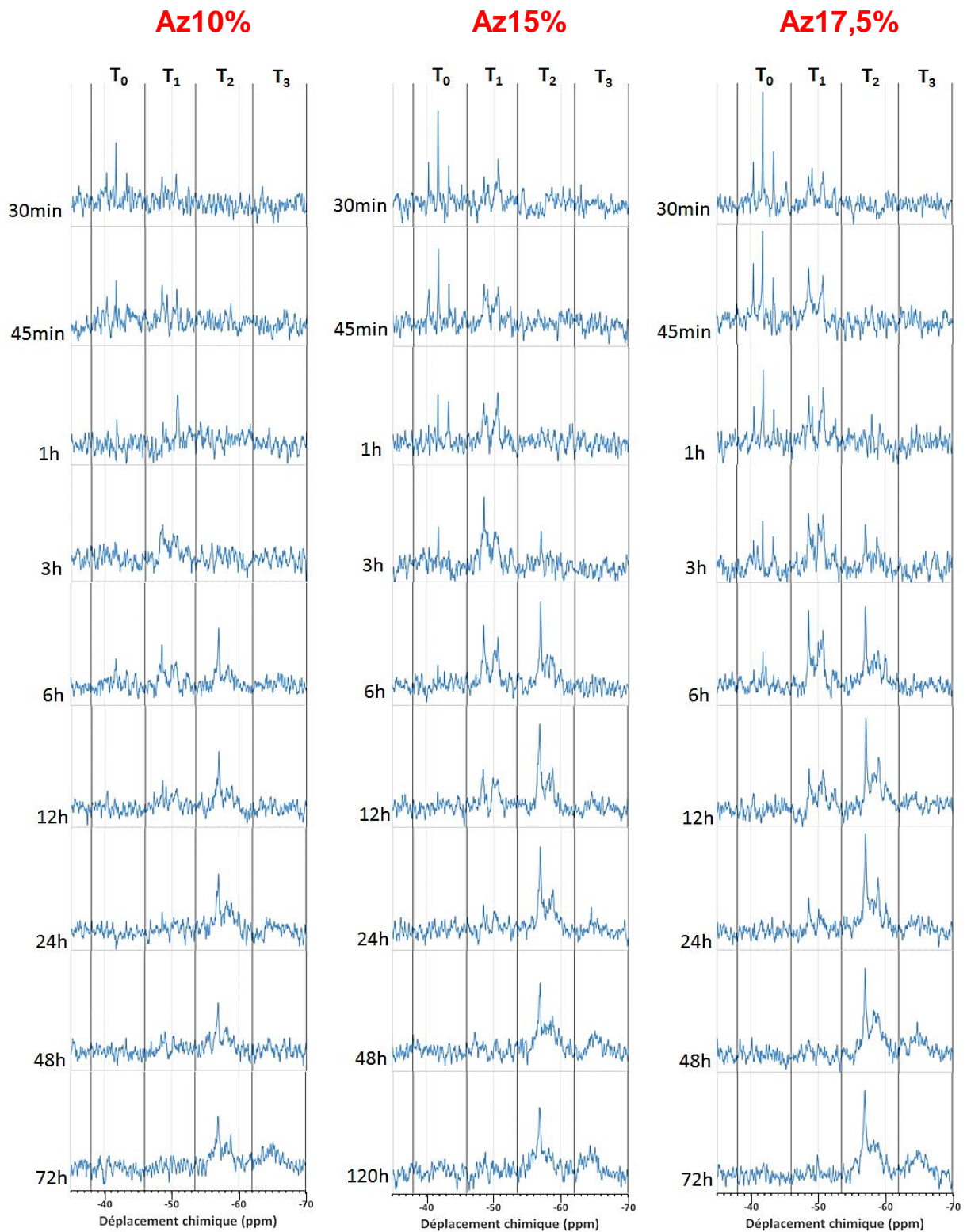


Figure A165 – Evolution des espèces  $T_n$  à différents temps de vieillissement pour les sols  $TTf_{0,025}AZ_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$ ,  $TTf_{0,025}AZ_{0,15}F_{0,006}E_5Et_{20}$  &  $TTf_{0,025}AZ_{0,175}F_{0,006}E_5Et_{20}$



### 4.3 Spectres RMN d'un sol porphyrine, par comparaison avec un sol standard

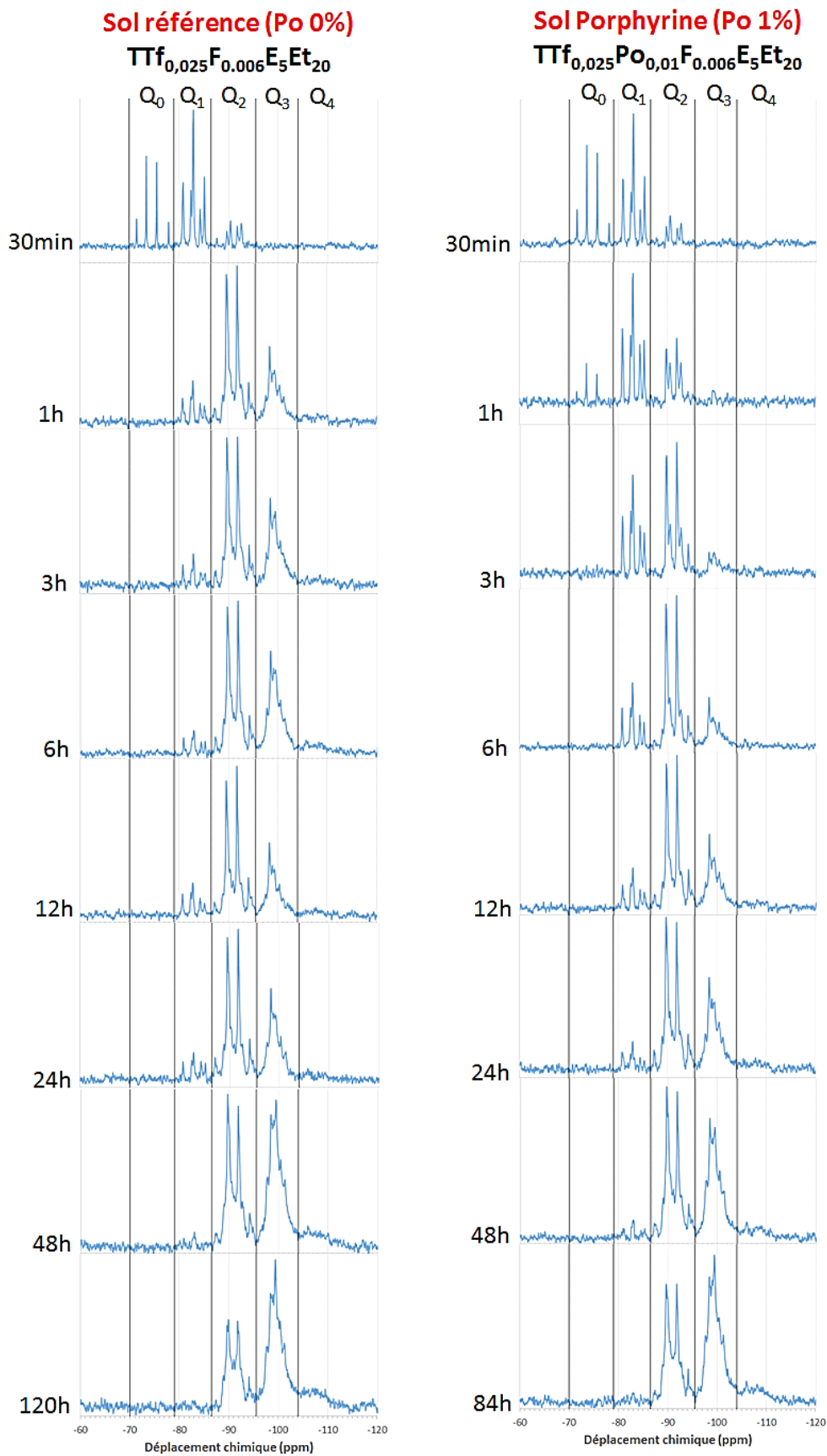


Figure A166 – Evolution des espèces  $Q_n$  à différents temps de vieillissement pour le sol de référence  $Tf_{0,025}F_{0,006}E_5Et_{20}$  et le sol porphyrine  $Tf_{0,025}Po_{0,01}F_{0,006}E_5Et_{20}$



## Annexe 5. Caractérisations des propriétés physico-chimiques des sols

Afin d'être compatibles avec les têtes d'impression utilisées, les encres doivent répondre à différentes spécifications. **La viscosité  $\eta$  doit être comprise entre 5 et 20 mPa.s et la tension de surface  $\gamma$  entre 30 et 35 mN/m.** Par ailleurs, afin d'obtenir une éjection fiable, **le rapport d'éjection  $Z$  doit être compris entre 1 et 10**, d'après les limites mises en évidence par les travaux de Fromm<sup>7</sup> et de Reis et Derby<sup>8</sup>, avec :

$$Z = \frac{Re}{\sqrt{We}} = \frac{\sqrt{\rho \gamma r}}{\eta} \quad \text{avec} \quad Re = \frac{\rho v r}{\eta} \quad \text{et} \quad We = \frac{\rho v^2 r}{\gamma}$$

$\rho$ ,  $v$  et  $r$  respectivement la densité, la vitesse du fluide et le rayon de la buse

$Re$  et  $We$  respectivement les nombres de Reynolds et de Weber

Pour un rapport d'éjection inférieur à 1, il est impossible d'éjecter et pour un rapport supérieur à 10, une colonne de fluide continue se forme, puis se fractionne en gouttes satellites et l'éjection ne peut pas être contrôlée.

Par ailleurs, **les buses retenues ont un diamètre de 52  $\mu\text{m}$** , un rapport de 50 étant préconisé entre le diamètre d'ouverture des buses et la taille maximale des entités dans l'encre, **il est donc nécessaire de filtrer les encres à 1  $\mu\text{m}$**  pour éviter de boucher ces buses.

Afin d'établir les valeurs de rapport d'éjection pour chaque sol, cela nécessite de mesurer leur **densité**, leur **viscosité** et leur **tension de surface**. La taille des particules peut aussi être suivie par **diffusion dynamique de la lumière** (DLS, *Dynamic Light Scattering*).

### 5.1 Descriptif des techniques utilisées

#### 5.1.1 Mesure de viscosité

**La viscosité dynamique d'un fluide caractérise sa résistance à l'écoulement.** La mesure de viscosité de l'encre a été réalisée dans le temps, pour voir l'influence du vieillissement de l'encre sur ses propriétés rhéologiques.

**Cette mesure est faite en mesurant la contrainte pour un gradient de vitesse de cisaillement en rotation** et a été effectuée sur un équipement AR G2 de TA Instruments, en mode balayage à température ambiante, pour des gammes de cisaillement de 10 à 200  $\text{s}^{-1}$

<sup>7</sup> E. Fromm, *Numerical Calculation of the Fluid Dynamics of Drop-on-Demand Jets*.

<sup>8</sup> Reis et Derby, *Ink Jet Deposition of Ceramic Suspensions: Modeling and Experiments of Droplet Formation*.



avec un pas de  $5 \text{ s}^{-1}$ . Le mode utilisé est un contact cône-plan (Figure A167), avec un cône aluminium (diamètre 60 mm, angle  $1^\circ : 1 \text{ min} : 48 \text{ s}$ ).

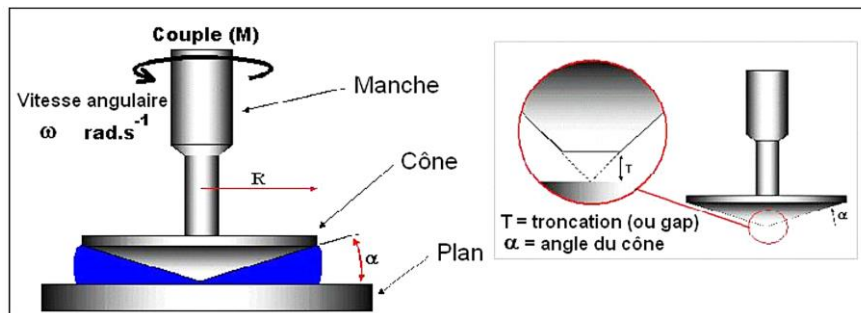


Figure A167 – Géométrie cône/plan utilisée pour la mesure de viscosité dynamique

Pour les solutions utilisées, la contrainte mesurée évolue linéairement avec le gradient de cisaillement, le régime est dit Newtonien. **La viscosité dynamique est alors le rapport de la contrainte de cisaillement  $\tau$  sur le gradient de vitesse  $\gamma$ , soit  $\eta = \tau / \gamma$ .**

### 5.1.2 Mesure de tension de surface

Pour une solution, l'interface liquide/vapeur est considérée comme une discontinuité du matériau, une surface à laquelle est associée à une enthalpie libre d'excès G. **La tension de surface est alors définie comme le travail à fournir pour augmenter cette surface d'une unité d'aire, soit :**

$$\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial A} \right)$$

avec A l'aire de la surface et  $\gamma$  la tension de surface en  $\text{J/m}^2$ .

**La tension de surface** des encres a été caractérisée sur un équipement DCAT 11 de Dataphysics selon la méthode de Wilhelmy (Figure A168), à température ambiante.

**Cette méthode utilise une microbalance de précision qui évalue la masse au retrait ( $\Delta m$ ) de la solution à mesurer.** Une plaque platine-iridium est utilisée ( $10 \times 19,9 \times 0,2 \text{ mm}$ ) avec une vitesse de mesure de  $0,1 \text{ mm/s}$  pour avoir une bonne sensibilité sur la mesure :

$$\gamma_{LV} \cdot \cos(\theta) = \frac{F}{P} = \Delta m \cdot \frac{g}{2(L + e)}$$

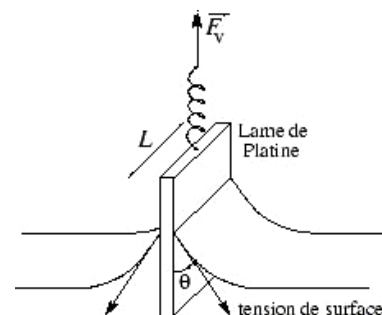


Figure A168 – Schéma de principe de la méthode de la plaque de Wilhelmy





### 5.1.3 Mesure de taille d'oligomère par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La **taille des oligomères** de silice peut être suivie par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Une cellule de mesure est éclairée par un faisceau laser incident et les particules diffusent alors la lumière dans toutes les directions. Des détecteurs à 90° et 173° recueillent le faisceau diffusé, qui permet d'obtenir une **distribution des entités présentes, en taille ou en intensité**, par autocorrélation du faisceau avec lui-même. Ces mesures ont été réalisées sur un équipement Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments). Les encres ont été diluées de moitié afin d'être compatibles avec la mesure et assurer une fonction de corrélation correcte. La mesure a été effectuée à 173°.

## 5.2 Résultats des caractérisations des sols

Les encres contenant 10%, 15% et 17,5% d'AzPTES voient un temps de vieillissement de 48 h, qui correspond à une bonne incorporation de l'AzPTES par rapport à la co-condensation avec le TEOS, et qui garantit également une bonne condensation des espèces du TEOS en vue d'obtenir une architecture cohérente du matériau après impression.

En vue de leur impression, **les propriétés physico-chimiques des sols ont été contrôlées** (Tableau A29), pour vérifier leur compatibilité avec l'équipement en terme d'éjection. **Une filtration à 1 µm est aussi réalisée à 48 h avant impression**, pour éliminer les entités de taille trop importante, qui pourraient boucher les buses d'impression.

Tableau A29 – Propriétés physico-chimiques des encres  $Tf_{0,025}Az_xF_{0,006}E_5Et_{20}$  vieilles 48 h pour différents taux d'azotures, avant/après filtration, et rapport d'éjection correspondant (mesures à 20 °C)

Solution testée	Etape de filtration	Densité $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Tension de surface $\gamma$ (mN/m)	Viscosité $\eta$ (mPa.s)	Rapport d'éjection $\frac{Re}{\sqrt{We}} = \frac{\sqrt{\rho r \gamma}}{\eta}$
Erreur liée à la mesure		± 0,01	± 0,1	± 0,1	/
Az 0%	Non filtré	0,85	23,4	4,5	5,1
	Filtré à 48 h	0,85	23,4	4,3	5,3
Az 10%	Non filtré	0,86	22,2	3,3	6,8
	Filtré à 48 h	0,86	22,2	3,2	7,0
Az 15%	Non filtré	0,86	22,4	3,3	6,8
	Filtré à 48 h	0,86	22,4	3,2	7,0
Az 17,5%	Non filtré	0,86	22,5	3,3	6,8
	Filtré à 48 h	0,86	22,5	3,2	7,1



La densité est globalement constante quel que soit le taux d'azotures, celui-ci ne faisant que très peu varier la densité, étant donnée la contribution majoritaire de l'éthanol ( $\rho = 0,789 \text{ g/cm}^3$ ) et de l'eau acidifiée ( $\rho \sim 1,05 \text{ g/cm}^3$ ). La tension de surface est également très proche de celle de l'éthanol majoritaire ( $\gamma = 22,27 \text{ mN/m}$  à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), bien qu'inférieure aux valeurs conseillées : les sols présentent une tension de surface de 22,2 à 23,4 mN/m au lieu des 30 à 35 mN/m conseillés. Les valeurs de viscosité sont également inférieures à celles conseillées, de l'ordre de 3,2 à 4,5 mPa.s au lieu de 5 à 20 mPa.s. Néanmoins, **le rapport d'éjection est bien compris entre 1 et 10, ce qui permet d'utiliser les sols pour l'impression jet d'encre.**

**L'augmentation du taux d'AzPTES entraîne une diminution de la viscosité des solutions, ce qui traduit le caractère hydrophile de l'AzPTES.**

D'autre part la filtration à  $1 \mu\text{m}$  réalisée avant d'introduire l'encre dans le réservoir de l'équipement jet d'encre ne modifie que très légèrement la densité et la tension de surface des sols (propriétés régies principalement par l'éthanol et l'eau acidifiée). Néanmoins, **la filtration entraîne une diminution non négligeable de la viscosité, d'environ 0,1 à 0,2 mPa.s. Ceci suggère l'élimination d'oligomères de silice de grande taille**, ce qui a été vérifié par des analyses en diffusion dynamique de la lumière (DLS). L'encre a pour cela été filtrée préalablement à son introduction dans le réservoir de l'équipement jet d'encre. Après impression (environ 1 h après la filtration), l'encre a été récupérée puis analysée. En parallèle, le reliquat d'encre qui n'a pas été filtré a aussi été analysé.

Plusieurs mesures ont été réalisées pour fiabiliser ces résultats, présentés en intensité, dans la mesure où la morphologie des analytes est inconnue (Figure A169).

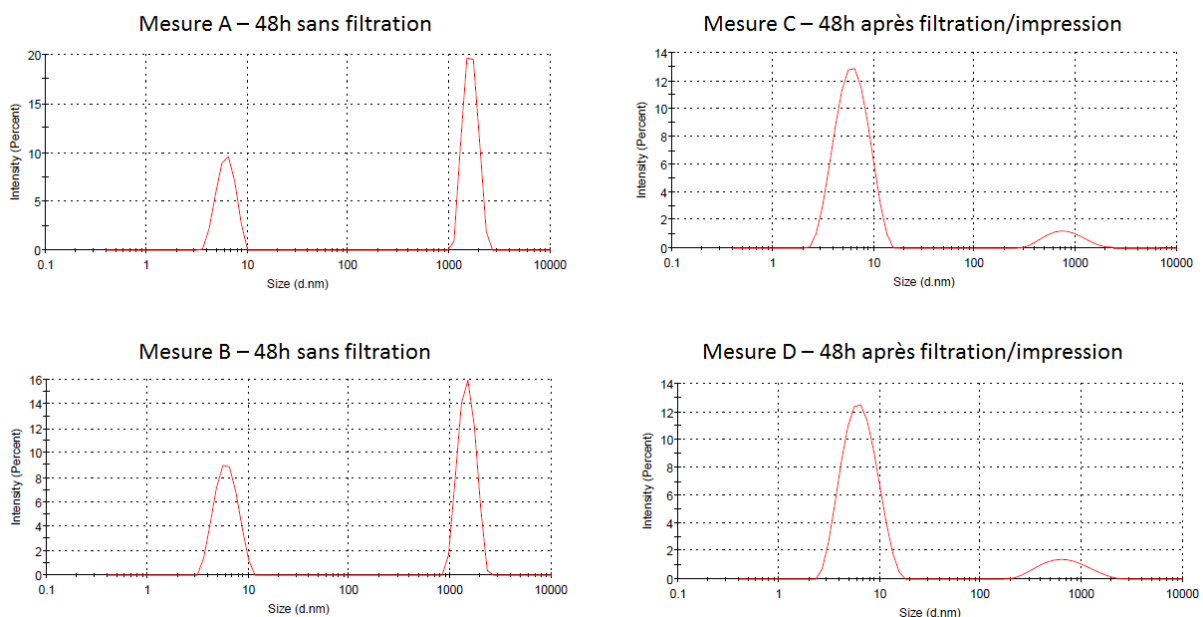


Figure A169 – Mesures DLS en intensité effectuées sur une encre avec 10% d'AzPTES au bout de 48 h de vieillissement, sans filtration (A et B) ou après filtration et impression (C et D)



Ces résultats présentent une distribution bimodale de particules, avec globalement des petites particules vers 5-6 nm, qui pourraient être les oligomères élémentaires non totalement condensés, et de plus grosses particules entre 0,7 et 2  $\mu\text{m}$ . Les données relatives à ces mesures sont présentées dans le Tableau A30.

Tableau A30 – Répartition en taille des oligomères de silice, obtenue par DLS (en intensité) sur une encre  $TTf_{0,025}Az_{0,10}F_{0,006}E_5Et_{20}$  vieillie 48 h, sans filtration ou après filtration et impression

Mesure	Filtration	Pic 1 (nm)	Intensité (%)	Ecart-type (nm)	Pic 2 (nm)	Intensité (%)	Ecart-type (nm)
A	Non filtrée	6.241	36.4	1.220	1628	63.6	263.3
B	Non filtrée	6.191	42.5	1.521	1471	57.5	278.9
C	Filtrée	6.449	88.4	2.305	836.5	11.6	370.1
D	Filtrée	6.708	86.6	2.522	741.2	13.4	389.0

Avant filtration, les grosses particules sont de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , et ont une forte contribution au niveau de la répartition en intensité, ce qui **confirme la nécessité de filtrer à 1  $\mu\text{m}$** . Après filtration, il y a une forte augmentation de la contribution en intensité des particules d'environ 5-6 nm, ainsi que des espèces d'environ 700-800 nm, qui ne faisaient initialement pas partie de la distribution des particules autour de 1  $\mu\text{m}$ . Ceci montre que la filtration à 1  $\mu\text{m}$  a été efficace pour éliminer les grosses particules et que la condensation du sol continue à l'intérieur du réservoir d'encre, dans l'équipement d'impression jet d'encre, comme le traduit la présence des espèces d'environ 700-800 nm sur les mesures C et D.

En conclusion, les encres avec différents taux d'AzPTES (10, 15, 17,5%) présentent des propriétés physico-chimiques en dehors des valeurs conseillées par les fabricants des têtes d'impression (viscosité et tension de surface trop faibles). Néanmoins, **ces encres ont pu être éjectées**, au moyen d'une amélioration au niveau de l'équipement d'impression jet d'encre : une augmentation de la dépression à l'intérieur de la tête d'impression pour éviter le nappage de la plaque à buses. Les dépôts réalisés étaient par ailleurs de très bonne qualité.

De plus, il apparaît que **l'étape de filtration à 1  $\mu\text{m}$  est bien une étape nécessaire**, en raison de la présence de particules de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$ , comme en témoignent les analyses effectuées par DLS. **La filtration à 1  $\mu\text{m}$  est efficace, car les particules de taille supérieure à 1  $\mu\text{m}$  sont bien éliminées**. Néanmoins, après filtration et impression, des particules de taille environ 800 nm sont présentes dans le réservoir de la tête d'impression, ce qui montre que **le mécanisme de condensation se poursuit dans le réservoir pendant la fabrication**.



## Annexe 6. Caractérisations par spectroscopie

### 6.1 Descriptif de plusieurs techniques utilisées

#### 6.1.1 Spectroscopie FTIR

La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est une technique de caractérisation chimique qui s'intéresse à **l'analyse des liaisons chimiques constitutives d'un matériau**, par la détection des vibrations spécifiques desdites liaisons. Le principe est basé sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau : lorsqu'un faisceau lumineux est de longueur d'onde voisine de l'énergie de vibration d'une molécule, celle-ci absorbe le rayonnement, occasionnant une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge, puis mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et avec quelle intensité. Le spectromètre est constitué comme un interféromètre de Michelson (Figure A170), qui permet de moduler chaque longueur d'onde du faisceau à des fréquences différentes (en fonction des positions du miroir mobile). Le détecteur analyse l'information sous forme d'un interférogramme, *i.e.* une signature d'intensité en fonction de la position du miroir mobile, convertie ensuite en un spectre infrarouge par transformée de Fourier.

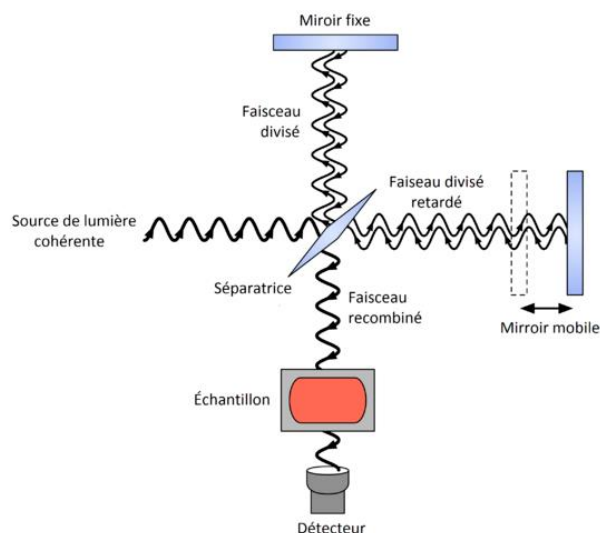


Figure A170 – Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Les caractérisations par infrarouge en transmission ont été réalisées sur un équipement Spectrum One de Perkin Elmer. Les mesures ont été réalisées sur la plage [4000 ; 700]  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 8  $\text{cm}^{-1}$  et 32 scans. La prise de blanc permet également de soustraire la contribution du substrat et de recueillir uniquement les données caractéristiques du matériau d'intérêt, comme par exemple dans le cas des couches minces.



### 6.1.2 Spectroscopie IR en mode ATR

La spectroscopie infrarouge en mode **réflectance totale atténuée** (ATR, *attenuated total reflectance*) utilise un cristal (parfois appelé diamant) parallélépipédique, transparent en infrarouge avec un indice de réfraction élevé (Figure A171). L'échantillon est mis au contact du cristal et le faisceau d'infrarouge incident subit de multiples réflexions au sein du cristal et de multiples absorptions à l'interface avec le matériau. Le faisceau qui parvient finalement au détecteur permet d'analyser les fréquences d'absorption du matériau, correspondant aux liaisons chimiques qui le constituent, et **d'identifier ainsi sa composition chimique**.

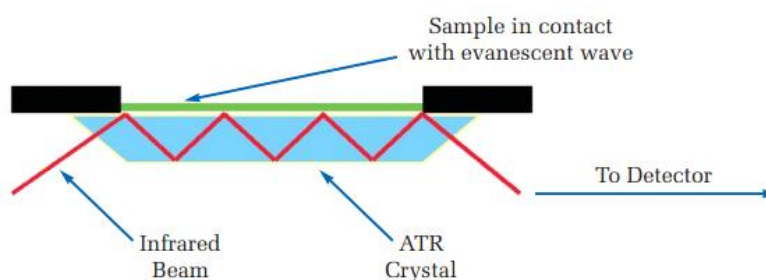


Figure A171 - Principe de spectroscopie infrarouge en mode ATR

Cette méthode n'est pas quantitative puisqu'elle dépend du contact entre le matériau et le cristal. Ce contact est généralement assuré grâce à une vis couplée à un piston qui vient plaquer, voire écraser l'échantillon sur le cristal (Figure A172). Pour cette raison, l'utilisation de cette technique est généralement destructive pour des échantillons sensibles, mais convient très bien pour réaliser une identification rapide du matériau.



Figure A172 – Accessoire Smart iTR de l'équipement Nicolet utilisé

**Les caractérisations par infrarouge en mode ATR ont été réalisées sur un équipement Nicolet de ThermoFisher. Les mesures ont été réalisées sur la plage [4000 ; 700]  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 8  $\text{cm}^{-1}$  et 32 scans.** La prise de blanc permet, comme dans le cas de la spectroscopie infrarouge en transmission, d'obtenir un blanc à soustraire à la mesure (prise de référence « dans l'air » pour des poudres, ou bien sur le solvant pur dans le cas de l'identification possible d'un analyte concentré en solution).



### 6.1.3 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman se base sur l'existence d'une signature spectrale décalée en fréquence, dans la lumière diffusée par un échantillon soumis à une illumination monochromatique. Cette signature spectrale est difficile à isoler mais est caractéristique des vibrations des édifices atomiques de l'échantillon. Pour acquérir les données, **le spectromètre Raman est utilisé en configuration en rétrodiffusion** : le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon par l'intermédiaire de l'objectif, puis la lumière Raman diffusée est collectée par ce même objectif dans le sens inverse du passage du faisceau incident (Figure A173).

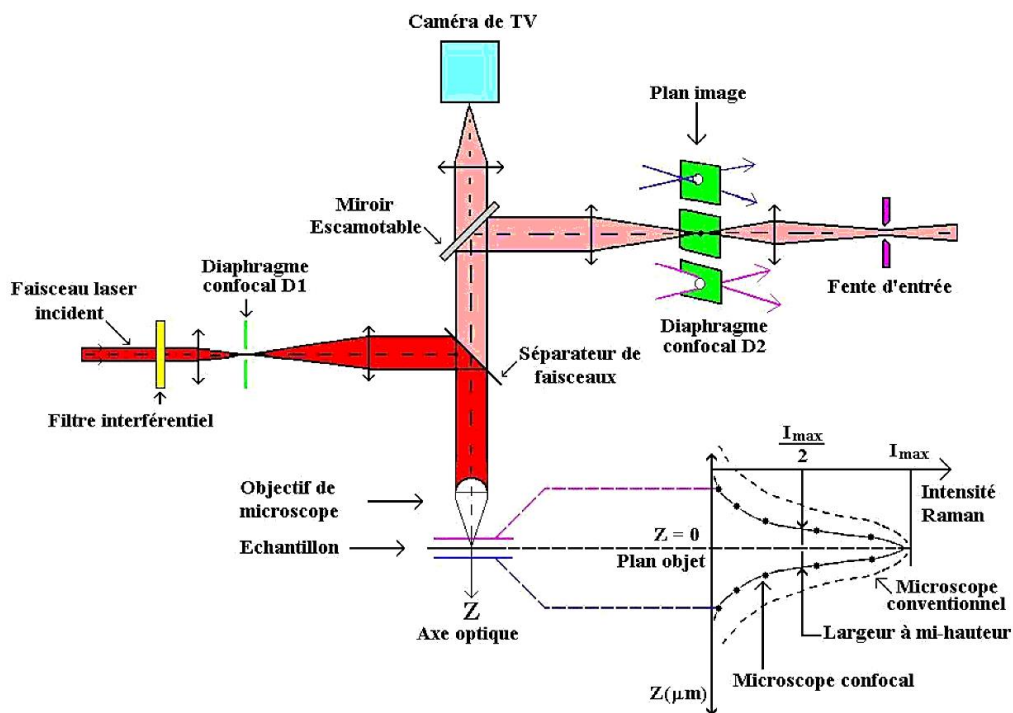


Figure A173 – Schéma de principe d'un système Raman confocal

La qualité des spectres obtenus est très dépendante de la focalisation du laser sur l'échantillon, mais également de la puissance et du temps d'acquisition qui doit permettre d'améliorer le rapport signal/bruit. **Le plus souvent, les spectres bruts de différents échantillons ne sont pas comparables entre eux et nécessitent une normalisation par rapport à une bande fixe, ou bien de travailler en ratio de bandes pour pouvoir comparer ces données.**

Les caractérisations ont été réalisées sur un équipement InVia de marque Renishaw, avec une longueur d'onde de 532 nm ou bien 785 nm. Un autre spectromètre T64 000 a également été utilisé avec une longueur d'onde de 488 nm. Les autres paramètres (puissance laser, temps d'acquisition, nombre d'accumulations) ont été adaptés au cas par cas pour les mesures, en fonction des différents matériaux et des différentes étapes de fonctionnalisation.



#### 6.1.4 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie ultraviolet-visible est une technique mettant en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (100 à 400 nm), du visible (400 à 750 nm) ou du proche infrarouge (750 à 1400 nm). **Cette technique permet de caractériser les propriétés optiques des matériaux, comme notamment leur absorbance, leur réflectance ou leur transmittance, en fonction de la longueur d'onde incidente.** Cette méthode est généralement utilisée en mode double faisceau (Figure A174-a) et permet de travailler sur des solvants ou des solides (Figure A174-b). Le mode double faisceau permet de soustraire les contributions qui ne sont pas liées au solvant ou au solide à étudier.

**Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre UV-visible Cary 5000, pour des longueurs d'onde entre 300 et 800 nm, avec un temps de 0,1 s et un pas de 0,5 à 1 nm en fonction des conditions. Le mode double faisceau a été utilisé systématiquement avec une prise de blanc avant toute mesure.** Les caractérisations sur solvants ont été réalisées grâce à des paires de cuves (3 mL) ou microcuves en quartz (500 µL).

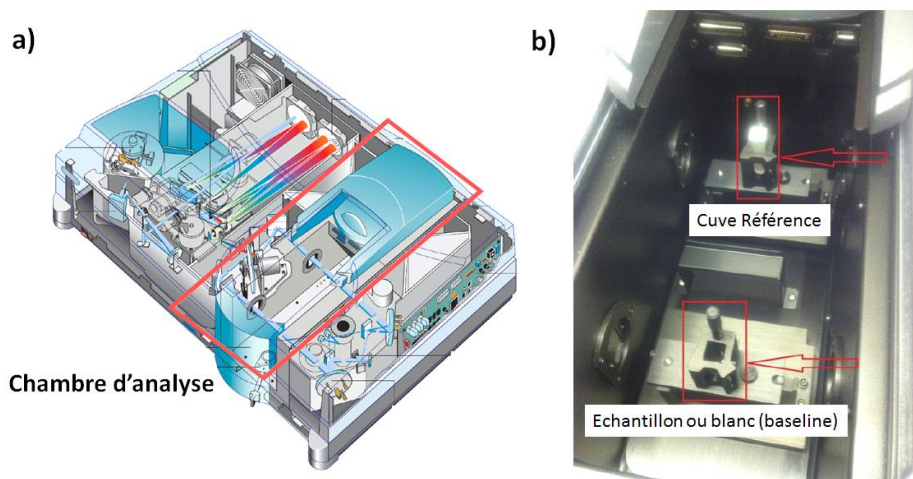


Figure A174 – Montage d'un spectromètre UV-visible comme ici un spectromètre Cary 5000 (a) et photographie de la chambre d'analyse pour des mesures sur solvants (b)

**Les caractérisations sur solvants permettent notamment d'établir un lien direct entre l'absorbance mesurée et la concentration d'une solution en analyte.** Cette méthode permet de réaliser du dosage quantitatif, grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot d \cdot C$$

avec  $I/I_0$  la transmittance de la solution (sans unité),  $A(\lambda)$  l'absorbance ou densité optique à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire (en  $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) de la solution,  $d$  le trajet optique dans la solution (cm) et  $C$  la concentration de la solution ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )



## 6.2 Contrôle de la composition des encres par spectroscopie FTIR

Ayant confirmé que des oligomères de grande taille sont éliminés lors de l'étape de filtration à 1  $\mu\text{m}$ , se pose la question de savoir si la composition de l'encre a été modifiée par l'étape de filtration. Pour vérifier cela, des analyses par infrarouge en transmission ont été réalisées, en utilisant des monocristaux de KBr qui permettent de déposer des gouttes de liquide et de les étudier. Les mesures ne présentant pas les mêmes intensités, les spectres ont donc été normalisés par rapport à la bande des azotures  $\text{N}_3$  ( $\nu = 2100 \text{ cm}^{-1}$ , élongation asymétrique), choisie comme bande de référence car ces groupements ne réagissent pas lors du vieillissement de l'encre, aussi, en considérant cette bande fixe, il est alors possible de déduire l'augmentation ou la diminution relative des autres bandes, après filtration, comme dans le cas d'une encre avec 10% d'AzPTES et une encre avec 17,5% d'AzPTES, après un vieillissement de 48 h avant puis après filtration (Figure A175).

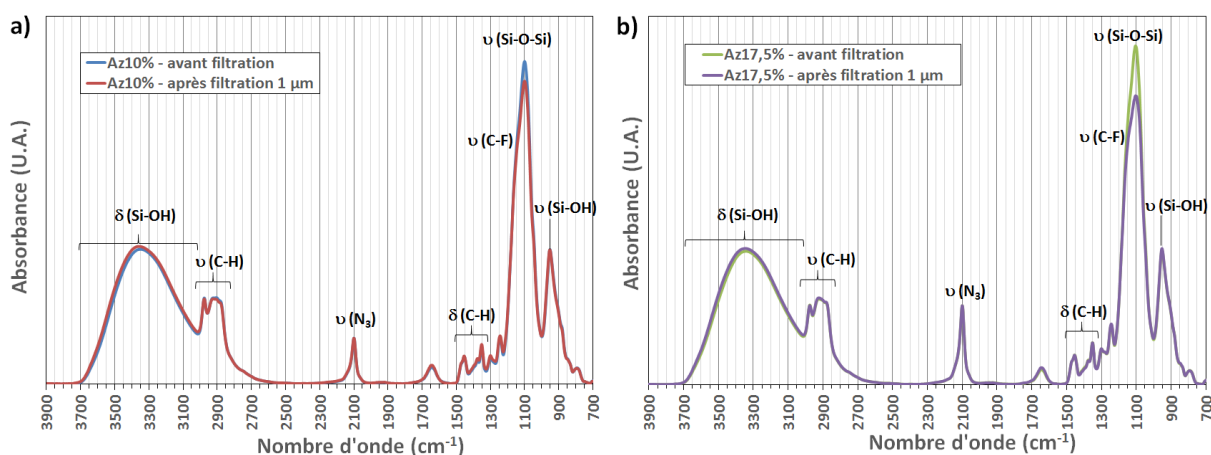


Figure A175 – Spectres infrarouge des encres avec 10% (a) et 17,5% d'AzPTES (b), présentant un vieillissement de 48 h, sans filtration et avec filtration à 1  $\mu\text{m}$

Les spectres obtenus pour 10% d'AzPTES (Figure A175-a) étant identiques, l'étape de filtration à 1  $\mu\text{m}$  ne modifie donc pas les proportions relatives entre les composés TEOS, AzPTES et TFTS. En effet, dans le cas contraire, une variation des bandes des liaisons Si-O-Si serait constatée à 1100  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations principale des oligomères contenant du TEOS condensé) ou aussi pour les bandes des groupements  $\text{CF}_2 / \text{CF}_3$  du TFTS.

En revanche pour 17,5% d'AzPTES, la bande caractéristique de la liaison Si-O-Si autour de 1100  $\text{cm}^{-1}$  est d'intensité plus grande avant filtration qu'après filtration. Ceci peut laisser supposer une légère modification de la composition par l'étape de filtration à 1  $\mu\text{m}$ , qui serait liée à l'élimination d'oligomères de grande taille ayant fortement condensé avec le TEOS, ce qui laisserait uniquement des oligomères moins condensés.

Il est possible de noter une bande autour de 1650  $\text{cm}^{-1}$ , habituellement absente dans le cas de réseaux de microplots, et qui peut être apportée par l'eau acidifiée à l'acide nitrique.





## 6.3 Caractéristiques des molécules utilisées

Tableau A31 – Types de liaisons chimiques des composés utilisés, dans le but d'identifier les bandes de vibration en spectroscopie (en rouge les liaisons caractéristiques des composés)

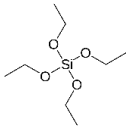
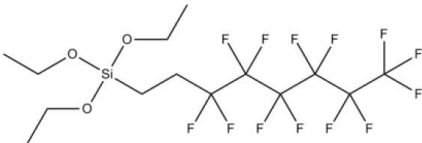
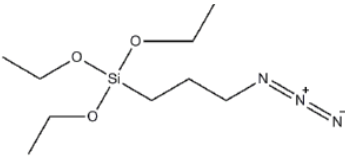
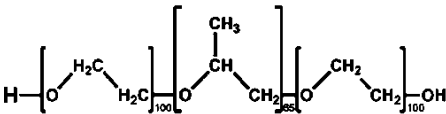
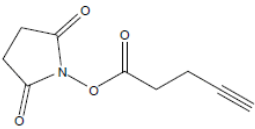
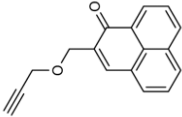
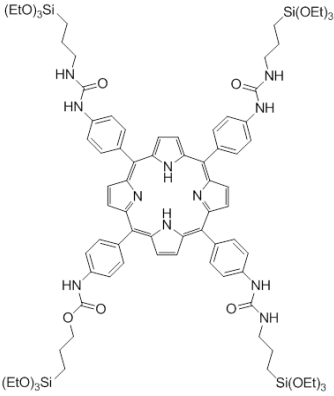
Composé	Représentation	Liaisons chimiques présentes
TEOS		Si-O-C, CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> (alcoxysilane)
TFTS		Si-O-C, CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> (alcoxysilane) CH <sub>2</sub> , CF <sub>3</sub> , CF <sub>2</sub> , C-C linéaire
AzPTES		Si-O-C, CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> (alcoxysilane) CH <sub>2</sub> , Azotures N <sub>3</sub>
F127		CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> C-O aliphatique (éther), OH primaire
Pentynoate de NHS		Alcyne C≡CH et ≡C-H, COO ester, Amide II, C-C aromatique, CH <sub>2</sub> ,
Phénalénone propargylée		Alcyne C≡CH et ≡C-H Ether C-O-C, C=C aromatique, C=O cétone aromatique
Porphyrine tétrasilylée		Si-O-C, CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> (alcoxysilane) Amide I, Amine II (C-N aromatique), C=C aromatique, CH <sub>2</sub>



Tableau A32 – Table des principales bandes de vibrations caractéristiques du matériau, en vue de l'indexation des bandes de vibrations sur les spectres infrarouge

Liaison	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Intensité	Attribution	Présent dans le(s) composé(s)
<b>Si-OH (silanol)</b>	3750-3000	Moyenne	Déformation	TEOS ou AzPTES ou TFTS non totalement condensés
	946	Faible	Elongation	
<b>CH<sub>3</sub></b>	2960	Forte	Elongation asymétrique	F127
	2870	Forte	Elongation symétrique	
	1470-1430	Moyenne	Déformation dans le plan asymétrique	
	1380-1370	Forte	Déformation dans le plan symétrique	
<b>CH<sub>2</sub></b>	2925	Forte	Elongation asymétrique	F127 AzPTES TFTS
	2850	Moyenne	Elongation symétrique	
	1485-1445	Moyenne	Déformation dans le plan	
<b>Azotures -N=N=N-</b>	2080-2160	Moyenne	Elongation asymétrique	AzPTES
<b>CF<sub>3</sub>-CF<sub>2</sub></b>	1299	Faible	Elongation asymétrique CF <sub>2</sub>	TFTS
	1211	Forte	Elongation symétrique CF <sub>3</sub>	
	1149	Forte	Elongation symétrique CF <sub>2</sub>	
	740	Forte	Déformation de -CF <sub>2</sub> avec une terminaison -CF <sub>3</sub> terminale	
<b>Si-O-Si</b>	1100	Forte	Elongation asymétrique	Réseau de silice
	800	Moyenne	Elongation symétrique	
<b>Ether ROR'</b>	1150-1110	Forte	Elongation C-O-C	F127
	1080-1020	Forte	Elongation CH-O-C	
	1050-1000	Forte	Elongation -CH <sub>2</sub> -O-C-	



Tableau A33 – Table des principales bandes de vibrations caractéristiques des molécules utilisées pour la fonctionnalisation, en vue de l'indexation des bandes de vibrations sur les spectres infrarouge

Liaison	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Intensité	Attribution	Présent dans le(s) composé(s)
Alcynes	3310-3200	Forte	≡CH élongation	Pentynoate de NHS Phénalénone
	2140-2100	Moyenne	C≡C élongation	
	700-600	Forte	≡CH déformation hors du plan	
Aromatiques	3080-3030	Variable	=C-H élongation	Phénalénone Porphyrine tétrasilylée
	{ 1600 1580 1500 1450	Variable Variable Moyenne Moyenne	C=C élongation	
Cétone aromatique	1685-1665	Forte	C=O élongation	Phénalénone
Ester RCOOR'	1750-1730	Forte	C=O élongation	Pentynoate de NHS
	1300-1050	Forte	C-O élongation, 2 bandes	
Amide I	{ 3500 – 3100 3400 – 3100	Moyenne à forte Moyenne à forte	N-H élongation	Porphyrine tétrasilylée
	3180	Moyenne à forte	C=O élongation	
	1690-1640 1620-1590	Forte	N-H déformation dans le plan	
Amide II	{ 3500 – 3100 3400 – 3100	Moyenne à forte Moyenne à forte	N-H élongation	Pentynoate de NHS
	1700-1630	Forte	C=O élongation	
	1570-1510	Forte	N-H déformation dans le plan	
Ether ROR'	1150-1110	Forte	Elongation C-O-C	Phénalénone
	1050-1000	Forte	Elongation -CH <sub>2</sub> -O-C-	
Amine II, aromatique	3500-3310	Moyenne	N-H élongation	Porphyrine
	1350-1280	Forte	C-N élongation (aromatique)	



## Annexe 7. Techniques pour caractériser la structuration de la mésoporosité

### 7.1 Microscopie électronique en transmission

La **microscopie électronique en transmission (MET)** utilise un faisceau d'électron à haute tension, focalisé sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau subit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont analysés par le détecteur, ce qui permet d'obtenir une image par contraste électronique.

Les caractérisations ont été réalisées au laboratoire IRCER sur un équipement **JEM – 2100F** de marque Jeol, muni d'une source à effet de champ, et avec une tension d'accélération de **200 kV**. Ceci a permis l'observation des pores du matériau à l'échelle de la dizaine de nanomètres, pour déterminer la structure de la porosité. Ceci a été fait surtout sur des **éclats de microplots**, mis sur une grille à membrane pour observation des éclats en MET.

Des lames minces ont également été préparées par sonde ionique focalisée (**FIB**) pour permettre des observations en coupe des échantillons et caractériser l'évolution de l'organisation de la porosité dans le volume de plots de 5 couches (Figure A176). Les lames minces ont été réalisées par Guillaume Amiard à l'Institut P' de Poitiers, sur un banc de recherche Helios Nanolab G3 CX Dual-Beam de Thermo Fisher Scientific, qui dispose d'une colonne électronique FEG et d'une colonne ionique Ga<sup>+</sup> (20 à 30 kV).

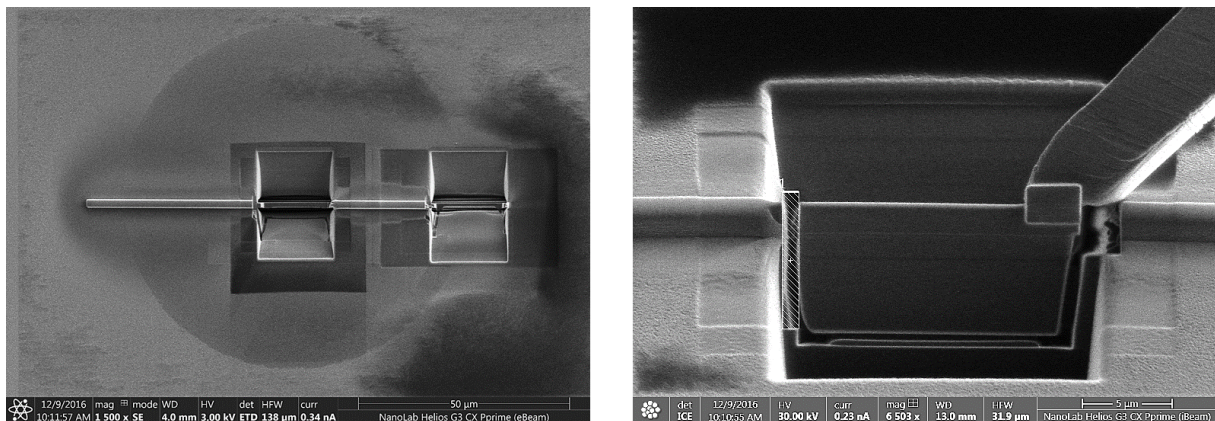


Figure A176 – Préparation de lames minces pour observer la porosité de microplots dans leur section

Pour cela, quelques nanomètres d'or sont déposés sur la surface de l'échantillon, puis des dépôts de protection platine (quelques centaines de nanomètres) sont réalisés. L'usinage est fait par la suite grâce à la source galium. L'alternance d'étapes de protection/usinage permet d'aboutir à des lames minces de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur.



## 7.2 Microscopie à force atomique (AFM)

La **microscopie à force atomique (AFM)** permet de visualiser la topographie de surface d'un échantillon. La méthode consiste à balayer une surface point par point grâce à une pointe en bout d'un microlevier (ou *cantilever*). Cette technique exploite les interactions (attraction/répulsion) entre les atomes en bout de pointe et ceux de la surface de l'échantillon.

La position de la pointe est repérée par un faisceau laser qui tape au niveau de celle-ci, et qui est réfléchi sur une photodiode quatre quadrants (Figure A177). Le scan de la surface crée une déviation du laser qui illumine différemment les quadrants de la photodiode et permet de déduire la position relative de la pointe par le biais d'une différence de tension. Plusieurs modes existent pour pouvoir caractériser la surface d'un échantillon :

- Le **mode contact**, où la pointe appuie sur la surface et est repoussée en raison du principe de Pauli.
- Le **mode non-contact**, où la pointe oscille à sa fréquence de résonance et subit une variation de fréquence d'oscillation induite par l'interaction avec la surface.
- Le **mode *tapping* ou contact intermittent**, où la pointe vibre également avec sa propre fréquence de résonance et avec une certaine amplitude. L'interaction avec la surface crée une diminution d'amplitude qui est mesurée.

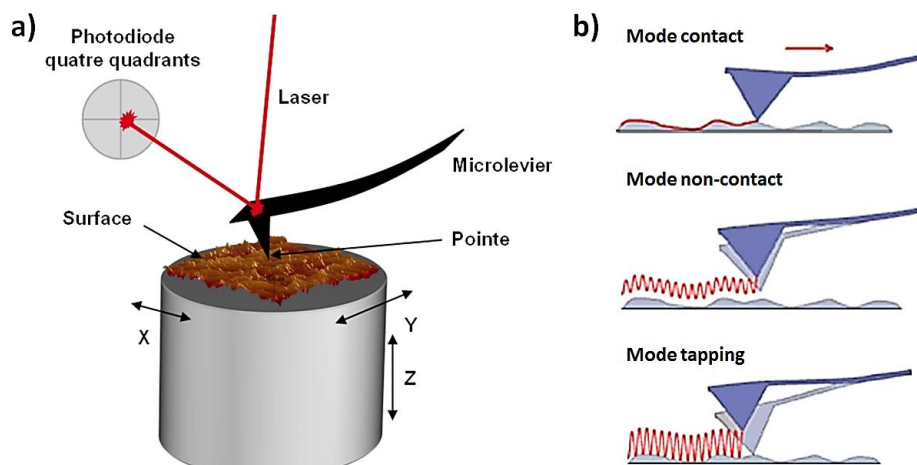


Figure A177 – Principe de la microscopie à force atomique (a) et quelques modes d'utilisations (b)

L'AFM a permis d'observer la **structuration de la porosité en surface des plots**, et de **caractériser l'accroche et la densité des biomolécules (protéines et anticorps)**. Le mode *tapping* a été utilisé pour limiter la friction de la pointe sur l'échantillon et ne pas décrocher les biomolécules du support. Les caractérisations ont été réalisées sur un AFM 5500LS – *Large Sample Motorized Stage* de marque Agilent, avec des pointes souples de type « Fort » (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-type, constante de raideur  $k = 0,6-3,7$  N/m, fréquence d'oscillation  $f = 43-81$  kHz). Ces analyses ont été faites pour des fenêtres d'analyses de  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ .



### 7.3 Diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante (GISAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante (GISAXS) est une méthode de caractérisation structurale qui convient très bien pour l'étude de films minces et d'échantillons mésoporeux. Le principe est illustré en Figure A178.

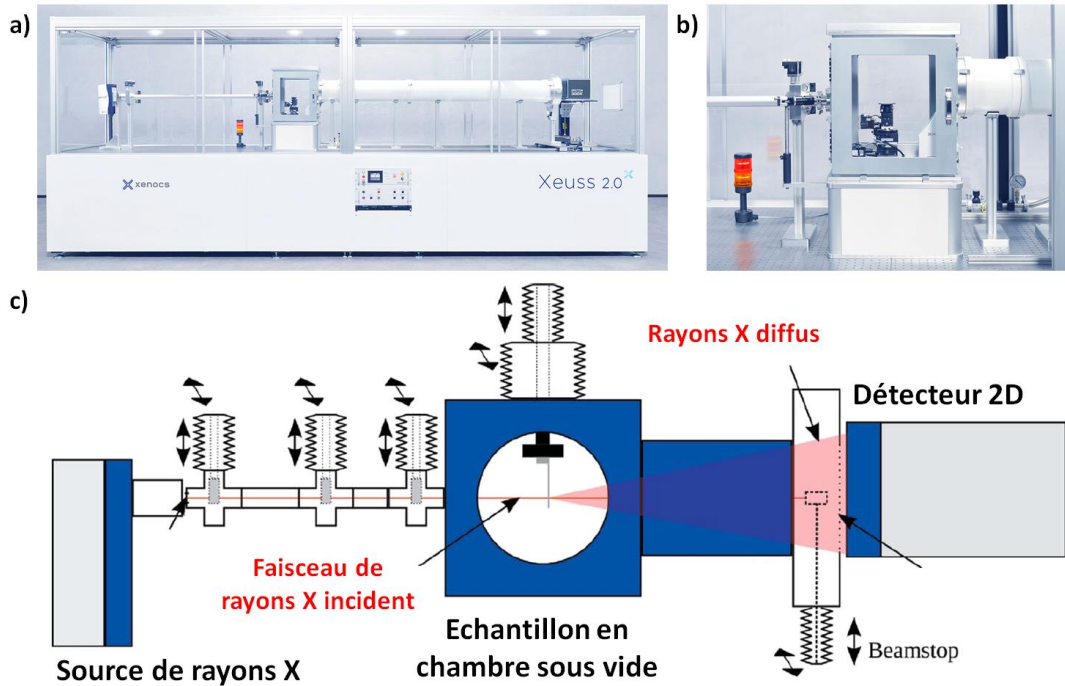


Figure A178 – Photographie d'un banc de mesure GISAXS Xeuss (a) pour l'étude d'un échantillon placé dans la chambre sous vide (b) et schéma explicatif de l'équipement (c)

Le faisceau de rayons X est envoyé sur l'échantillon sous une incidence rasante, avec un angle légèrement supérieur à l'angle critique du substrat. Le faisceau transmis se propage à l'intérieur de l'échantillon et est diffusé lorsqu'il rencontre un contraste électronique, comme dans le cas de micelles de tensioactif ou de pores. Enfin, un détecteur bidimensionnel, placé perpendiculairement au faisceau de rayons X, enregistre les projections du réseau réciproque, qui sont caractéristiques de la structure en présence (Figure A179).

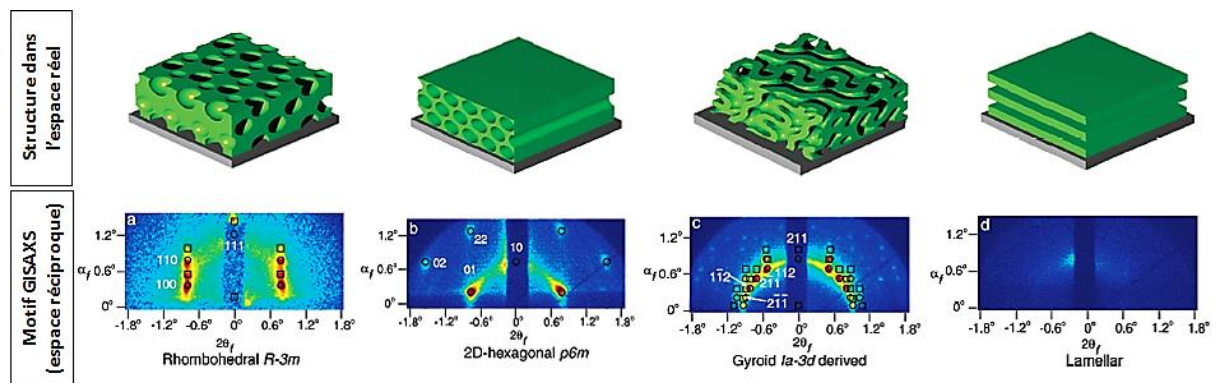


Figure A179 – Exemples de clichés GISAXS obtenus pour différentes structures



En pratique, un traitement de données permet, en réalisant des coupes sur le spectre GISAXS (Figure 50-a), de déduire les positions des taches de diffusion au niveau du détecteur par leurs coordonnées (X ; Y), qui sont corrélées aux coordonnées du vecteur de diffusion ( $q_y$  ;  $q_z$ ). **Les distances caractéristiques de la structure sont déduites des coordonnées du vecteur de diffusion ( $d_y = \frac{2\pi}{q_y}$  et  $d_z = \frac{2\pi}{q_z}$ ), ce qui permet d'identifier la structure rigoureusement, grâce aux indices (hkl).** Même en l'absence de tâche de diffusion, l'analyse des coupes permet, en travaillant sur les anneaux de diffusion, de déduire les distances moyennes du réseau poreux, correspondant au désordre observé dans le plan et hors du plan (Figure 50-b et c).

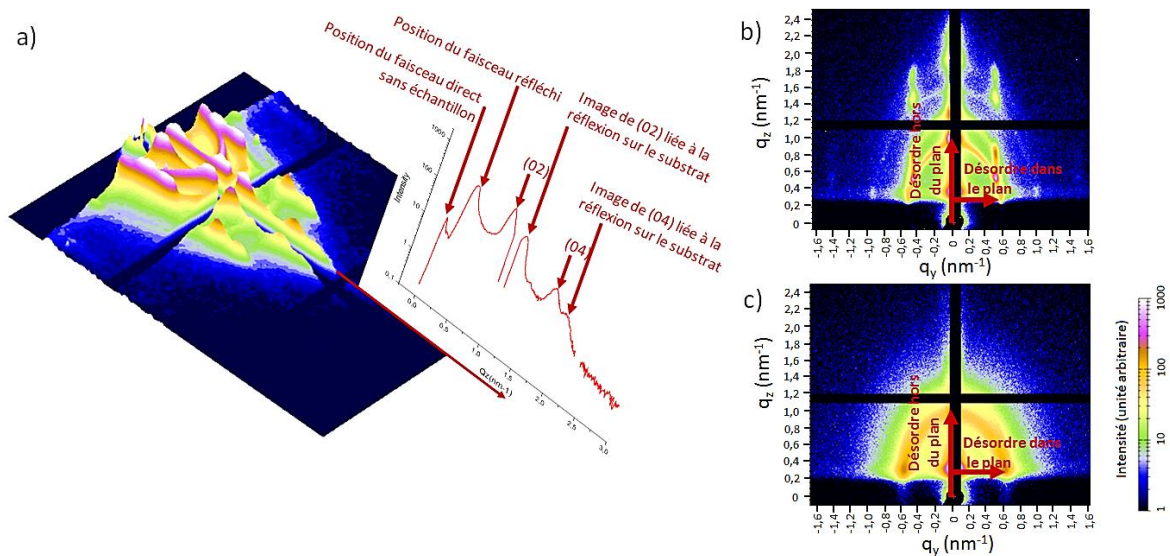


Figure A180 – Exemple de coupe effectuée (a) et qui permet d'estimer le désordre hors du plan et dans le plan pour les échantillons Az0% (b) et Az10% (c). Le dédoublement des taches observé est dû à la réflexion du faisceau incident sur le substrat.

**L'organisation de la porosité a été caractérisée en volume, par diffusion des rayons X aux petits angles en incidence rasante (GISAXS), sur plusieurs équipements :**

- A l'Institut des Matériaux de Paris-Centre (IMPC) par Mohamed Selmane sur un **équipement GISAXS S-MAX 3000** de marque Rigaku, avec un angle d'incidence de  $0,2^\circ$ , un faisceau de taille 0,4 mm (puissance maximum 40 W).
- A l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) par le Pr. Alain Gibaud, sur un **équipement Empyrean I** de marque Malvern Panalytical.
- Au laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN) d'Orléans, sur un **banc de mesure Xeuss** de marque Xenocs, mis à disposition par Pascal et Caroline Andreazza. Les mesures ont été faites avec un angle de  $0,22^\circ$ , une distance échantillon-détecteur de 1170 mm, et une source de type anode cuivre ( $\lambda = 0,15418$  nm,  $E = 8040$  eV) et une puissance maximum de 30 W.



## Annexe 8. Principe du recuit photonique

Le recuit photonique est un nouveau type de recuit qui consiste à exposer les échantillons à un flash lumineux de haute intensité (Figure A181), de faible durée (quelques millisecondes) et sur une large plage de longueurs d'onde, du fait de l'utilisation d'une lampe Xénon. La société Polytec propose ce type de produit, ainsi que la société Novacentrix.

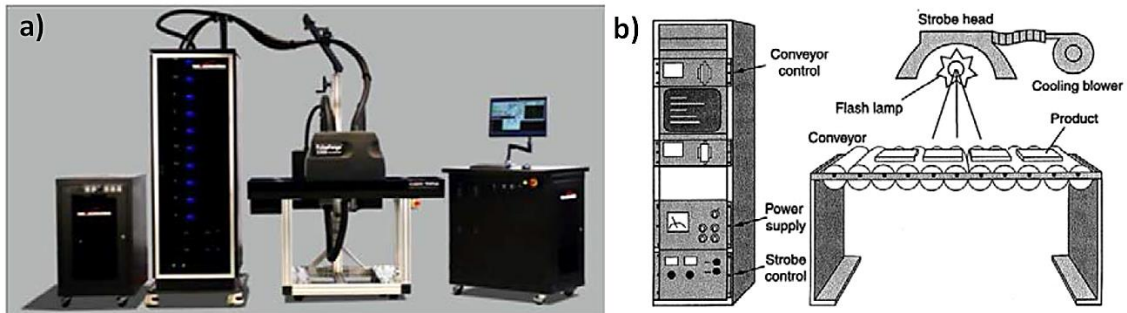


Figure A181 – Photographie de l'équipement PulseForge 3300 (a) et schéma du montage (b)<sup>9</sup>

Ce type de traitement présente l'avantage d'être extrêmement rapide, très sélectif en épaisseur (environ 10 microns) et ouvre la voie vers la possibilité de traiter une couche sans altérer son substrat. Outre l'application en tant que recuit, cela peut également être utilisé pour des applications de séchage, de photo-polymérisation ou de décontamination de surfaces.

Les flashes lumineux sont obtenus à partir d'une décharge capacitive créant des pulses électriques (Figure A182). Ce type de recuit s'avère **particulièrement intéressant pour le traitement post-impression de dépôts par impression jet d'encre**. Cette technique possède l'avantage de dissiper la chaleur rapidement au niveau du substrat, grâce à des pulses de très faible durée, permettant de traiter des matériaux sur de nombreux supports, (verres, plastiques, etc). Néanmoins, du fait d'une forte énergie appliquée, des problèmes de décollage peuvent parfois être observés, liés à l'adhésion des dépôts sur le substrat.

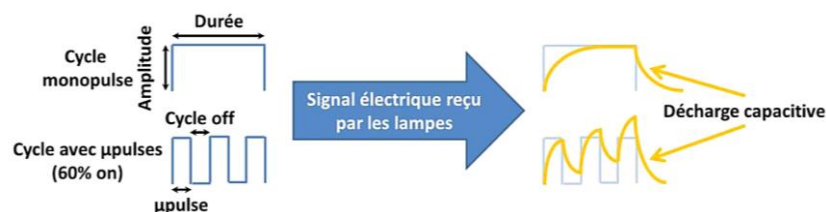


Figure A182 – Principe de fonctionnement des décharges capacitives sous forme de pulses <sup>10</sup>

<sup>9</sup> West *et al.*, « Photonic sintering – an example: photonic curing of silver nanoparticles ».

<sup>10</sup> Drahi, « Impression de silicium par procédé jet d'encre : des nanoparticules aux couches minces fonctionnelles pour applications photovoltaïques ».





## **Annexe 9. Protocole de biofonctionnalisation des microplots mésoporeux**

---

### **Matériel requis :**

- PBS : pH 8 et pH 7,2-7,5
- Plaque 24 puits
- Solution de lavage : Tween-20 à 0.05% dans du PBS (pH 7.2-7.5)
- Ethanolamine 1M, pH 8.5

### **Greffage des protéines G :**

- Laver les lamelles de verre avec 500 µL de PBS pH 8. Incuber pendant 5 min sur plateforme d'agitation. Répéter 1 fois pour un total de 2 lavages.
- Diluer la protéine G marquée dans du PBS pH 8 jusqu'à concentration finale de 150 µg/mL. Ajouter environ 200 µL de la solution de protéines G dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber pendant 2 h sur plateforme d'agitation à température ambiante.
- Vider les puits et laver avec 300-500 µL de solution de lavage. Incuber 5 minutes sur plateforme d'agitation. Répéter 2 fois pour un total de 3 lavages.
- Bloquer les NHS non réactifs par ajout de 300-500 µL de solution d'éthanolamine 1M pH 8,5. Incuber 7 min à température ambiante.
- Vider les puits et laver avec 300-500 µL de solution de lavage. Incuber 5 minutes sur plateforme d'agitation. Répéter 2 fois pour un total de 3 lavages.

### **Greffage des anticorps anti-TrkB :**

- Diluer l'anticorps anti-TrkB dans du PBS pH 7,2-7,5 jusqu'à concentration finale de 100 µg/mL. Ajouter environ 200 µL de la solution d'anticorps dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber pendant 2 h sur plateforme d'agitation à température ambiante.
- Vider les puits et laver avec 300-500 µL de solution de lavage. Incuber 5 minutes sur plateforme d'agitation. Répéter 2 fois pour un total de 3 lavages.

### **Mise en contact de l'antigène TrkB :**

- Diluer l'antigène TrkB (*recombinant human TrkB Fc Chimera*) dans du PBS pH 7,2-7,5 jusqu'à concentration finale de 50 µg/mL. Ajouter 200 µL de la solution d'antigène dans chaque puits. Couvrir et laisser incuber pendant 30 à 60 min sur plaque d'agitation à température ambiante.
- Vider les puits et laver avec 300-500 µL de solution de lavage. Incuber 5 minutes sur plateforme d'agitation. Répéter 2 fois pour un total de 3 lavages. Vider les puits et rincer au PBS.



## Annexe 10. Caractérisation par microscopie confocale

La microscopie à fluorescence conventionnelle présente comme inconvénient majeur d'avoir une faible résolution, du fait d'une émission de fluorescence défocalisée, qui se superpose à l'image du plan focal. **La microscopie confocale est un moyen de palier à cela, car elle permet d'obtenir uniquement la fluorescence dans un plan précis.**

De nombreuses sources sont disponibles (laser, hélium / néon, argon) et à différentes longueurs d'ondes entre 405 et 633 nm. Le faisceau laser incident est amené à éclairer l'échantillon au moyen de filtres, de miroirs dichroïques et de lentilles de focalisation (Figure A183). L'appareil est équipé d'un *pinhole* (sténopé) situé devant le détecteur, qui permet de récupérer uniquement la fluorescence de la zone de l'échantillon sélectionnée, car le *pinhole* est situé dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). En d'autres termes, seuls les photons du plan focal de l'échantillon passent le sténopé et participent à la formation de l'image au niveau du détecteur, ce qui garantit une très bonne résolution.

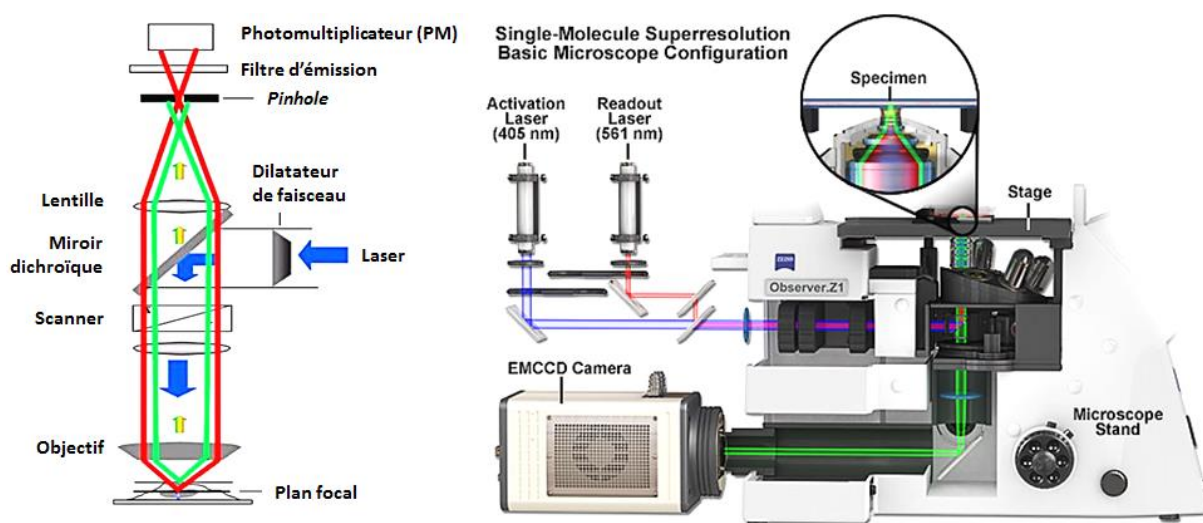


Figure A183 – Schéma de principe d'un microscope confocal

L'ouverture du *pinhole* permet d'acquérir davantage de signal, mais diminue la résolution et la qualité de l'image. L'ouverture du *pinhole*, la puissance laser et le temps d'acquisition sont des paramètres à déterminer pour obtenir des images intéressantes. **L'appareil permet de travailler en mode multicanaux, et d'acquérir la fluorescence d'un échantillon par rapport à plusieurs longueurs d'ondes**, puis de reconstituer l'image globale par superposition des images obtenues aux différentes longueurs d'ondes.

**Les caractérisations ont été réalisées sur un microscope confocal LSM 880 de marque Zeiss**, équipement situé au niveau de la plateforme Cytométrie, Imagerie et Mathématiques, sur le campus de la Faculté de Pharmacie de l'université de Limoges.



## Annexe 11. Protocole de synthèse du pentynoate de NHS

Plusieurs réactions amènent à la synthèse du pentynoate de NHS (Figure A184). Du diisopropylcarbodiimide (0,79 mL, 5,1 mmol) est ajouté à une solution de N-HydroxySuccinimide (0,59 g, 5,1 mmol) et d'acide 4-pentynoïque (0,50 g, 5,1 mmol) dans un mélange d'acétate d'éthyle (25 mL) et de dioxane (25 mL) refroidie à 0 °C dans un bain de glace. Après 30 minutes, le bain de glace est enlevé et le mélange est agité à température ambiante pendant 18 h.

Un précipité blanc de diisopropylurée commence à se former 20 minutes après l'addition. Au bout de 18 h, la solution est filtrée sur verre fritté, puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle (100 mL), puis lavé avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (3 fois), puis à l'eau et enfin avec une solution saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis concentrée à l'évaporateur rotatif. Le résidu est dissous dans du dichlorométhane (20 mL) puis du pentane (20 mL) est ajouté en mélangeant doucement. Le mélange est refroidi au congélateur à -18 °C. Au bout de 20 h, de fines aiguilles de diisopropylurée cristallisent. Le mélange est filtré, du pentane est ajouté (5 mL), puis la solution est laissée au congélateur pendant 20 h. Le pentynoate de NHS cristallise sous forme de plaquettes. Il est isolé par filtration, puis séché sous air.

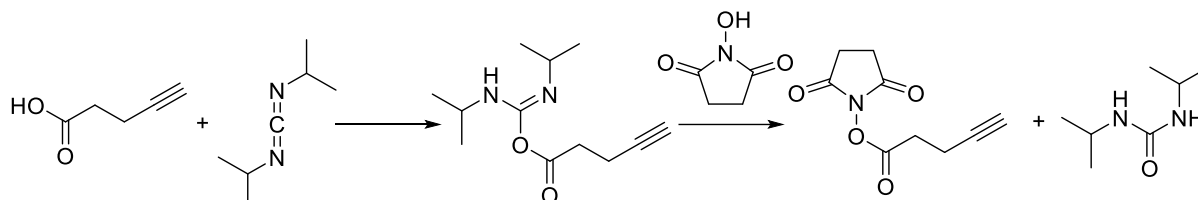


Figure A184 – Réactions de synthèse aboutissant à la formation du pentynoate de NHS

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 2.82-2.91(m, 6H), 2.62 (td, J = 7 Hz, J = 3 Hz, 2H), 2.5 (t, J = 3 Hz, 1H) ppm;

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 168.8, 166.9, 80.8, 69.9, 30.5, 25.5, 14.0 ppm;

**IR (KBr)** : 3282, 2924, 1814, 1784, 1734, 1372, 1206, 1069, 647 cm<sup>-1</sup>

**Référence** : J.L. Bartels, P. Lu, A. Walker, K. Maurer, K.D. Moeller, "Building addressable libraries: a site-selective click-reaction strategy for rapidly assembling mass spectrometry cleavable linkers - Supplementary infos", Chemical Communications, 2009, no. 37, pp. 5573-5575.



## Annexe 12. Protocole de marquage des Protéines G

### Contenu du kit :

- Component A : Alexa 594 – 3 vials
- Component B : NaHCO<sub>3</sub> – 1 vial
- Component C : Tubes de réaction – 3 vials
- Component D : Filtres de centrifugation – 3
- Component E : Résine de purification – environ 3 mL

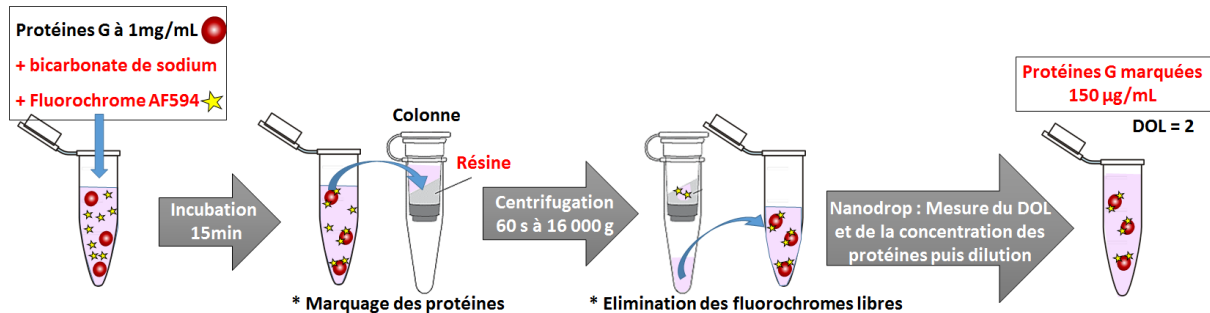


Figure A185 – Schéma synthétique du protocole de marquage des protéines par un fluorochrome

### Réaction de marquage :

- Ajouter 1 mL d'eau dé-ionisée dans le bicarbonate de sodium (B). Mélanger (vortex ou pipetage) jusqu'à dissolution. Conserver à 4 °C pour 2 semaines ou congélation si conservation plus longue.
- Transférer entre 20 et 100 µL d'une solution protéique à 1 mg/mL (reprise dans un tampon de PBS) dans un tube de réaction (C). Ajouter 1/10 en volume (2 à 10 µL) de bicarbonate de sodium (B). Mélanger en pipetant.
- Ajouter 10 µL d'eau dé-ionisée dans un vial d'Alexa 594 (A). Mélanger en pipetant.  
**NB : à préparer au dernier moment !**
- Ajouter 8,7 µL de dye au vial C (pour 100 µg de protéines G). Mélanger en pipetant.
- Incubation 15 min à température ambiante.

### Purification du conjugué :

- Resuspendre délicatement la résine (E) et remplir un des filtres (D) jusqu'au bord (environ 800 µL de résine nécessaire). Centrifuger 15 secondes à 16 000 g (*run-up time* inclus). Attention au package en fonction de la centrifugeuse ! Rajouter de la résine si besoin (cf. fiche tech 2.1). Si de la résine tombe dans le tube collecteur, rincer celui-ci au PBS pH=7,2.
- Une fois la colonne préparée, ajouter 50 µL maximum du conjugué (C) sur la colonne au centre de la résine. Centrifuger 1 min à 16 000g (*run-up time* inclus).
- Le tube collecteur contient la protéine marquée AF594 (le dye libre reste dans la colonne).



## Annexe 13. Protocole de marquage des Anticorps anti-TrkB

### Contenu du kit :

- Component A : Alexa 546 – 5 vials
- Component B : NaHCO<sub>3</sub> – 1 vial
- Component C : Résine de purification- environ 10 mL
- Component D : Colonnes de filtration par centrifugation – 5 vials
- Component E : Tubes collecteurs - 5

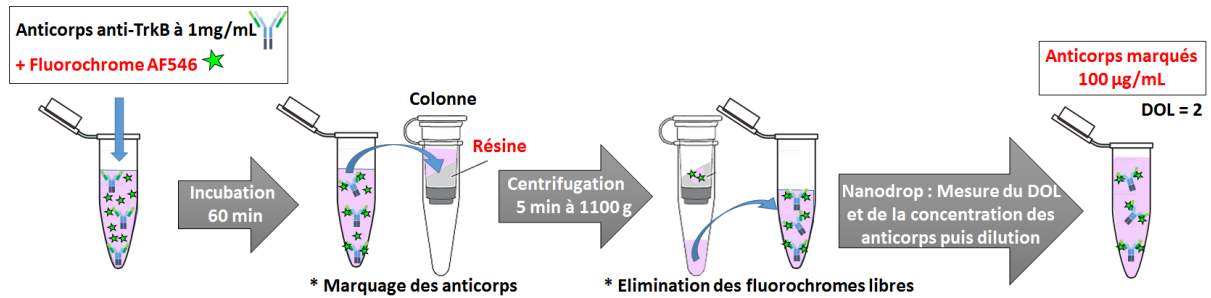


Figure A186 – Schéma synthétique du protocole de marquage des anticorps par un fluorochrome

### Réaction de marquage :

- Ajouter 1 mL d'eau dé-ionisée dans le bicarbonate de sodium (B). Mélanger (vortex ou pipetage) jusqu'à dissolution. Conserver à 4 °C pour 2 semaines ou congélation si conservation plus longue. Cette solution peut servir à reprendre l'anticorps.
- Ajouter 100 µL d'anticorps (soit 100 µg) dans un vial d'Alexa 546 (A). Mélanger très délicatement par retournement jusqu'à dissolution du dye (enlever l'étiquette pour voir).
- Incubation 1 h à l'ambiante. Mélanger délicatement par retournement toutes les 10-15 min.

### Purification du conjugué :

- Placer la colonne (D) sur un tube 13 x 100 mm en verre ou plastique et insérer les deux frittés dans la colonne, les pousser vers le bas de la colonne si besoin.
- Remuer la résine (C) et ajouter 1 mL de suspension à la colonne. Laisser se vider. Continuer à ajouter de la suspension jusqu'à ce que le volume final soit ~ 1,5 mL. Laisser le tampon de la colonne s'écouler par gravité.
- Placer la colonne dans un des tubes de prélèvement et centrifuger 3 min à 1 100g.
- Déposer les 100 µL (component A + Anticorps) goutte à goutte sur le centre de la résine au sommet de la colonne. Laisser absorber dans le gel.
- Placer la colonne sur un tube collecteur (E). Centrifuger 5 min à 1 100g (*run up time* inclus).
- Après centrifugation, le tube collecteur contient l'anticorps marqué dans environ 100 µL de PBS, pH 7,2. Le dye libre reste dans la colonne.



## Annexe 14. Estimation de la quantité d'alcynes clickés par dosage UV-visible de p-nitrophénol

Il s'avère difficile de pouvoir quantifier la quantité d'azotures (-N<sub>3</sub>) présente au sein des microplots. Il en va de même pour quantifier la quantité de pentynoate de NHS clické sur les échantillons. Des méthodes chimiques comme l'ICP, ou spectroscopiques comme l'XPS, sont des techniques adaptées pour quantifier de petites quantités, mais s'avèrent très délicates à mettre en œuvre avec l'élément azote, qui est très léger. **Jusqu'à présent, la quantité d'azotures présente dans les plots a été estimée par l'intermédiaire de la formulation et du volume des gouttes de sol déposées.**

Les conversions de click calculées précédemment sont estimées de façon semi-quantitative, toujours par comparaison avec une référence. **Il semblait néanmoins intéressant de pouvoir quantifier au mieux la quantité de fonctions NHS clickées, afin d'avoir une idée du nombre de protéines qui peuvent être greffées sur cette surface et faire par la suite le lien avec d'autres techniques (AFM, microscopie confocale, etc.).** Ceci a pu être approché par une méthode de dosage en spectroscopie UV.

Le test consiste à cliquer une molécule, le **pentynoate de p-nitrophénol (MW = 219,15 g/mol)**, dans les mêmes conditions que le pentynoate de NHS (MW = 248 g/mol), en faisant l'hypothèse que ces deux molécules, de poids moléculaires proches, se clickent de la même façon. Ensuite, **une solution d'éthanol contenant 0,1 M de NaOH est utilisée pour cliver le p-nitrophénol, libéré en solution et qui peut être dosé de façon quantitative.** Pour cela, une référence de p-nitrophénol pur est utilisée afin de réaliser une échelle de dilution, caractérisée en spectroscopie UV-visible et qui donne une courbe de calibration (Figure A187). **L'expérience permet alors de doser le p-nitrophénol du pentynoate clické sur les échantillons et de calculer le taux de fonctions azotures clickées.**

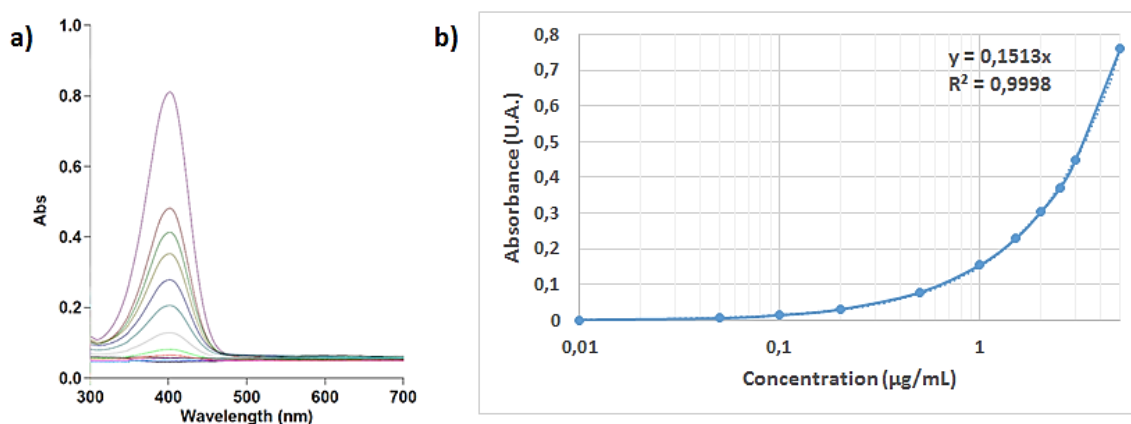


Figure A187 – Dosage des échantillons étalons du p-nitrophénol (a) et courbe d'étalonnage (échelle log) réalisée avec les absorbances mesurées (b)



## Annexe 15. Démonstrations d'équations utilisées pour traiter les données de fluorescence

### 15.1 Caractéristiques des fluorochromes utilisés

Un fluorochrome est caractérisé par plusieurs propriétés :

- Un **coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$**  ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) le plus élevé possible. C'est la capacité d'un fluorochrome à absorber l'énergie apportée par un photon à une longueur d'onde.
- Un **rendement quantique  $\Phi$**  élevé. C'est la capacité du fluorochrome à réémettre, sous forme de lumière, l'énergie absorbée. Il est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés ( $\Phi = 1$  pour 100% de photons réémis).
- Une **brillance** ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) élevée. Elle est le produit du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  et du rendement quantique  $\Phi$  du fluorochrome. Plus un fluorochrome est brillant, plus il sera facile de le détecter pour de faibles concentrations dans la cellule.
- Une **photostabilité** élevée avec une faible sensibilité au photoblanchiment. Le photoblanchiment intervient lorsqu'un fluorochrome perd sa capacité à fluorescer. Ceci est la conséquence de réactions chimiques intervenant entre le fluorochrome et des molécules de son environnement comme l'oxygène.
- Un **déplacement de Stokes** (nm) le plus grand possible afin de s'affranchir de la contamination due à la source d'excitation.
- Une **durée de vie de fluorescence** élevée (valable pour certaines techniques de transfert d'énergie) : la durée de vie correspond à la durée moyenne pendant laquelle un fluorochrome reste à l'état excité.

Tableau A34 – Données de fluorescence des fluorochromes utilisés <sup>11</sup>

Alexa Fluor	Absorption (nm)	Emission (nm)	Couleur	Coefficient d'extinction $\epsilon$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )	Rendement quantique $\phi$	Brillance	Temps de vie (ns)
AF 488	495	519	Vert	71 000	0.92	65 320	4.1
AF 546	556	573	Orange	104 000	0.79	82 160	4.1
AF 594	590	617	Rouge	73 000	0.66	48 180	3.9
AF 647	650	665	Rouge lointain	239 000	0.33	78 870	1.0

<sup>11</sup> Brown et Poujol, « Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie confocale, Formation Permanente CNRS »; « Fluorescence quantum yields (QY) and lifetimes ( $\tau$ ) for Alexa Fluor dyes ».



## 15.2 Démonstration des équations de fluorescence

- D'après la définition du DOL, pour une molécule M marquée par un fluorochrome AF, **le DOL est le nombre moyen de fluorochromes AF par molécule M**, soit :

$$\boxed{DOL(M_{AF}) = \frac{N_{AF}}{N_M}} \quad \text{Autrement dit : } \boxed{N_{AF} = DOL(M_{AF}) \times N_M}$$

- Le **rendement quantique** d'un fluorochrome AF se définit comme le rapport du nombre de photons émis (ou intensité lumineuse émise) par rapport au nombre de photons absorbés (ou intensité lumineuse absorbée), soit :  $\boxed{I_{Em} = \varphi \times I_{Abs}}$

- D'après la **loi d'absorption de Beer-Lambert**, l'absorption d'un fluorochrome AF est proportionnelle au produit du coefficient d'extinction molaire par la concentration en fluorochromes. Autrement dit, pour une surface 2D constante (ou volume 3D constant) constante, l'absorption est proportionnelle au produit du coefficient d'extinction molaire par le nombre de fluorochromes, ce qui se traduit par :

$$I_{Abs} = k \varepsilon N_{AF} = k \varepsilon \cdot DOL(M_{AF}) \cdot N_M \quad \text{d'où} \quad \boxed{I_{Em} = k \varphi \varepsilon \cdot DOL(M_{AF}) \cdot N_M}$$

Avec k un coefficient de proportionnalité relatif aux dimensions du système considéré

Remarque : le produit  $\varphi\varepsilon$  correspondant à la brillance du fluorochrome, l'égalité traduit simplement que l'intensité du fluorochrome est proportionnelle à la brillance intrinsèque du fluorochrome, multipliée par le nombre de fluorochromes ( $N_{AF} = DOL(M_{AF}) \times N_M$ ) et par rapport aux dimensions considérées (k).

- Il est possible d'appliquer l'égalité précédente à un couple de fluorochromes, comme par exemple dans le cas de l'étude, à une protéine G marquée par un fluorochrome accepteur AF594 (émission à 617 nm) et un anticorps (Ac) marqué par un fluorochrome donneur AF488 (émission à 519 nm) :

Pour la protéine G marquée AF594 :  $I_{617\text{ nm}} = k \varphi_{(AF594)} \varepsilon_{(AF594)} \cdot DOL(G_{AF594}) \cdot N_G$

Pour l'anticorps marqué AF488 :  $I_{519\text{ nm}} = k \varphi_{(AF488)} \varepsilon_{(AF488)} \cdot DOL(Ac_{AF488}) \cdot N_{Ac}$

- Le rapport des intensités d'émission, permet ensuite de s'affranchir du coefficient k :

$$\frac{I_{\text{accepteur}}}{I_{\text{donneur}}} = \frac{I_{617\text{ nm}}}{I_{519\text{ nm}}} = \left[ \frac{\varphi_{(AF594)} \varepsilon_{(AF594)} \cdot DOL(G_{AF594})}{\varphi_{(AF488)} \varepsilon_{(AF488)} \cdot DOL(Ac_{AF488})} \right] \times \frac{N_G}{N_{Ac}}$$

Ainsi, le rapport des intensités est proportionnel au rapport du nombre de protéines G par le nombre d'anticorps. **Il est donc possible, connaissant le rapport des intensités (mesurées sur les spectres d'émission obtenus), de quantifier le rapport  $N_G/N_{Ac}$  et déduire les proportions relatives d'anticorps et de protéines.**





### 15.3 Calcul de l'intégrale $J(\lambda)$ pour les couples de fluorochromes

Considérant un couple de fluorochromes, l'un des critères pour qu'il y ait effet FRET est qu'il y ait un recouvrement du spectre d'émission du donneur, avec le spectre d'absorption de l'accepteur. Ceci peut être quantifié par l'intégrale  $J = \int f_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda$  (Figure A188), avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $f_D$  l'intensité émise par le donneur et  $\epsilon_A$  le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.

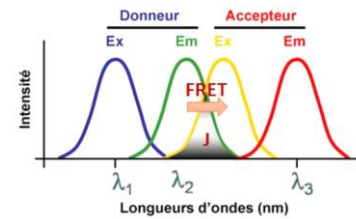


Figure A188 – Illustration de l'intégrale de recouvrement  $J$

Le logiciel Spectraviewer permet d'obtenir les courbes d'émission et d'absorption des fluorochromes choisis (Figure A189), qui sont normalisées en intensité par rapport à la source d'excitation. La courbe de recouvrement est ensuite déduite par tracé des courbes d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (Figure A190), qui est ensuite intégrée sur son intervalle de définition pour déduire la valeur de l'intégrale  $J$  du couple (Figure A191).

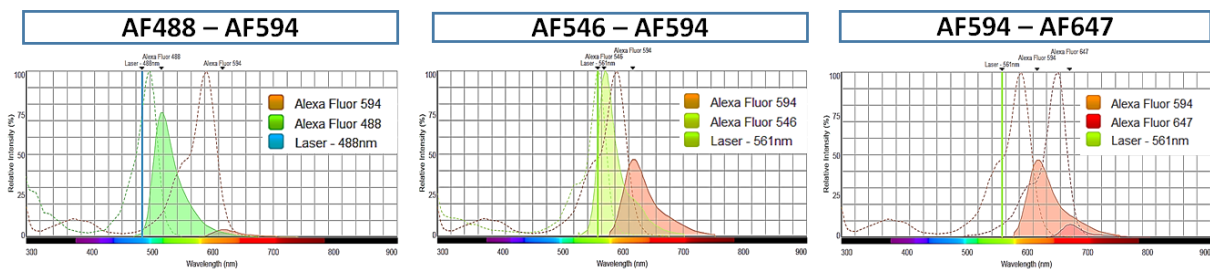


Figure A189 – Données exploitées à partir du logiciel Spectraviewer de Thermo Fischer

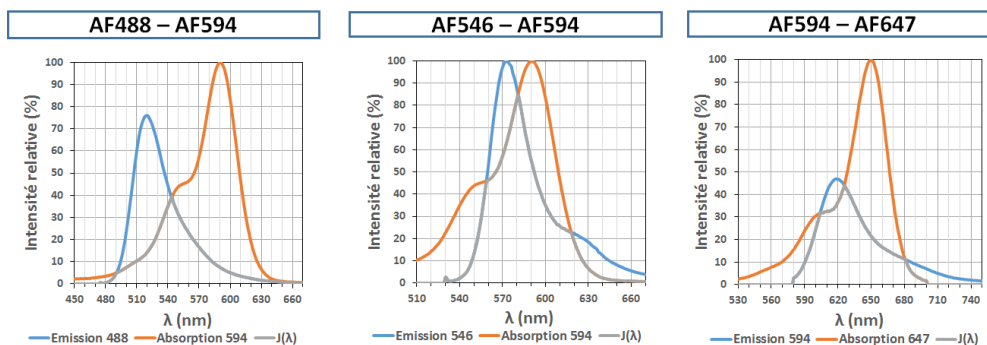


Figure A190 – Tracé de la courbe de recouvrement à partir du tracé des courbes d'émission du fluorochrome donneur et d'absorption du fluorochrome accepteur

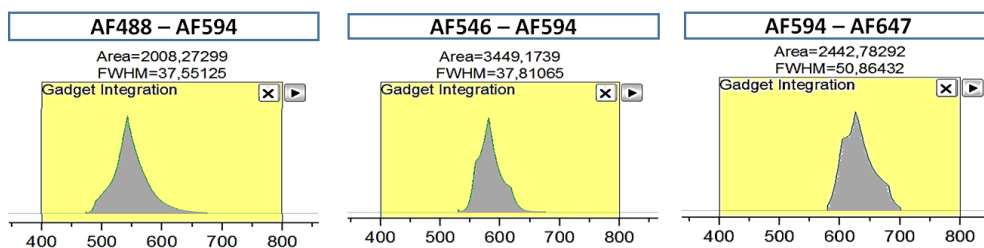


Figure A191 – Intégration de la courbe de recouvrement sur son intervalle de définition



## Annexe 16. Protocole de synthèse des photosensibilisateurs

### 16.1 Protocole de synthèse de la porphyrine tétra-triéthoxysilane

Un mélange de porphyrine tétraamine (avec 100 mg, soit  $1,4 \cdot 10^{-2}$  mmol), de N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA, 5,61 mg), de 3-(triéthoxysilyl)propyl isocyanate (181,3 mg) et du THF anhydre (5 mL) est placé dans un flacon de Schlenk sous argon. La réaction est ensuite conduite à 80 °C sous agitation magnétique à 750 rpm durant 36 h (Figure A192).

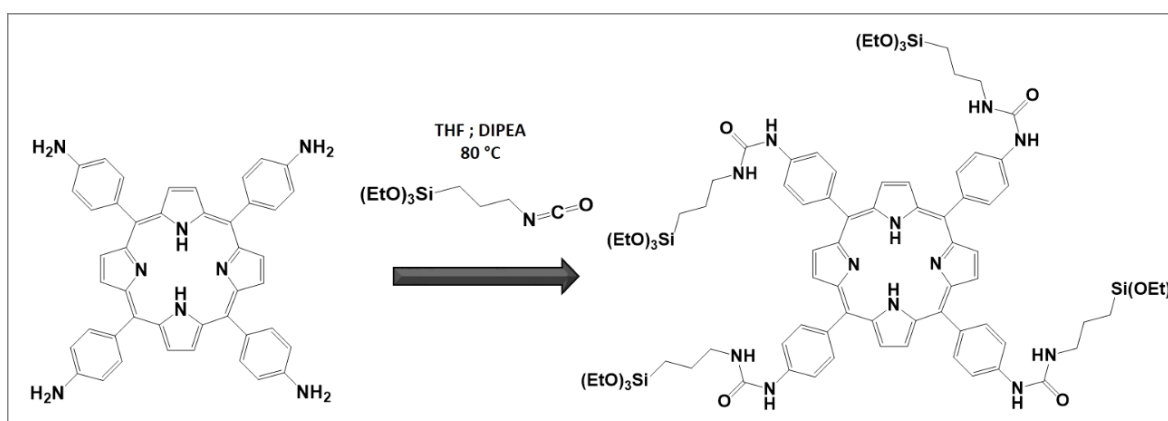


Figure A192 – Exemple de protocole de synthèse de la porphyrine tétra-triéthoxysilane à partir d'un mélange de solvant avec THF et une base DIPEA

Après évaporation du solvant, le précurseur formé est lavé avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt). Le surnageant est prélevé puis recristallisé par précipitation sous hexane. Le procédé est répété 4 fois. La porphyrine tétra-triéthoxysilane formée est ensuite séchée 24 h sous vide.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : δ (ppm) 8.90 (s, 8H, H<sub>B</sub>pyrrole), 8.87 (s, 4H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 8.06 (d, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, 8H, H<sub>3,5</sub>aryl), 7.83 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 8H, H<sub>2,6</sub>aryl), 6.40 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, CO-NH-Ph), 3.80 (q, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 24H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.19 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 36H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.60 (t, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 8H, CH<sub>2</sub>-Si).

**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** : δ 155.9, 141.1, 136.1, 135.3, 134.3, 120.4, 116.5, 113.1, 58.3, 42.4, 23.9, 18.8, 7.9.

**<sup>29</sup>Si NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** : δ -45.1.

**FTIR (KBr) (cm<sup>-1</sup>)** : 2939, 1644, 1589, 1532, 1429, 1345, 1261, 1242, 1139, 1035, 810, 670.

**UV-Vis (EtOH) λ<sub>max</sub>, nm** : 425, 520, 563, 603, 655.

**MALDI-TOF** : calcd for Formula C<sub>84</sub>H<sub>118</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>Si<sub>4</sub>: 1662.79, found 1662.8.

**Référence** : Chiara Mauriello Jiménez, « Nanoparticules à visées théranostiques pour le traitement du cancer par thérapie photodynamique à un ou deux photons », Thèse d'Université, Université de Montpellier, 2016.



## 16.2 Protocole de synthèse de la phénalénone propargylée

**Nom IUPAC :** 2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-1*H*-phenalen-1-one

**Nom commun :** Phénalénone propargylée

**Abréviation :** PNP

Un mélange de 912 mg (4 mmol) de PNCl, 896 mg (16 mmol) d'alcool propargylique, 40 mL de toluène, 200 mg de iodure de tertiobutylammonium (TBAI) et 40 mL de NaOH à 5 M est mis à réagir sous agitation vigoureuse pendant 24 h (Figure A193). Une fois la réaction terminée, 80 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés. La phase organique est récupérée, lavée à l'eau, séchée, évaporée et le brut est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) pour donner 647 mg (2,6 mmol, 65%) de poudre jaune pure.

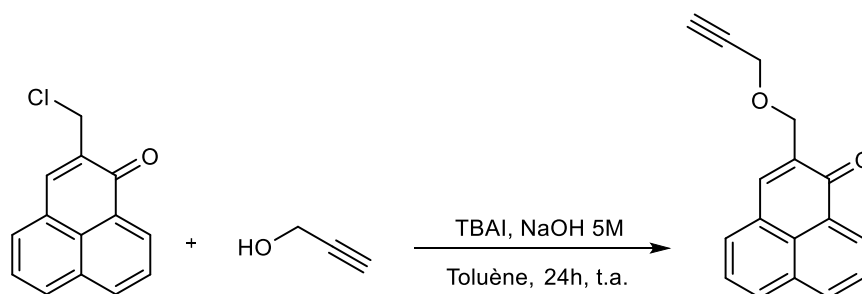


Figure A193 – Exemple de synthèse de la phénalénone propargylée

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) :** δ (ppm) = 8.65 (dd, *J* = 1, 7.3 Hz, 1H), 8.21 (dd, *J* = 0.5, 7.9 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 7.2, 8.1 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H), 4.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) :** δ (ppm) = 184.3, 137.83, 136.14, 134.96, 132.04, 131.53, 131.49, 130.46, 129.18, 127.62, 127.11, 127.07, 126.80, 79.62, 74.82, 66.79, 58.42

**IR (Solide) :** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3260 (C-H alcyne), 2856 (-CH<sub>2</sub>- alcane), 2109 (C-C alcyne), 1634 (C-O cétone), 1625 (C-C alcène), 1566 (C-C aromatique), 1098 (C-O éther).

**UV-vis (éthanol) :** λ nm = 252, 321, 362, 390

**Masse molaire :** 248,28 g/mol

**Point de fusion :** 125 °C

**Masse :** HRMS (ESI<sup>+</sup>), calcd for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> : 249.091006, found 249.091015

**Référence :** Brevet US 2014/0039184 A1 "Phenalene-1-one derivatives, method for producing same and use thereof"



## Annexe 17. Protocole de dosage MTT pour estimer la viabilité cellulaire

### 17.1 Préparation de la solution stock de MTT

Préparation de 10 mL d'une solution de MTT à 5 mg/mL (12 mM) :

- Peser 50 mg de MTT et les dissoudre dans 10 mL de PBS 1X.
- Vortexer pour homogénéisation.
- Filtrer à 0,2 µm pour stérilisation.

NB : cette solution peut être conservée pendant 4 semaines à 4 °C dans le noir.

### 17.2 Préparation de la solution de solubilisation

- Peser 200 mg de SDS sous hotte et les dissoudre dans 10 mL d'eau distillée sous agitation à 25-30 °C. La solution est une solution de SDS à 2%.
- Faire un mélange volumique 1:1 de la solution de SDS 2% avec de l'isopropanol.
- Ajouter du HCl pour une concentration finale de 0,05 M (dilution du HCl à 1/240, soit 41,7 µL pour 10 mL préparés) puis vortexer pour homogénéisation.

### 17.3 Incorporation du MTT par les cellules

Les cellules ont été préalablement ensemencées dans des puits et les lamelles de verre doivent être retirées des puits avant de réaliser l'incorporation du MTT par les cellules.

- Préparer en milieu de culture une solution de MTT à 0,5 mg/mL (dilution 1/10 soit 1 mL de la solution de MTT ajouté à 9 mL de milieu de culture).
- Chauffer à 37 °C la solution de MTT préparée.
- Remplacer le milieu de culture par la solution de MTT : 250 µL par puits en plaque 24 puits (pour les lamelles) et 100 µL par puits en plaque 96 puits (pour les fibres).
- Incuber à 37 °C pendant 1 h minimum jusqu'à ce que les cristaux soient visibles au microscope optique.

### 17.4 Dosage par spectroscopie UV

- Retirer le milieu de culture et recouvrir les cellules avec la solution de solubilisation : 150 µL/puits en plaque 24 puits (lamelle) ou 30 µL/puits en plaque 96 puits (fibre).
- Incuber dans le noir de 30 min à 1 h jusqu'à ce que les cristaux soient solubilisés, ou bien sous agitation 5 min.
- Homogénéiser puits par puits à la pipette puis transférer 50 µL de surnageant dans des puits d'une plaque 96 puits ½ puits (Costar) pour lecture.

*NB : Des duplicas/triplicas peuvent être réalisés, mais il est possible que le dernier volume prélevé soit inférieur à 50 µL en raison d'une évaporation de la solution de solubilisation. Dans ce cas, ne pas mesurer le volume en question qui donnerait une absorbance moindre.*

- Lire l'absorbance à 595 nm sans oublier d'inclure des blancs dans certains puits. La densité optique doit être élevée (> 0,75) pour que la mesure soit jugée fiable.







## Dépôt par impression jet d'encre de microplots de silice mésoporeuse à l'extrémité de fibres optiques et fonctionnalisation par des biorécepteurs et des photosensibilisateurs pour le diagnostic et le traitement local de tumeurs précoces

---

Cette étude concerne le développement d'un dispositif innovant de type biocapteur, pour le diagnostic et le traitement local de cancers précoces. Cette technologie vise à diagnostiquer au plus tôt certains cancers, afin de les traiter de façon beaucoup plus efficace, en comparaison avec les techniques actuelles, souvent longues et mutilantes. Des microplots de silice mésoporeuse, fonctionnalisés azotures, sont déposés par impression jet d'encre (IJP) à la surface de fibres optiques. Le matériau présente une porosité auto-organisée, grâce au mécanisme d'auto-assemblage induit par évaporation (EISA). Par la suite, les microplots azotures sont fonctionnalisés spécifiquement par chimie *click* (*click chemistry*) par réaction avec des molécules alcynes. Dans le cas du diagnostic, cette fonctionnalisation permet le greffage de protéines et d'anticorps capables de reconnaître les marqueurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Les protéines et anticorps sont préalablement marqués par des fluorochromes, pour induire un transfert d'énergie (effet FRET ou *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) lors de la reconnaissance des marqueurs cancéreux. Le principe de détection du dispositif repose ainsi sur une modification de la signature de fluorescence. Dans le cas de la thérapie, des photosensibilisateurs (PS) sont greffés sur les microplots pour permettre un traitement local par photothérapie dynamique (PDT).

L'objectif global de l'étude vise à améliorer la sensibilité de détection du dispositif pour le diagnostic et à montrer l'efficacité de traitement dans le cas de la thérapie. Pour cela, les protocoles de réaction *click* et de greffage des protéines ont été optimisés et l'influence de la structuration de la porosité a été étudiée. Enfin, la sensibilité du dispositif a été caractérisée en fonction de plusieurs paramètres (type de matériaux, type de cellules cancéreuses, etc.).

---

Mots-clés : impression jet d'encre, EISA, chimie click, silice mésoporeuse, FRET, PDT

## Inkjet-printed mesoporous silica onto optical fibers surface and functionalization with biomolecules and photosensitizers for the diagnosis and local treatment of early tumors

---

This study focuses on the development of a new biosensor device for the diagnosis and local treatment of precocious tumors. This technology aims to diagnose cancers at an early stage to increase the treatment efficiency compared to existing techniques that are usually damaging. Mesoporous silica microdots with azide functions are deposited onto the surface of optical fibers using the inkjet-printing (IJP) process. The material shows a self-organized porosity, due to the evaporation-induced self-assembly (EISA) mechanism. Then, the azide microdots can be further functionalized specifically using click chemistry by reaction with alkyne precursors. For the diagnosis, the functionalization allows the grafting of proteins and antibodies capable of recognizing the increase in marker concentration at the surface of cancerous cells. These proteins and antibodies are labelled with fluorophores to induce a fluorescence energy transfer (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) with the recognition of tumorous markers. The detection principle is based on the modification change of the fluorescence signature. For the therapy, photosensitizers (PS) are anchored onto the microdots to allow the local treatment using photodynamic therapy (PDT).

The main aim of this study was to optimize the device sensitivity concerning the diagnosis step, and to show the treatment efficiency concerning the therapy step. On that purpose, the protocols of click reaction and the grafting of proteins have been optimized, which are also influenced by the porosity organization that has been studied. Finally, the device sensitivity has been characterized as a function of multiple factors (materials, cancer cells type, etc.).

---

Keywords: Inkjet-printing, EISA, click chemistry, mesoporous silica, FRET, PDT

