

N° d'ordre : 41359

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1
ECOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGENIEUR

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Formation IEEA, Spécialité Micro et Nanotechnologies

par

DE VILLE Magalie

Ingénieure ISEN

*Micro et nano structuration de matériaux :
Application aux laboratoires sur puce et à l'imagerie médicale*

Soutenance réalisée le 20 octobre 2014

Rapporteurs :	M. Eric Leclerc	Directeur de recherche CNRS, BMBI UMR 7338, Compiègne
	Mme Cécile Sicard-Roselli	Maître de Conférences, LCP UMR 8000, Université Paris Sud
Directeur de thèse :	M. Philippe Coquet	Professeur des universités, Université de Lille 1 IEMN, UMR CNRS 8520
Co-directeur :	M. Rabah Boukherroub	Directeur de recherche, Université de Lille 1 IRI, USR 3078
Examineurs :	Mme Laura Ravasi	MD, PhD, CHRU de Lille
	M. Philippe Pernod	Professeur à l'Ecole Centrale de Lille IEMN, UMR CNRS 8520
	Mme Muriel Barberi-Heyob	Professeur des universités, CRAN UMR 7039 CNRS, Nancy
	M. Max Langer	Chargé de Recherche CNRS Creatis, INSA, Lyon

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement d'un parcours d'études sinueux, ayant pour base les sciences industrielles, et notamment l'automatisme et l'électronique, deux disciplines que j'ai eu la chance d'étudier au sein de l'Institut Supérieur de l'Electronique et du Numérique de Lille où j'ai finalisé mon cursus d'ingénieur en octobre 2008.

C'est à l'ISEN que j'ai fait la connaissance de Mr Vincent Senez, professeur qui y enseignait alors l'option « Nanotechnologies pour les Sciences du Vivant ». Je le remercie chaleureusement de m'avoir accueilli au sein de son équipe Biomems à l'IEMN depuis février 2008, et de m'avoir donné l'opportunité de choisir mon projet de thèse, qui portait sur un domaine éloigné de mes compétences initiales.

Partant de cette base, je tiens par suite à remercier grandement mes directeurs, Mr Philippe Coquet (professeur de l'Université de Lille 1, IEMN, équipe Biomems) et Mr Rabah Boukherroub (Directeur de Recherche CNRS, IRI, équipe NanoBioInterfaces), qui ont encadré cette étude en deux temps, à la frontière de leurs deux équipes, et m'ont laissé une large autonomie dans l'organisation de mon projet.

Un immense merci à Mr Florent Auger et Mr Nicolas Durieux, ainsi qu'à Mme Laura Ravasi du CHRU de Lille, qui ont accepté une collaboration inédite, en me donnant l'accès à leur tout nouveau (2010) micro-scanner pour petits animaux, un équipement que nous avons appris à dompter ensemble.

Un grand merci également aux autres membres (passés ou non) des équipes pour leur aide, et les bons moments passés ensemble (Philippe, Damien, Simon, Lionel, Alexandre.....et tous les autres !), ainsi qu'à tous les membres des deux laboratoires pour leur accueil et leur soutien (Farah, Sylvie, Olivier, Ines,, tous les autres!, et également une pensée particulière pour ma chère Maryse). Ainsi qu'une mention spéciale pour la patience qu'a eue Christophe lors de nos longues séances de microscopie.

Enfin, j'exprime aussi toute ma reconnaissance à mes anciens professeurs et tuteurs de stages, grâce à qui j'ai pu construire ma scolarité, et par conséquent, ma carrière future.

Pour finir, je remercie mes parents pour leur patience et leur confiance durant toutes ces années, j'adresse de chaleureuses pensées à ma famille et mes amis proches, et je dédie cette thèse à Madeleine et François.

Résumé

La conception et la fabrication « à façon » de dispositifs microfluidiques requiert très souvent l'utilisation de multiples équipements coûteux en temps et en argent (lithographie notamment). Par ailleurs, l'achat auprès de fournisseurs industriels ne permet pas toujours l'obtention de structures pleinement adaptées aux besoins de l'utilisateur final, notamment dans le contexte médical, où un niveau minimal de biocompatibilité est souhaitable. La première partie de notre étude porte donc sur le développement d'une technique de création personnalisée, rapide et à moindre frais de réseaux microfluidiques à section circulaire, en polydiméthylsiloxane. Par suite, la thématique « Lab On Chip » est naturellement liée au développement de techniques de détection. L'imagerie médicale par agents de contraste est l'une de ces voies de détection. Les agents de contraste les plus utilisés sont les produits iodés, qui ne permettent pas toujours l'obtention d'un contraste optimal sur les clichés scanner. L'injection de ces produits peut engendrer de graves complications chez des patients potentiellement allergiques, d'autant plus qu'ils se dispersent dans la totalité de l'organisme. Ainsi le développement de nouveaux produits de contraste plus efficaces, et qui pourraient permettre un ciblage biologique plus localisé est un challenge d'actualité. Dans ce but, la synthèse de particules d'or de formes et de tailles variées a été réalisée. Ces particules ont été analysées par imagerie micro-scanner pour petit animal, afin d'optimiser d'une part les protocoles sur équipement réel, et d'autre part vérifier les possibilités de discrimination des différents types d'échantillons, ainsi que le bénéfice engendré comparativement à des échantillons d'agents de contraste iodés.

Mots clés : canaux microfluidique, section circulaire, polydiméthylsiloxane, particules d'or, agent de contraste, rayons X.

Laboratoires d'accueil :

- Institut d'Electronique de Microelectronique et de Nanotechnologie, U.M.R C.N.R.S 8520 – Laboratoire Central – Cité Scientifique – Avenue Poincaré - 59652 VILLENEUVE D'ASCQ
- Institut de Recherche Interdisciplinaire – Campus CNRS - Parc de la haute-borne – 50 avenue de Halley – 59658 Villeneuve d'Ascq Cédex

Abstract

Title: Micro and nano structuration of materials : Application to Lab-On-Chips and CT-scan Imaging

Conception and fabrication of microfluidic devices is frequently money and time consuming. Furthermore, sophisticated equipments and techniques are required (eg. lithography). Moreover, industrial manufacturers do not provide perfectly adapted devices. Their structures do not completely match with final needs of their users, especially in medicine context, where a minimal level of biocompatibility is desirable. The first part of this study is dedicated to the development of a customizable technique. This method will enable quick and low cost creation of microfluidic networks made of polydimethylsiloxane, with circular channel section. Then, this Lab-On-Chip thematic can be linked to the development of detection techniques. Medical imaging is one of those ways of detection. The most used contrast agents are the iodinated ones, but they do not always give a good enough contrast on the scanner images. Moreover, injection of those iodinated products can produce medical complications as a deadly allergy for some sensitive patients, as they disperse everywhere in the body. Thus, development of new and more efficient contrast agents, able to target more precisely specific zones in the human body is a challenge. To reach this aim, the synthesis of gold micro and nanoparticles with different sizes and shapes have been realised. These particles have been analyzed using a micro-scanner equipment. Those analyses have enabled on the one hand the protocols optimization onto real medical equipment, and on the other hand, they have permitted to verify the possibilities of discrimination of the samples between themselves and the benefit given by the gold particles onto the iodinated samples.

Key words : microfluidic channels, circular section, polydimethylsiloxane, gold particles, contrast agent, X rays.

Table des matières

Remerciements.....	2
Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Introduction Générale.....	9
Chapitre 1 : Fabrication de canaux microfluidiques à section arrondie, en PolyDiMethylSiloxane, par optimisation des paramètres de mouillage de surfaces.....	12
Introduction.....	13
Partie A : Conception traditionnelle de laboratoires sur puce – Etat de l’art.....	16
I) Techniques de fabrication de dispositifs silicium/verre.....	16
1) Lithographie	16
2) Gravure	18
II) Techniques de fabrication de dispositifs plastiques.....	23
1) Plastiques durs, résines epoxy.....	23
2) Polymères souples, cas du PolyDiMethylSiloxane (PDMS).....	25
Partie B : Conception atypique de Labs On Chip à partir de matières liquides.....	29
I) Matériaux disponibles.....	29
1) PDMS.....	29
2) Solides à température de fusion contrôlée	30
3) Alginate de sodium.....	31
II) Comportement de rivulets sur surfaces texturées.....	33
1) Définitions	33

2)	Comportement des liquides sur surfaces planes texturées – Etat de l’art.....	35
3)	Comportement des liquides sur des surfaces non planes – Etat de l’art.....	37
III)	Etude menée.....	39
1)	Stratégie adoptée après analyse des techniques et des matériaux à notre disposition	39
2)	Expérimentation	40
a)	Canaux créés à partir de filaments solides d’alginate.....	40
b)	Canaux créés sur surfaces planes texturées.....	41
c)	Canaux créés sur surfaces non planes.....	49
	Conclusion	56
	Chapitre 2 : Imagerie médicale par rayons X et particules d’or	69
	Introduction.....	70
I)	Histoire de l’iode, de la découverte des rayons X et de l’imagerie médicale, problématique associée	71
II)	Contexte actuel en imagerie médicale.....	72
III)	Rayons X et équipements d’imagerie moderne.....	73
IV)	Digression concernant l’imagerie par Résonance Magnétique.....	86
V)	Comment choisir un élément afin de synthétiser un agent de contraste efficace en imagerie par rayons X ?	88
	Chapitre 3 : Synthèse de particules d’or pour l’imagerie par rayons X.....	93
	Introduction.....	94
I)	Cheminement de réflexion, approche de la problématique.....	95
II)	Etude menée.....	99
1)	Notre démarche	99

2) Fabrication de microparticules d'or pour l'imagerie médicale – Etat de l'art	102
3) Synthèses de nanoparticules d'or pour l'imagerie médicale – Etat de l'art	102
a) Exemples de synthèses existantes dans la littérature	104
b) Caractérisation par spectroscopie UV-VIS.....	104
c) Rôle du composé chimique H _{Au} Cl ₄	112
d) Rôle des agents stabilisants	113
e) purification et fonctionnalisation des échantillons:	117
4) Fabrication de microparticules d'or par approche Top-Down pour l'imagerie médicale - Résultats.....	121
5) Synthèses de nanoparticules d'or pour l'imagerie médicale - Résultats	124
a) Synthèses initiales de particules d'or, problèmes rencontrés.....	124
b) La couleur, premier indicateur de réussite d'une synthèse	135
c) Caractérisation morphologique par Microscope Electronique à Balayage.....	136
d) Synthèses de particules d'or réaménagées et optimisées selon nos paramètres personnels	136
e) Détermination de la concentration par Spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES).....	171
f) Méthodes employées pour la concentration des particules	174
g) Fonctionnalisation générale des échantillons	178
h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA)	179
6) Résultats au μ CT/ μ PET-scanner Inveon Siemens.....	183
Chapitre 4 : Synthèse de capsules lipidiques pour l'imagerie par rayons X.....	194
Introduction	195
I) Etat de l'art.....	195

1) Particules lipidiques iodées	195
2) Particules lipidiques contenant des particules d'or	197
II) Synthèses de capsules lipidiques pour l'imagerie médicale –Résultats.....	198
1) Capsules iodées	198
a) Capsules avec Iode inclus dans la bicouche lipidique	198
b) Fabrication de capsules avec composé encapsulé par émulsification par cycles en température.....	199
2) Capsules fluorées contenant des particules d'or.....	201
a) Emulsification par bain à ultrasons :.....	202
b) Emulsification par cycles en température :.....	203
III) Résultats au μ CT/ μ PET-scanner Inveon Siemens.....	203
Conclusion aux chapitres 2,3 et 4	208
Conclusion Générale.....	209
Annexes.....	212
Bibliographie	266

Introduction Générale

Les premières études concernant la miniaturisation de dispositifs d'analyse remontent à la fin des années 1970, lorsque Terry *et al.* imaginent un système miniaturisé d'analyse de gaz par chromatographie sur substrat de silicium¹. Les microTAS (micro Total Analysis Systems) sont en train de voir le jour.

Cette notion, encore restreinte au champ des analyses chimiques, est formulée par Manz *et al.* au début des années 1990 et sera ensuite élargie *via* le concept de « Lab-on-a-chip » (LOC, laboratoires sur puce), qui sont utilisables tant en biologie qu'en fluidique.

Suite à ces débuts, la notion d'« analyse des phénomènes » se déroulant au sein de ces dispositifs a créé un besoin simple: les dispositifs se doivent d'être transparents, afin que, par exemple, les changements de couleur lors de réactions chimiques puissent être visualisés. Le champ des matériaux utilisables se trouve alors rapidement restreint.

Le verre, le quartz et les plastiques durs (type polypropylène par exemple), combinés ou non à un substrat de silicium, sont à l'heure actuelle les supports les plus utilisés dans l'industrie pour la fabrication des dispositifs LOC. Cependant ces matières ont à la fois un coût de production et de recyclage non négligeable, et peuvent présenter des risques pour les usagers (coupures potentielles en cas de bris de verre...).

Elles sont également rigides, parfois difficilement façonnables et peu compatibles avec les milieux biologiques (non porosité aux gaz, hydrophobicité des plastiques).

Un besoin de flexibilité, de légèreté et de biocompatibilité, combiné à une production rapide à bas prix avec recyclage facile s'avère de plus en plus présent, surtout dans le domaine de la biologie où les notions de rapidité d'analyse et d'« usage unique » sont capitales.

Par ailleurs, un autre type de besoin existe au sein des laboratoires scientifiques à spécialités non médicales. Ces laboratoires peuvent être amenés à travailler sur des sujets nécessitant des cultures cellulaires voire même une procédure de tests sur animaux.

Cependant les coûts induits par de tels projets (nombre de séances d'expérimentation, prix, accès, « maintien » et manipulation des cobayes...) peuvent être un frein aux expérimentations. La mise à disposition pour ces chercheurs de substrats d'expérimentation substitutifs à l'animal est donc un enjeu important et de grand intérêt.

Ainsi, la première partie de cette thèse a consisté à développer une technique de moulage de canaux à section arrondie dans un matériau fréquemment utilisé pour la fabrication de LOC : le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS). Ce polymère, poreux aux gaz (et donc à l'oxygène), biocompatible, peut servir à développer des réseaux de canaux dans une optique de mimétisme avec les systèmes biologiques les plus usuels (système veineux, système pulmonaire...).

De même, les normes pour la mise en œuvre de salles de culture cellulaire de catégorie L2 sont strictes et les autorisations d'expérimenter sur le vivant sont difficiles à obtenir².

Il en résulte que la création de partenariats avec des équipes médicales est souvent quasi-indispensable, afin de pouvoir tester rapidement et à moindre frais les solutions thérapeutiques développées, mais aussi acquérir et développer de nouveaux savoir-faire et de nouvelles compétences, ce qui est essentiel à l'extension des activités d'un institut de recherche.

Dans cette optique l'IEMN a pour objectif principal d'associer des chercheurs ayant des cultures, des démarches et des motivations différentes au sein d'un même laboratoire dont le cœur de métier est centré depuis 20 ans sur les micro- et nanotechnologies et leurs applications dans les domaines de l'information, la communication, les transports et, plus récemment, la santé.

Créée en 2007, l'équipe bioMEMS développe principalement des technologies microfluidiques, et étend également ses recherches vers des sujets aux interfaces. La mise au point d'agents de contraste pour l'imagerie médicale (rayons X) en est un exemple. L'équipe NanoBioInterfaces de l'IRI concentre ses efforts sur la synthèse et la fonctionnalisation de nanostructures pour l'imagerie cellulaire et des applications biocapteurs et en nano-médecine.

De ce fait, la seconde partie de cette thèse relate le déroulement d'une étude qui a porté sur la fabrication de particules d'or et leur caractérisation sur un équipement de diagnostic pour petits animaux : un CT/PET scanner Inveon « petit animal » du fabricant Siemens. L'enjeu est d'étudier la capacité des micro et nanoparticules d'or à se substituer aux composés iodés traditionnellement utilisés comme agent de contraste en imagerie scanner.

Partant de ces constats, nous allons dresser au fil de ces pages un panorama des techniques de structuration existantes pour les dispositifs miniaturisés (chapitre 1, partie A). Nous présenterons ensuite (chapitre 1, partie B) la méthode originale développée dans le cadre de cette thèse pour la réalisation de micro-canaux à section circulaire, à partir de matériaux sous forme liquide. Le principe consiste à optimiser les paramètres de mouillabilité d'une surface pour créer un gradient hydrophile/hydrophobe combinée à l'utilisation d'alginate de sodium. Nous nous

intéresserons ainsi à la conception de dispositifs à partir de matériaux sous forme liquide du point de vue théorique, puis de manière pratique, avec la présentation des résultats obtenus et des applications potentielles qui en résultent.

Dans un second temps (chapitre 2), nous verrons comment choisir efficacement les éléments constituant les agents de contraste, en fonction des phénomènes physiques résultant de l'interaction des rayons X avec la matière (notamment l'effet « k-edge »). Nous détaillerons également dans ce second chapitre les paramètres cruciaux permettant une utilisation optimale de l'équipement μ -scanner auquel nous avons eu accès (équipement nouvellement implanté (2009) sur le site du Pôle Recherche de l'Université de Lille 2).

Dans une troisième partie, nous détaillerons les méthodes existantes permettant de synthétiser des particules d'or (chapitre 3, partie I et partie II points 1 à 4), ainsi que les synthèses que nous avons mis au point, ainsi que leurs résultats (chapitre 3 partie II points 5 à 7).

Puis, le chapitre 4 présentera nos synthèses de nanocapsules lipidiques contenant soit un composé iodé hydrophobe (triiodobenzène), soit des particules d'or, ainsi que les résultats obtenus après passage au μ -scanner.

Les constatations, ainsi que les expérimentations menées au cours des chapitres 2 à 4 nous permettront de discuter nos résultats obtenus comparativement à ceux publiés dans la littérature et notamment par rapport à l'agent de contraste de référence traditionnellement choisi (Omnipaque).

Enfin, nous tirerons toutes les conclusions de cette étude, afin d'élaborer des perspectives et stratégies pour des recherches futures.

Chapitre 1 : Fabrication de canaux microfluidiques à
section arrondie, en PolyDiMethylSiloxane, par
optimisation des paramètres de mouillage de
surfaces

Introduction

La conception de dispositifs LOC a pour objectif d'aboutir à la fabrication de systèmes compacts, modulables et combinables. Cet idéal est attractif car économique à toute échelle (taille, temps, coûts...). En effet, ces systèmes nécessitent peu d'apports extérieurs, qu'il s'agisse d'énergie d'alimentation ou de la quantité de matière à analyser et de réactifs à employer. Ils sont par ailleurs très efficaces en termes de précision et de sécurité sanitaire.

Actuellement, la plupart des dispositifs commercialisés possèdent des canaux microfluidiques dont la géométrie de section est soit carrée, soit rectangulaire, comme nous le verrons par la suite. Néanmoins, le design de LOC dont l'architecture ressemble aux structures biologiques réelles peut faciliter l'étude scientifique des phénomènes qui s'y déroulent, puisqu'il en résulte une diminution du nombre de biais que peut contenir l'étude. De même, les phénomènes physiques, biologiques et les intuitions naturelles concernant le mode de fonctionnement de ces systèmes concordent.

Afin d'appuyer cette idée, le calcul des pressions existant dans des canaux démontre qu'il est nécessaire d'appliquer des forces beaucoup plus importantes pour des sections polygonales et elliptiques, tandis qu'une section circulaire minimise ces forces. Il est plus facile de trouver une solution exacte au problème du flot de Poiseuille avec un canal à section circulaire plutôt qu'à section rectangulaire ou elliptique³. Il existe également une résistance hydraulique deux fois plus faible dans un canal à section circulaire comparativement à un canal à section rectangulaire, comme le montrent les formules appliquées dans le tableau Fig 1-1⁴. Il est donc logique que la conception de réseaux fluidiques s'inspire de l'organisation en canaux à section ronde, ramifiés et à diamètres évolutifs du système veineux des organismes vivants.

shape		R_{hyd} expression	R_{hyd} [10 ¹¹ $\frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$]
circle		$\frac{8}{\pi} \eta L \frac{1}{a^4}$	0.25
ellipse		$\frac{4}{\pi} \eta L \frac{1 + (b/a)^2}{(b/a)^3} \frac{1}{a^4}$	3.93
triangle		$\frac{320}{\sqrt{3}} \eta L \frac{1}{a^4}$	18.48
two plates		$12 \eta L \frac{1}{h^3 w}$	0.40
rectangle		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3 w}$	0.51
square		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.917 \times 0.63} \frac{1}{h^4}$	2.84

Fig 1-1 : Résultats de calcul des résistances hydrauliques selon la géométrie de section d'un canal ($\eta = 1 \text{ mPas}$ (eau), $L = 1 \text{ mm}$, $a = 100 \mu\text{m}$, $b = 33 \mu\text{m}$, $h = 100 \mu\text{m}$, and $w = 300 \mu\text{m}$)⁴.

De même, utiliser des canaux circulaires permet de limiter le stress cellulaire. Ainsi, en 2008, M. Rumpler *et al.*⁵ ont démontré que les cellules cultivées dans des canaux de formes complexes (illustrés Fig 1-2) ont pour comportement premier de structurer leur tapis de croissance de manière à retrouver une géométrie circulaire naturelle.

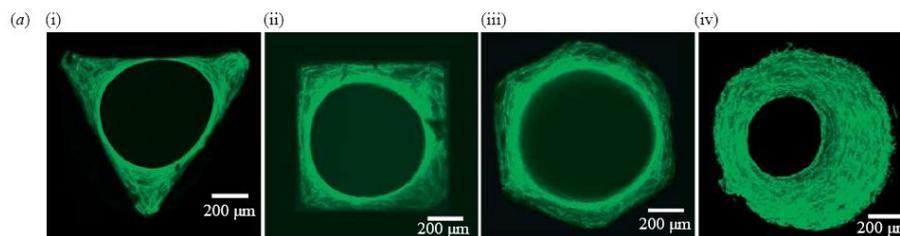


Fig 1-2 : Culture de cellules dans des canaux à profils variés⁵.

Une fois ces constats effectués, il ne faut pas oublier que biomimétique ne signifie pas nécessairement biocompatible. Cet aspect du développement d'un dispositif biologique doit lui aussi être considéré.....

On dit d'un biomatériau qu'il est *biocompatible* lorsqu'il est capable de remplir sa fonction sans effets adverses sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner⁶.

Les biomatériaux regroupent aussi bien des matériaux synthétiques, métalliques, céramiques ou des polymères (artificiels, ou naturels comme le collagène ou l'alginate).

De manière plus spécifique, M.Vert donne la définition suivante : « un polymère biocompatible se définit comme un système compatible avec les systèmes vivants »⁷

De plus, il est important que la propriété de biocompatibilité d'un produit fini ne soit pas limitée à la biocompatibilité du (ou des) matériau(x) parent(s). Les potentiels produits de dégradation dans le temps (dûs par exemple aux agressions par les fluides qui baignent le dispositif) doivent aussi être évalués et pris en compte.

Partant de ces constats, il est possible de considérer les différentes stratégies de conception de LOC existantes: tout d'abord les techniques traditionnelles (**partie A, I**), mettant en jeu des principes et des matériaux issus de la microélectronique (lithographie, gravure, substrats de silicium, verre...), puis par la suite, des techniques alternatives (**partie A, II**), plus simples, plus rapides, et moins coûteuses dans leur mise en œuvre. Enfin, il existe une piste peu exploitée dans les applications pratiques, mais décrite de façon théorique: il s'agit du comportement de rivulets liquides sur surfaces texturées (**partie B**).

Une question peut alors être soulevée : parmi ces méthodes, lesquelles pouvons nous sélectionner/combiner afin de produire un réseau simple de canaux microfluidiques à section arrondie ? Afin de répondre à cette question, il nous faut tout d'abord définir les objectifs que nous souhaitons atteindre :

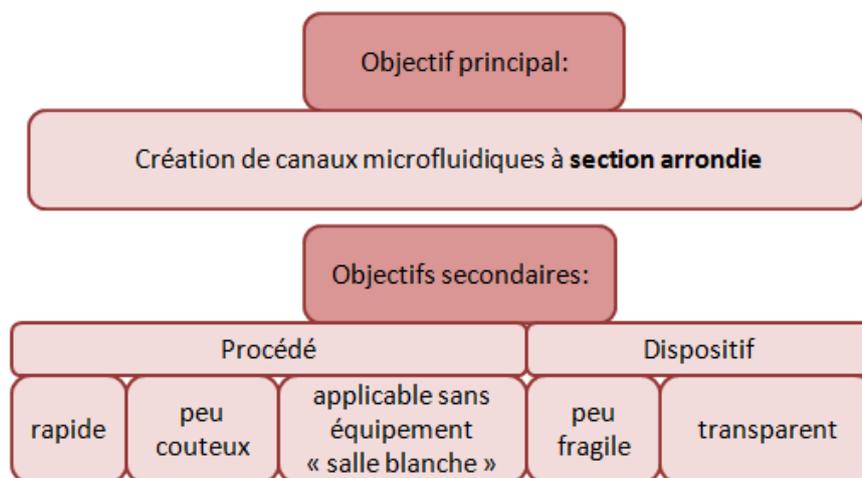


Fig 1-3 : Objectifs de l'étude.

Partie A : Conception traditionnelle de laboratoires sur puce - Etat de l'art

1) Techniques de fabrication de dispositifs silicium/verre

1) Lithographie

La structuration d'un matériau selon un design prédéfini n'est possible que s'il existe un transfert des motifs d'un masque (plaque de quartz partiellement recouverte de chrome) à la surface du substrat. Le principe est similaire à celui du pochoir.

A cette fin le support doit être recouvert d'une fine couche homogène de résine photosensible, par spin-coating. L'étape suivante consiste à exposer l'ensemble à un faisceau énergétique (souvent un rayonnement UV), qui traverse alors le masque aux emplacements où le quartz n'est pas recouvert de chrome. La résine subit une réaction photochimique suite à cette insolation, et peut ensuite être « développée ». Sa fonction est alors de protéger certaines zones du substrat, tout en laissant l'accès à d'autres portions du matériau de base. Le processus est illustré dans la figure 1-4 ci-dessous :

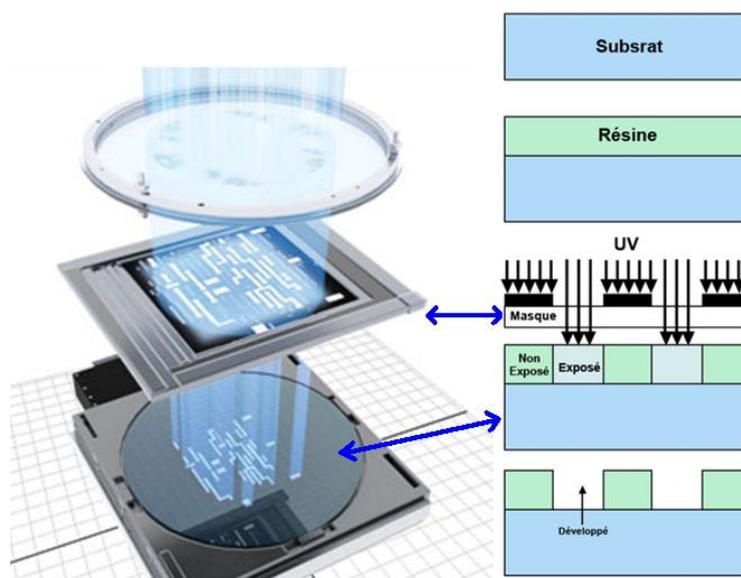


Fig 1-4 : Illustration du principe de la lithographie.

On utilise deux types de résines en fonction du résultat attendu:

- résine « positive » : l'étape de développement conduit à l'élimination de la résine insolée au travers du masque (par exemple : résine polyméthylmétacrylate = PMMA);

- résine « négative » : l'étape de développement conduit à l'élimination de la résine non insolée (par exemple : résine SU8).

Les inconvénients majeurs de cette technique de création de motifs sont:

- Le coût (substrat + résine + équipement de lithographie)
- La nécessité d'un système d'alignement afin d'assurer une cohérence entre les niveaux de matériaux si de multiples couches ont été successivement superposées.

Il est certain que la lithographie de résine est un processus lourd. Toutefois celui-ci peut être affiné en faisant le choix d'une résine dont les caractéristiques chimiques permettent une refonte ultérieure après révélation (résine JSR THB-120N). Il est alors possible d'obtenir des motifs arrondis. Cette technique a été utilisée par G.J. Wang *et al.* en 2007(Fig 1-5)⁸.

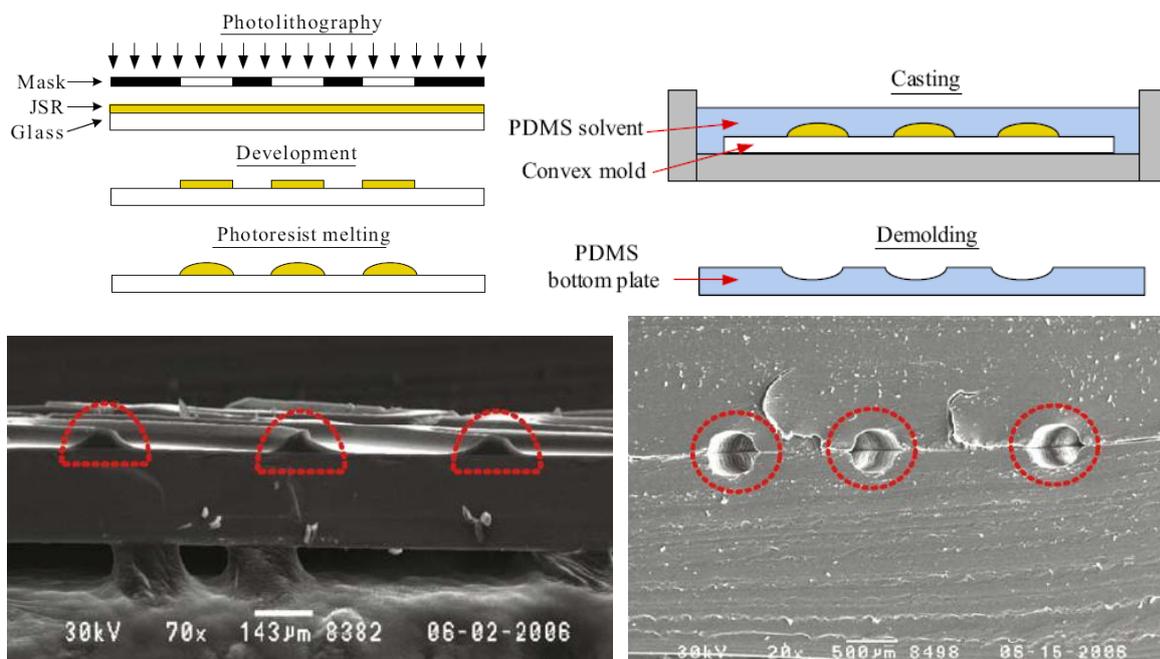


Fig 1-5 : Profil de résine et canaux⁸.

L'empilement de couches peut être employé afin de créer une notion de 3D. Cette approche a été menée en 2008 par K.S. Yun *et al.*(figure 1-6)⁹, qui ont utilisé une combinaison de deux résines et de trois étapes de lithographie afin de mouler des canaux de PDMS sur plusieurs niveaux. Néanmoins ces canaux avaient une section rectangulaire.

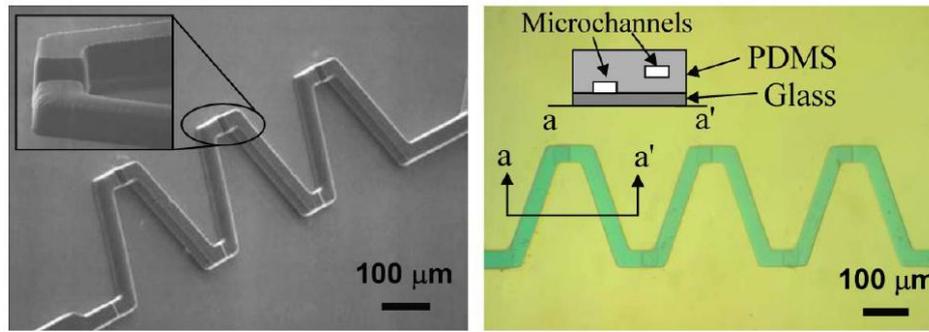


Fig 1-6 : Profil de résine et canaux obtenus⁹.

Plus classiquement, l'étape de lithographie de résine pour la mise en forme de canaux microfluidiques est suivie par une gravure du substrat initial.

2) Gravure

La connaissance des propriétés cristallines du matériau de base est indispensable pour choisir le type de gravure souhaité.

Le verre est un matériau amorphe, tandis que le quartz est un matériau cristallin. Ce sont tous deux des oxydes de silicium (SiO_2). Les plaquettes industrielles de silicium pur (wafers), quant à elles, sont des empilements cristallins, dont l'orientation dépend du plan de coupe choisi, comme le montre la figure 1-7 ci après :

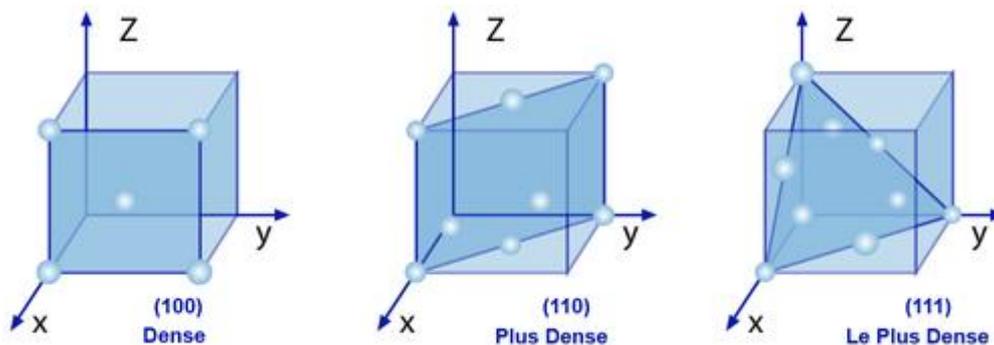


Fig 1-7 : Plans cristallins du silicium.

Ainsi il est possible de graver les wafers de silicium de manière isotrope pour obtenir des motifs arrondis, ou de manière anisotrope pour obtenir des formes triangulaires, trapézoïdales ou carrées. Le processus de gravure peut se dérouler selon les besoins en milieu humide (voie chimique) ou en milieu sec (voie physique).

La gravure humide peut agir de manière isotrope, il s'agit alors de choisir un mélange de produits qui attaqueront spécifiquement le substrat et non la résine qui le protège encore partiellement suite à l'étape lithographie/développement.

Il est par exemple possible d'utiliser un mélange « HNA » pour graver les wafers. L'acide fluorhydrique (HF) associé à l'acide nitrique (HNO_3) et à l'acide éthanoïque (CH_3COOH) agissent selon l'équation suivante:



On peut également choisir un processus cyclique, par oxydation du silicium à l'acide nitrique puis dissolution de l'oxyde formé par l'acide fluorhydrique (HF). Cette attaque au HF a une vitesse qui ne dépend pas de la direction des plans du silicium, et peut donc aussi être utilisée pour graver des substrats de verre ou de quartz.

En 2006 X. Qu *et al.*¹⁰ utilisèrent ces propriétés de gravure du verre, afin de fabriquer des moules en verre concaves à répliquer dans du PDMS (figure 1-8). La première réplcation donnait naissance à un premier moule convexe en PDMS, puis ce moule de PDMS était lui-même répliqué pour obtenir des motifs concaves. Toutefois, les canaux obtenus, bien que profonds, avaient un profil de section à fond plat.

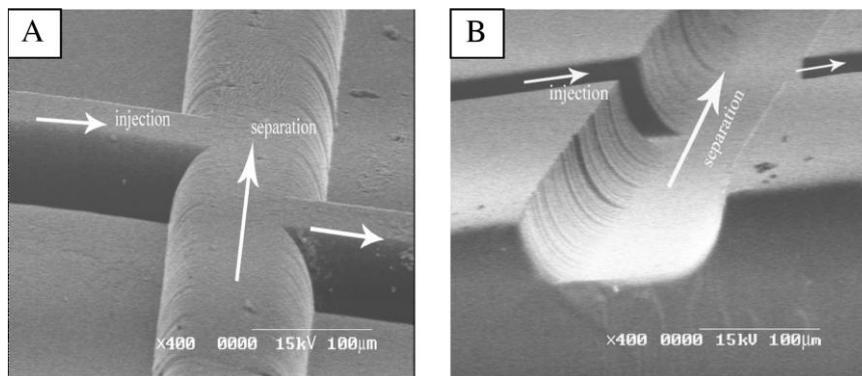


Fig 1-8 : Moule en PDMS convexe à gauche et canal en PDMS concave à droite¹⁰.

Contrairement aux procédés de gravure humide isotropes, les gravures humides anisotropes permettent de contrôler précisément les dimensions des structures réalisées car la vitesse d'attaque dépend de l'orientation cristalline du matériau.

Les réactions de gravure peuvent être réalisées en utilisant des solutions aqueuses d'hydroxyde de potassium (KOH), mais d'autres composé chimiques peuvent également être utilisés (ex : TMAH).

Dans le cas des gravures par KOH, celles-ci attaquent préférentiellement les plans $\langle 100 \rangle$ du silicium par rapport aux plans $\langle 111 \rangle$ (la vitesse d'attaque des plans (100) est de l'ordre de 100 fois la vitesse d'attaque des plans (111)). L'effet d'anisotropie est dû au fait que la vitesse de gravure dépend de la densité surfacique d'atomes et du nombre de liaisons Si-Si exposées à la solution¹¹. Les autres paramètres en jeu pour le contrôle des structures étant: la concentration en KOH ainsi que la température de la solution. Un exemple de procédé de gravure est donné en figure 1-9. Par ailleurs, selon le type de cristallinité du substrat employé on peut obtenir diverses formes de gravures (figure 1-10).

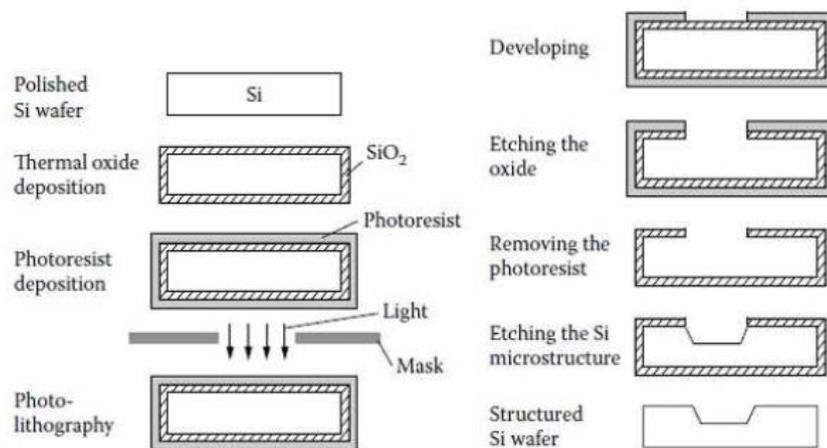


Fig 1-9 : Procédé complet menant à la gravure d'un substrat de silicium¹¹.

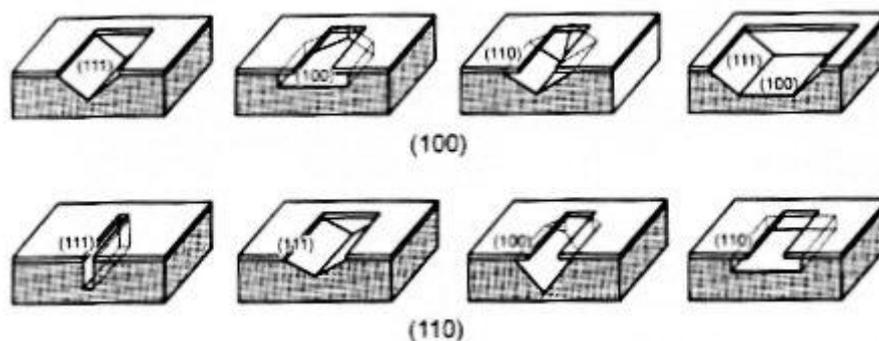


Fig 1-10 : Gravure anisotrope humide du silicium selon le profil cristallin choisi¹¹.

La technique de gravure humide, isotrope ou anisotrope présente l'avantage de nécessiter peu d'équipements, une simple paillasse de chimie suffit. Seulement, des phénomènes de sous-gravure peuvent apparaître. Enfin, il faut sélectionner avec attention les couches successives de

matériaux et de résines que l'on doit empiler, lithographier, révéler et graver, afin de choisir les mélanges d'attaque sélectifs qui leur correspondent.

Afin de résoudre les problèmes liés à la gravure humide présentés ci-dessus, des procédés d'attaque par voie sèche ont été développés (figure 1A-8).

Il est par exemple possible de faire réagir des gaz fluorures (XeF_2 , $\text{BrF}_3 + \text{ClF}_3 \dots$) avec le substrat de silicium afin de former du tétrafluorure de silicium gazeux. On parle alors de gravure sèche sans plasma. Les paramètres de contrôle sont la température et la pression des gaz réactifs.

Les gravures sèches avec plasma impliquent quant à elles des plasmas radiofréquence qui gravent le silicium au moyen d'ions et d'atomes soit réactifs (gravure chimique) soit non-réactifs (gravure physique). La technique DRIE (Deep Reactive Ion Etching) présentée ci-après combine quant à elle ces deux procédés.

technique	descriptif	mécanisme	pression (torr)	sélectivité	profil
PE <i>Plasma Etching</i>	gravure plasma spontanée	chimique	$10^{-1} - 10^1$	élevée	isotrope ou anisotrope
IBE <i>Ion Beam Etching</i>	faisceau d'ions Inertes (Ar^+)	physique	10^{-4}	faible	anisotrope
RIE <i>Reactive Ion Etching</i>	plasma de gaz réactifs	physique & chimique	$10^{-2} - 10^{-1}$	élevée	isotrope ou anisotrope
RIBE <i>Reactive Ion Beam Etching</i>	faisceau d'ions réactifs (F^+ , Cl^+)	physique & chimique	10^{-4}	élevée	anisotrope
CAIBE <i>Chemically assisted Ion Beam Etching</i>	faisceau d'ions inertes + gaz réactifs	physique & chimique	10^{-4}	élevée	anisotrope

Fig 1-11 : Récapitulatif des différentes techniques de gravure sèche.

La technique RIE (procédé Bosch, illustré en figure 1-12) alterne des étapes de gravure et de passivation. La gravure anisotrope du silicium s'effectue par utilisation d'un plasma SF_6 formant des radicaux fluorés. Ces derniers réagissent avec le silicium pour créer des espèces volatiles SiF_4 . La réaction du fluor avec le silicium est la suivante :



S'en suit une étape de dépôt d'un polymère de passivation de formule générale C_xF_y (C_4F_8 , C_2F_6 , CF_4 ou CHF_3), toujours par plasma. Le dépôt se révèle être plus épais sur les côtés du motif gravé que sur le fond, ce qui permet, lors de la répétition de l'étape de gravure, d'obtenir un motif profondément anisotrope.

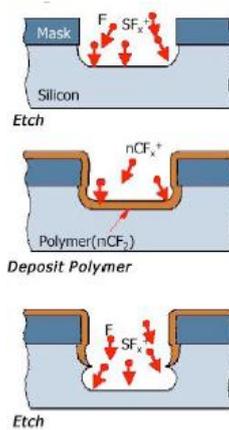


Fig 1-12 : Procédé de gravure anisotrope sèche du silicium par DRIE.

Un exemple d'utilisation de la gravure par DRIE du silicium a été décrit par l'équipe de U.B.T. Giang *et al.* en 2007 (figure 1-13)¹². Cette technique a permis de créer des cavités arrondies dans du PDMS par application d'une différence de pression.

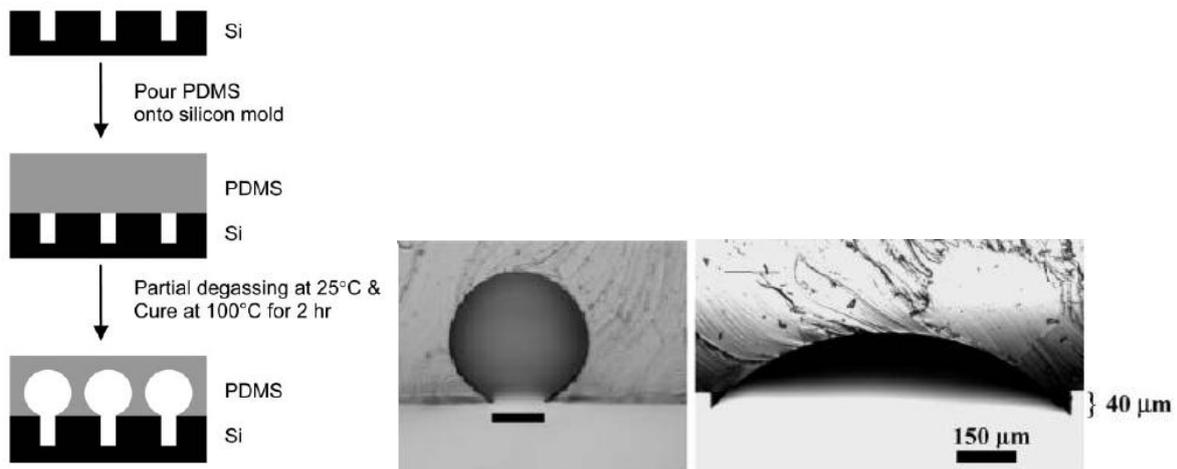


Fig 1-13 : Procédé de fabrication et lentilles obtenues par dégazage du PDMS¹².

Les exemples donnés jusqu'à présent sont tous issus de laboratoires de recherche, mais les techniques de gravure du verre et du quartz sont aussi utilisées depuis quelques années en milieu industriel, afin de proposer des LOC aux formes variées, mais dont les sections de canaux restent rectangulaires, ce qui s'avère peu biomimétique. Ci-dessous en figure 1-14, des exemples de dispositifs produits par la société néerlandaise Micronit Microfluidics.

Description	Number of Chips	Channel Depth	Channel Width	Fabrication Technique	Internal Volume	Additional information	Price
Droplet Generators							
T-shaped (10 - 100 μm Oil-in-Water droplets)	2	20 μm	100 μm	Wet-etched	0.2 μl		€ 330
T-shaped (10 - 100 μm Water-in-Oil droplets)	2	20 μm	100 μm	Wet-etched	0.2 μl	Hydrophobic Coated	€ 530
Focussed Flow (10 - 100 μm Oil-in-Water droplets)	2	20 μm	100 μm	Wet-etched	0.2 μl		€ 330
Focussed Flow (10 - 100 μm Water-in-Oil droplets)	2	20 μm	100 μm	Wet-etched	0.2 μl	Hydrophobic Coated	€ 530
Focussed Flow (100 - 500 μm Oil-in-Water droplets)	2	100 μm	500 μm	Wet-etched	5 μl		€ 330
Focussed Flow (100 - 500 μm Oil-in-Water droplets)	2	100 μm	500 μm	Wet-etched	5 μl	Hydrophobic Coated	€ 530
Microreactor Chips							
Microreactors (6 microliter)	3	150 μm	150 μm	Powderblasted	6 μl		€ 175
Microreactors (13 microliter)	3	150 μm	150 μm	Powderblasted	13 μl		€ 175
Microreactors	3	20 μm	150 μm	Wet-etched	0.3 μl		€ 225
Microreactors (thin bottom)	3	20 μm	150 μm	Wet-etched	0.3 μl	Thin Bottom (145 μm)	€ 280

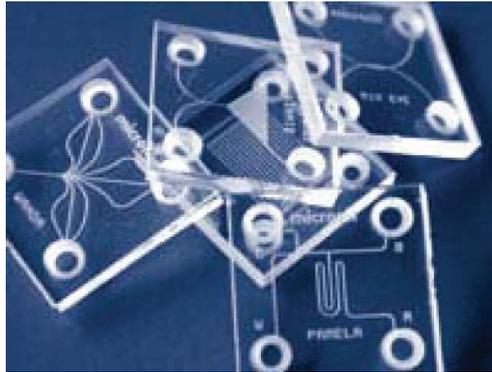


Fig 1-14 : Caractéristiques et exemple de dispositifs microfluidiques actuellement sur le marché.

Conclusion : Bien que le silicium et le verre puissent être structurés de manière curviligne, les techniques à employer pour y parvenir n'en demeurent pas moins chronophages, peu accessibles au plus grand nombre (équipement de lithographie), et pouvant être dangereuses et polluantes (acides, résines...).

II) Techniques de fabrication de dispositifs plastiques

1) Plastiques durs, résines epoxy

Les plastiques durs (polypropylène, PMMA, copolymère d'oléfine cyclique...) sont des matériaux intéressants à l'heure actuelle, de par leur faible coût, pour la création de LOC du fait des méthodes de moulage qui peuvent leur être appliqués (injection et hot-embossing notamment^{13,14,15,16}). La production de canaux microfluidiques atteint des dimensions de sections attrayantes, de 50 à plusieurs centaines de microns. Ils n'apportent cependant pas la flexibilité ou la biocompatibilité que l'on peut souhaiter, puisque les échanges gazeux ne peuvent s'y effectuer (non poreux). Leurs avantages majeurs sont la résistance aux chocs et aux bris ainsi que la

légèreté. Des exemples de dispositifs produits par la société allemande Microfluidic ChipShop sont présentés ci-dessous en figures 1-15 et 1-16.

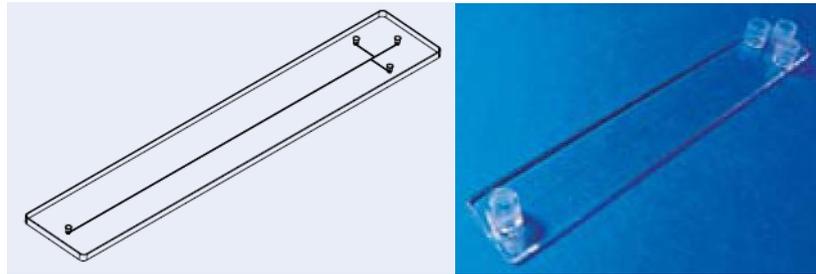


Fig 1-15 : Exemple de dispositif en PMMA.

Channel			Mate- rial	Price [€/chip]			
Width	Depth	Length		1+	10+	100+	1000+
[μm]	[μm]	[mm]					
50	50	87.0	PMMA	42.35	31.19	25.18	9.98
50	50	87.0	Topas	42.35	31.19	25.18	9.98
50	50	87.0	PMMA	42.35	31.19	25.18	9.98
50	50	87.0	Topas	42.35	31.19	25.18	9.98
75	75	87.0	PMMA	42.35	31.19	25.18	9.98
75	75	87.0	Topas	42.35	31.19	25.18	9.98
100	100	87.0	PMMA	42.35	31.19	25.18	9.98
100	100	87.0	Topas	42.35	31.19	25.18	9.98

Fig 1-16 : Taille, matériaux employés (TOPAS® : copolymère d'oléfine cyclique) et coût de dispositifs microfluidiques.

L'utilisation de l'abrasion laser a aussi été réalisée en 2007 par L.W.Luo *et al.*(figure 1-17)¹⁷, dans un polymère usuel, le PMMA. Les canaux obtenus avaient une largeur de 900 μm .

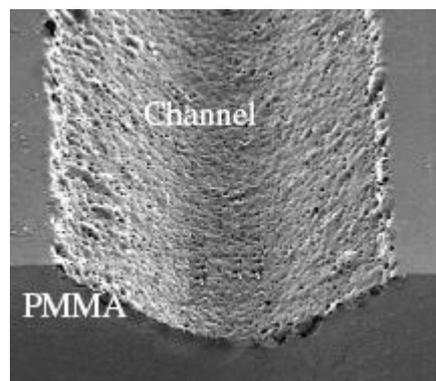


Fig 1-17 : Semi-canal en PMMA obtenu par ablation laser¹⁷.

2) Polymères souples, cas du PolyDiMethylSiloxane (PDMS)

Les dispositifs à base de polymère souple sont peu nombreux sur le marché, et sont fréquemment fabriqués à partir de PolyDiMéthylSiloxane (PDMS). Ils ont eux aussi des canaux à section rectangulaire, et les prix, bien que moins élevés que pour les LOC en verre, restent élevés comparativement à celui de la matière première (une soixantaine d'euros le litre environ selon les fabricants). Ci-dessous (figure 1-18), d'autres exemples de dispositifs produits par Microfluidic ChipShop.



Description	Channel Design, Depth [μm]	Price [€/chip]		
		1+	5+	10+
PDMS-CP/22x22/S-100	S-shape, 100 μm deep	150.00	135.00	125.00
PDMS-CP/22x22/2Y-50	Double-Y-shape, 50 μm deep	150.00	135.00	125.00
PDMS-CP/25x75/Cross-50	Cross shape, 50 μm deep	260.00	235.00	215.00
MicCell support 22x22	to fix a PDMS-CP	780.00	699.00	650.00
MicCell support 25x75	to fix a PDMS-CP	780.00	699.00	650.00

Fig 1-18 : Exemple de dispositifs en PDMS (extrait du catalogue en ligne de la société Microfluidic ChipShop).

Le PDMS, dont la formule est présentée en figure 1-19, est un matériau aux caractéristiques techniques remarquables. C'est un polymère fréquemment utilisé en laboratoire de recherche lors de la fabrication de Lab On Chip du fait de sa flexibilité, de sa transparence, et de sa perméabilité aux gaz. C'est un matériau de moulage très apprécié, puisqu'il possède une « résolution » (capacité à pénétrer dans les rugosités) de l'ordre de la dizaine de nanomètre¹⁸.

La réticulation sous forme solide du PDMS provient du mélange de deux parties liquides: l'une contient des liaisons Si-vinyl (base), tandis que l'autre possède des liaisons Si-H (agent curant). La réaction chimique est donnée en figure 1-20. Un catalyseur est aussi parfois présent, à base de sels de platine par exemple. Le produit commercial Sylgard 184 de Dow Corning en est un exemple¹⁹. Ses propriétés sont présentées en figure 1-21. Lors du mélange des deux composantes visqueuses qui donneront le futur PDMS, une quantité non négligeable de bulles d'air vient s'emprisonner dans la masse. Cet inconvénient est résolu par l'utilisation d'une cloche à vide qui permet de dégazer le polymère. Le ratio usuellement utilisé entre les deux parties est de (1:10) en masse pour le couple (agent curant : base) du Sylgard 184 de Dow Corning.

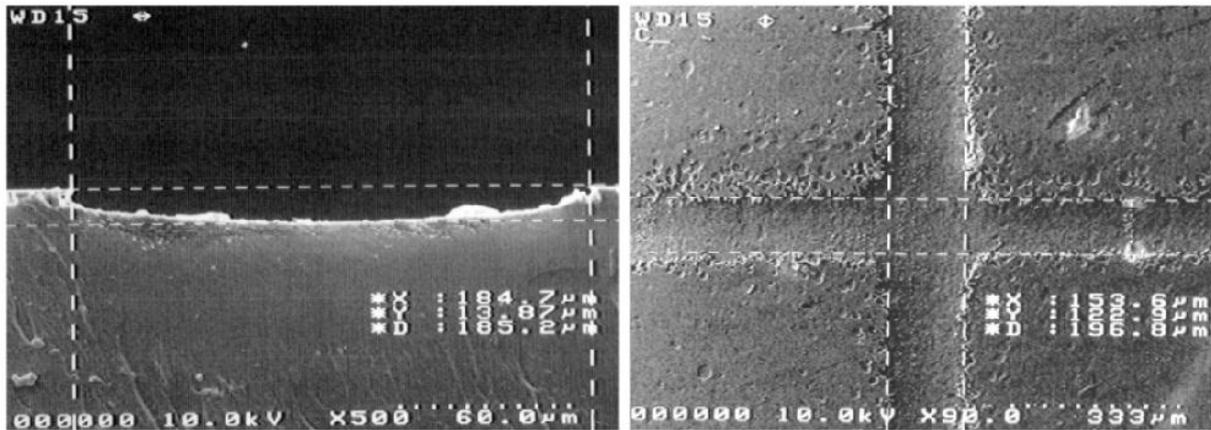


Fig 1-22 : Semi-canaux de PDMS²¹.

Un mode opératoire assez proche permis à A. Grimes *et al.*(figure 1-23)²² en 2007 de produire des canaux peu profonds, toujours par réplcation de PDMS sur les motifs d'encre imprimés, mais cette fois sur des feuilles de polymère rétractables à la cuisson (Shrinky-Dink). La taille finale des motifs pouvait être choisie en fonction du temps alloué au polymère pour rétrécir. Les canaux obtenus avaient une largeur de 200 μm .

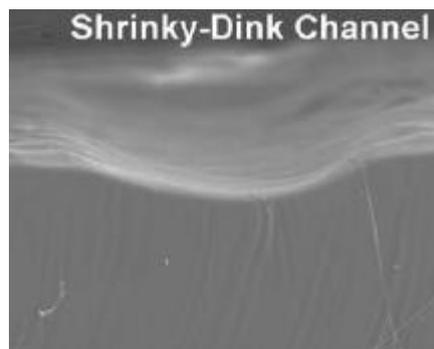


Fig 1-23 : Semi-canal de PDMS²².

Le PDMS est un polymère susceptible de réagir avec l'eau^{23,24,25}, mais aussi avec des sels (par exemple, des sels de sodium) et de ce fait avec d'autres polymères aqueux tels que l'alginate, mais cela uniquement avant sa complète réticulation. Une fois réticulé il est considéré comme plutôt résistant et peu réactif lors de sa mise en contact avec de nombreux solvants²⁶.

On peut obtenir des films fins de ce polymère par spin coating. L'épaisseur des couches obtenues dépend essentiellement de la vitesse de rotation appliquée à l'échantillon (figure 1-24)²⁷.

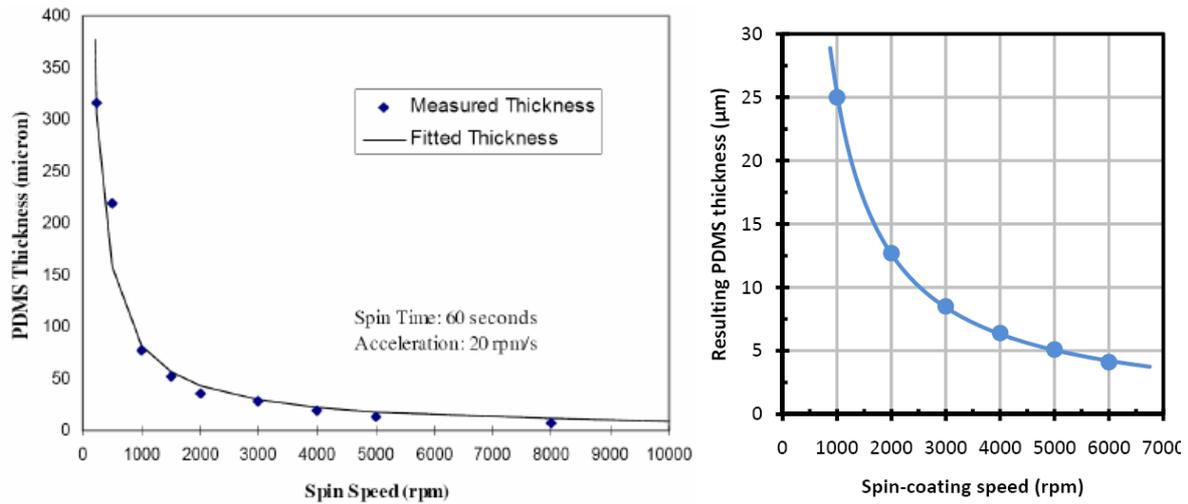


Fig 1-24 : Courbes de calibration du spin coating pour le PDMS²⁷.

Il est possible de tirer parti de ces films fins de polymère afin de créer des membranes qui, mises sous pression vont permettre d’obtenir des motifs arrondis, sur lesquels une couche plus épaisse de PDMS peut être moulée. Telle est la technique employée par Y. Hongbin *et al.* en 2009(figure 1-25)²⁸.

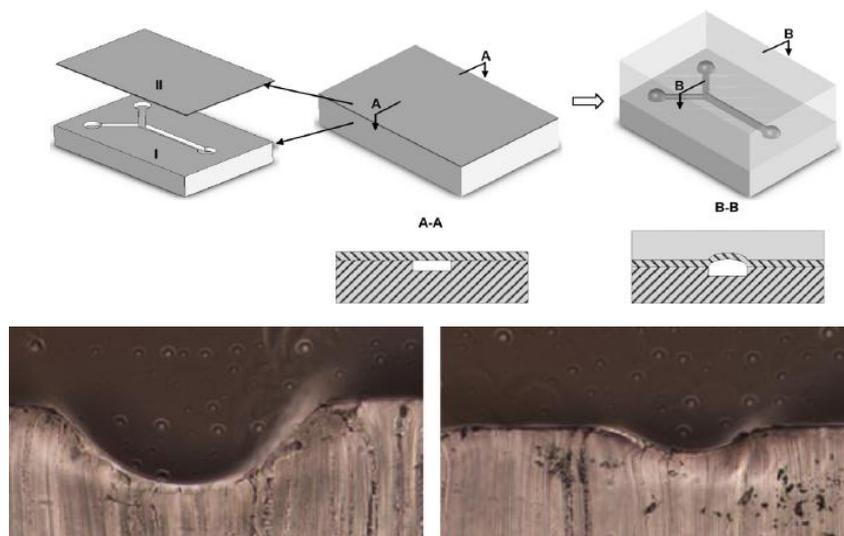


Fig 1-25 : Exemple de semi-canaux de PDMS²⁸.

Toutes ces qualités techniques (transparence, état liquide réticulable, tenue en température, hydrophobicité contrôlable....) font également du PDMS un matériau de choix lorsque l’on souhaite fabriquer des LOC à section circulaire en utilisant des techniques plus rapides et aisément mises en œuvre, et *n’impliquant pas ou peu l’utilisation d’équipements de laboratoire spécialisé.*

Partie B : Conception atypique de Labs On Chip à partir de matières liquides

1) Matériaux disponibles

1) PDMS

Le PDMS est généralement considéré comme biocompatible²⁹ (au sens « inerte » du terme), cependant certaines études vont à l'encontre de cette idée³⁰, du fait des catalyseurs à base de métaux lourds utilisés lors de sa réticulation, et qui pourraient être relargués lors de l'utilisation des dispositifs et de leur mise en contact avec des fluides et des tissus biologiques.

Par ailleurs le PDMS est naturellement hydrophobe, présentant à l'état brut un angle de contact de 110° lors du dépôt d'une goutte d'eau à sa surface. Il peut sembler de ce fait peu biocompatible. Cependant il est possible de recourir à des techniques d'exposition aux plasmas contenant de l'oxygène (O_2 ou UV/Ozone³¹) pour le rendre hydrophile à plus ou moins long terme. On peut ainsi créer des motifs hydrophiles aux formes variées, en appliquant des plasmas au travers de masques « pochoirs ».

Enfin, la superposition de couches de PDMS aboutit à une structuration monobloc. Il n'y a pas d'effet multicouche permettant de retirer successivement les couches déposées et réticulées, à moins d'intercaler une couche de « peeling », constituée par exemple de Teflon.

Un procédé original a été mis au point par K. Lee *et al.*³² en 2007 (figure 1-26). Les propriétés de viscosité du PDMS avant sa réticulation ont été mises à profit, afin de créer des ménisques. La formation de canaux plus ou moins arrondis se produit selon la pression appliquée.

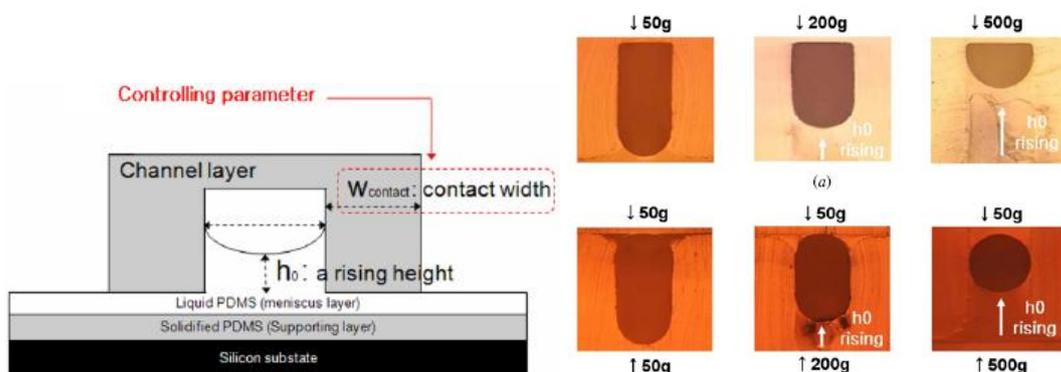


Fig 1-26 : Extrait du procédé de fabrication et profils des canaux³².

La même année S.H. Chao *et al.* (figure 1-27)³³ ont tenté d'utiliser les propriétés d'hydrophilie/hydrophobie du PDMS soumis à un plasma oxygène. Des rivulets d'eau ont pu être moulés, mais le résultat final a donné des canaux très aplatis.

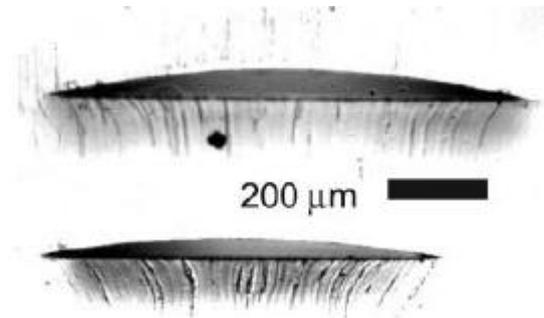


Fig 1-27 : Moulage de rivulets d'eau dans du PDMS³³.

En 2009, d'une manière assez similaire, des lentilles ont été fabriquées par moulage de gouttes d'eau à l'état de glace³⁴ dans du PDMS.

2) Solides à température de fusion contrôlée

L'utilisation de matériaux sensibles à la température de manière réversible permet l'utilisation de la technique dite de « la cire perdue ». Souvent, un moule est réalisé selon les techniques de lithographie traditionnelle (résinage, insolation, développement). Le matériau fondu est coulé dans les canaux créés. Une fois refroidi et solidifié, il est lui-même inclus dans un autre polymère possédant des paramètres de réticulation indépendants du paramètre température.

Ce procédé peut être par exemple appliqué à l'agarose dont la température de fusion est de 80°C, ainsi qu'à la gélatine, dont la température de fusion est voisine de 50°C, comme l'ont montré A.P. Golden *et al.*³⁵ en 2007 (figure 1-28).

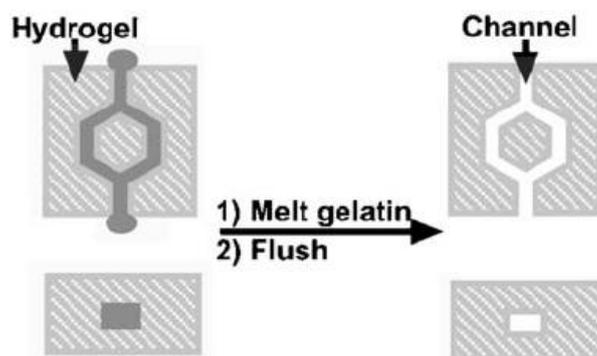


Fig 1-28 : Extrait du procédé de fabrication³⁵.

Un autre avantage en faveur de l'utilisation de ces polymères concerne leur biocompatibilité.

La gélatine, issue de l'hydrolyse du collagène est riche en protéine, et très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire. L'agarose, quant à lui, est obtenu à partir d'algues rouges, et est constitué d'agarobiose, un disaccharide constitué de D-galactose et de 3,6-anhydro-L-galactopyranose. Il est très utilisé en microbiologie, notamment pour les cultures bactériennes et fongiques.

Ainsi, en 2010, I. Wong *et al.*³⁶ ont couplé l'utilisation de l'agar et du PDMS afin d'obtenir un substrat propice à la croissance de bactéries, dont la survie et l'apport en nutriment est contrôlable localement via les liquides amenés dans les canaux microfluidiques.

3) Alginate de sodium

Dans ce travail nous avons fait le choix original d'utiliser l'alginate de sodium, dont la formule est donnée en figure 1-29, pour la réalisation de moules. Nous avons choisi ce matériau pour ses propriétés physiques et chimiques, qui permettent une bonne compatibilité avec le PDMS liquide (notamment en permettant un moindre écrasement des canaux lors du séchage du PDMS comparativement à l'eau). L'alginate est un copolymère polyanionique extractible à partir des algues brunes. Il est composé de deux entités monomères, les acides 1,4 β-D-mannuronic (M) et α-L-guluronic (G). Ce ratio entre les blocs (M) et (G) du polymère dépend de la source de production, et peut être exploité de manière à faire varier les propriétés mécaniques et la porosité du matériau^{37,38,39}.

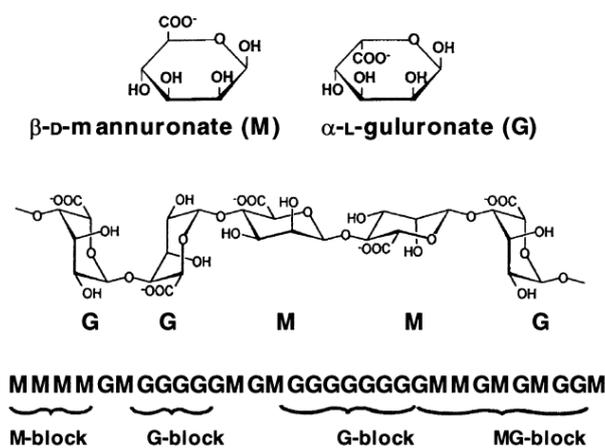


Fig 1-29 : Composition de l'alginate de sodium.

L'alginate est utilisé dans l'industrie depuis de nombreuses années, qu'il s'agisse du secteur agro-alimentaire (propriétés gélifiantes, viscosité, capacité à retenir l'eau), du milieu médical

(culture⁴⁰ et régénération de tissus cellulaires⁴¹, propriétés hémostatiques⁴²), ou de la dépollution (séquestrant de métaux lourds⁴³ tels que le plutonium⁴⁴ et le platine⁴⁵). Il est soluble en solution aqueuse, et peut former un hydrogel au contact de solutions contenant des ions multivalents. La concentration nécessaire en alginate est très faible. Quelques pourcents seulement suffisent. L'affinité **ionique** de ce biopolymère est la suivante :

- Pour un alginate riche en monomères M :
Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co > Ni > Zn > Mn
- Pour un alginate riche en monomères G:
Pb > Cu > Ba > Sr > Cd > Ca > Co > Ni > Zn > Mn
- La concentration requise pour avoir formation du gel dépend de l'ion utilisé :
Mn > Co > Ni > Zn > Ca > Cd > Sr > Cu > Pb > Ba

Le passage à l'état gélifié, dont le processus est illustré en figure 1-30, résulte de la formation de ponts ioniques entre les différents blocs (G) des chaînes du polymère. Le pH des solutions est un paramètre important. La gélification peut avoir lieu dans des conditions acide ou basique, tandis que le polymère reste sous forme liquide pour une valeur de pH comprise entre 5 et 9.

Il est également possible de redissoudre le gel formé par l'intermédiaire :

- d'une solution de citrate (chélatant naturel du calcium) ou
- d'une solution d'EDTA (chélatant du zinc comme du calcium)

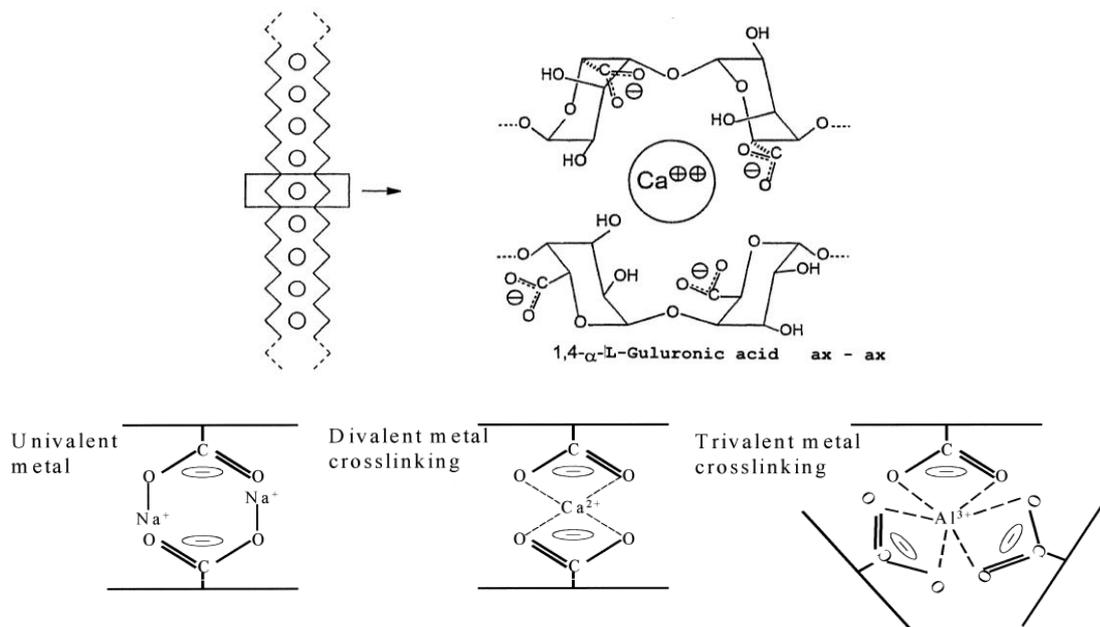


Fig 1-30 : Processus de gélification de l'alginate.

La tension de surface de ce matériau est aussi une donnée clé⁴⁶, tout comme sa viscosité⁴⁷. L'alginate de sodium commercialisé est en effet le plus souvent disponible sous trois grades (figure 1-31) :

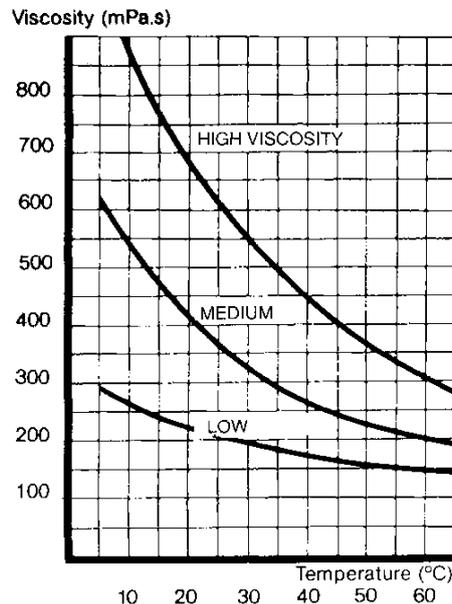


Fig 1-31 : Courbes de viscosité de l'alginate de sodium en fonction de la température et de sa composition⁴⁷.

II) Comportement de rivulets sur surfaces texturées

La méthode expérimentale que nous avons développée consiste à optimiser les paramètres de mouillabilité d'une surface pour créer un gradient hydrophile/hydrophobe combiné à l'utilisation d'alginate de sodium. C'est pourquoi, dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'étude théorique du comportement de rivulets sur surfaces texturées.

1) Définitions

Pour une surface solide homogène l'équation de Young permet de déterminer l'angle de contact θ_c d'une goutte de liquide déposée sur cette surface (figure 1-32): $\cos(\theta_c) = (\gamma_{GS} - \gamma_{LS}) / \gamma_{LG}$
où γ_{GS} , γ_{LS} et γ_{GV} sont respectivement les tensions interfaciales gaz-solide, liquide-solide, et liquide-gaz.

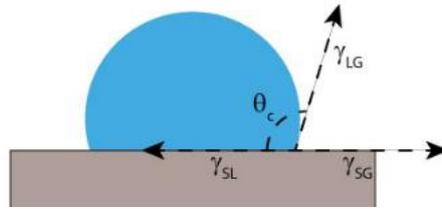


Fig 1-32 : Illustration de la notion d'angle de contact.

L'angle mesuré donne l'information sur le caractère lyophile ou lyophobe d'une surface. Un angle $\theta < 90^\circ$ permettra de conclure que la surface est « mouillante », c'est-à-dire lyophile. De manière complémentaire un angle $\theta > 90^\circ$ correspondra à une surface « démouillante », lyophobe. Ces deux comportements sont illustrés en figure 1-33 ci-dessous :

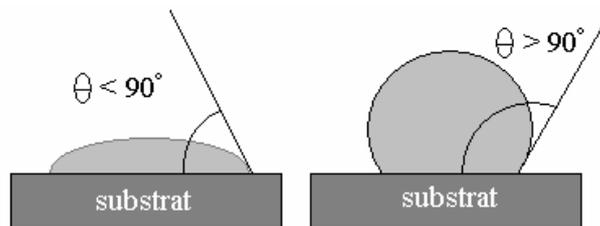


Fig 1-33 : Surface lyophile à gauche, lyophobe à droite.

Dans notre travail nous avons choisi la terminologie suivante : l'angle de contact du liquide est dénommé TCA (Tangent Chord Angle), et annoté α . Ci-dessous, en figure 1-34, l'angle α est illustré pour les deux types de canaux que nous avons produits :

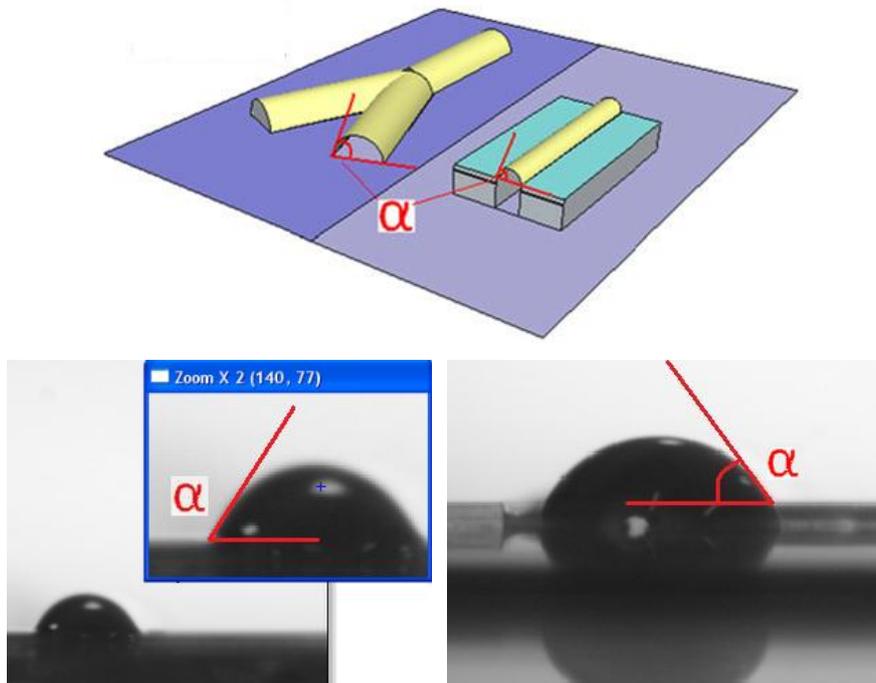


Fig 1-34 : Illustrations de la définition choisie pour exprimer l'angle de contact entre le liquide et les surfaces. Le Tangent Chord Angle α exprimé en degré.

2) Comportement des liquides sur surfaces planes texturées - Etat de l'art

On nomme rivulet un filet de liquide dont la longueur est très supérieure au diamètre de sa section.

En 1999, H.Gau *et al.*⁴⁸ donnent les conditions de stabilité des rivulets créés sur des surfaces alternant des zones hydrophiles (dont l'angle de contact est nommé θ_γ) et hydrophobes (dont l'angle de contact est nommé θ_δ).

L'angle de contact θ du liquide déposé sur les parties hydrophiles doit répondre aux deux critères suivants :

- Il doit être tel que $\theta_\gamma < \theta < \theta_\delta$
- Afin d'éviter des instabilités locales, il faut également que $\theta < 90^\circ$. Si cette seconde règle n'est pas respectée ($\theta > 90^\circ$) pour des zones hydrophiles rectilignes, on voit alors apparaître le phénomène de bombement, accompagné d'un effondrement de l'angle de contact sur le reste de la longueur du rivulet.

Cependant le phénomène de bombement apparaît beaucoup plus rapidement pour des zones hydrophiles présentant des courbures (figure 1-35). La manifestation a alors lieu spécifiquement aux changements de directions, puisqu'il s'agit d'une zone où il est possible pour le liquide de maximiser sa surface de contact avec le substrat.

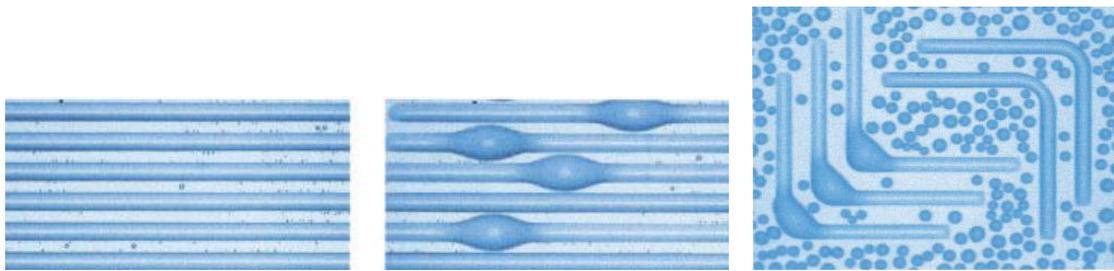


Fig 1-35 : Comportement de rivulets d'eau⁴⁸.

L'année suivante (2000), A.A. Darhuber *et al.*⁴⁹ proposent une formule permettant de relier les paramètres caractéristiques de la surface (longueur et largeur des bandes hydrophiles/hydrophobes, angles de contact) au volume de liquide qui peut y être déposé sous forme de rivulet :

$$V/l < \frac{w^2}{4 \sin^2 \theta} \left(\theta - \frac{1}{2} \sin 2\theta \right)$$

En 2002 M. Brinkmann *et al.*⁵⁰ publient une étude qui affine encore les conditions de formation d'un rivulet, et la nature de sa stabilité. Le cas de figure intéressant, lorsque l'on cherche à créer des dispositifs à section arrondie, est le cas (II) de la figure 1-36.

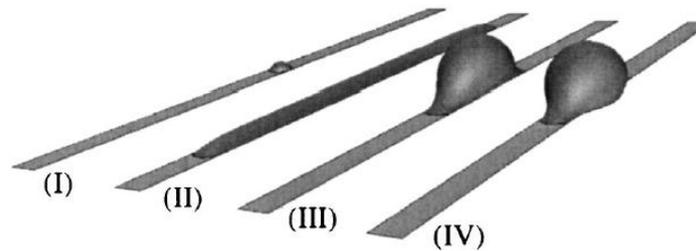


Fig 1-36 : Comportement théorique de rivulets d'eau⁵⁰.

Leurs calculs aboutirent à la conclusion suivante, un peu plus restrictive que dans l'étude de Gau *et al.* :

- L'angle de contact de la zone hydrophile (θ_γ) ne doit pas dépasser $\theta_{lim} = 38^\circ$, sous peine de basculer dans la zone d'instabilité du rivulet, tandis que la zone hydrophobe doit être telle que $\theta_\delta > 90^\circ$, comme le montre la figure 1-37 :

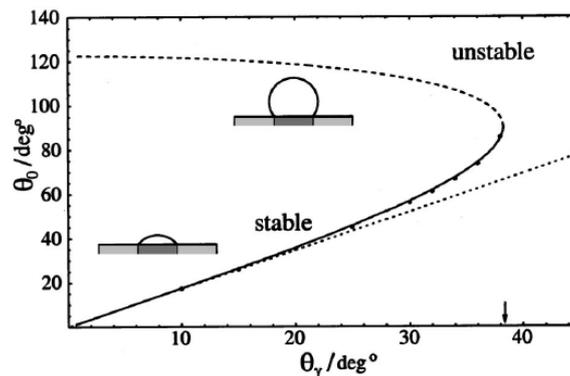


Fig 1-37 : Comportement théorique de rivulets d'eau⁵⁰.

Cependant, même si les théories concernant la stabilité de rivulets sur des surfaces planes chimiquement texturées sont relativement fournies, peu d'applications ont vu le jour.

Une des plus remarquables mises en œuvre de ces idées combine l'utilisation de propriétés de mouillage et le principe de lithographie :

En 2009 l'équipe de X. Liu⁵¹ a ainsi obtenu (figure 1-38) des motifs 2D hydrophiles d'hydrogels de polyacrylamide (PA), entourés de régions hydrophobes de triméthoxysilyl propyl méthacrylate silanisé (TPM). La création de motifs variés (serpentins, Y) a été réalisée par le moulage par

PDMS d'une solution eau-glycérol déposée sur les motifs hydrophiles. Les motifs restent cependant assez aplatis.

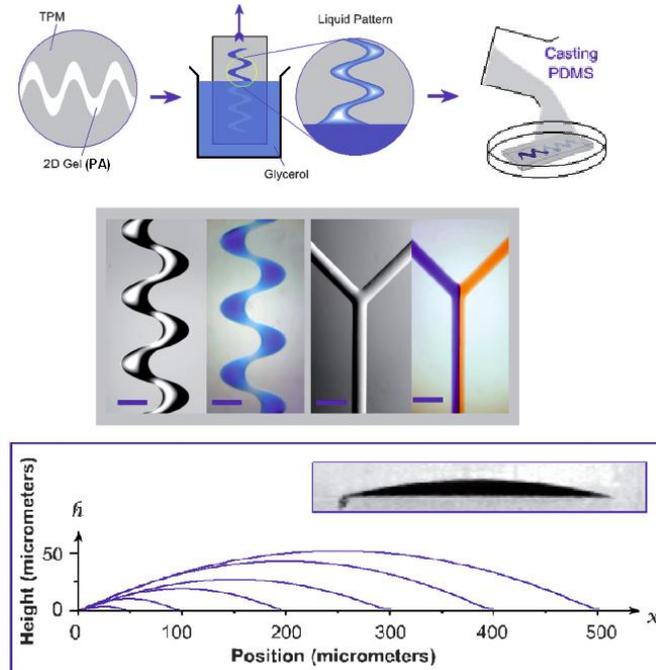


Fig 1-38 : Procédé de fabrication, illustration et caractéristiques des canaux produits⁵¹.

3) Comportement des liquides sur des surfaces non planes - Etat de l'art

En 2004 M. Brinkmann *et al.*⁵² ont considéré le cas où le rivulet est semi-limité par une pente sur l'un de ses flancs (figure 1-39), et ont étudié l'angle $\theta = \varphi + \epsilon$ adopté par le liquide sur son flanc libre. La surface est homogène en terme d'angle de contact, mais sa géométrie est non plane. Un semi-obstacle rectangulaire correspond au cas où $\alpha = 90^\circ$.

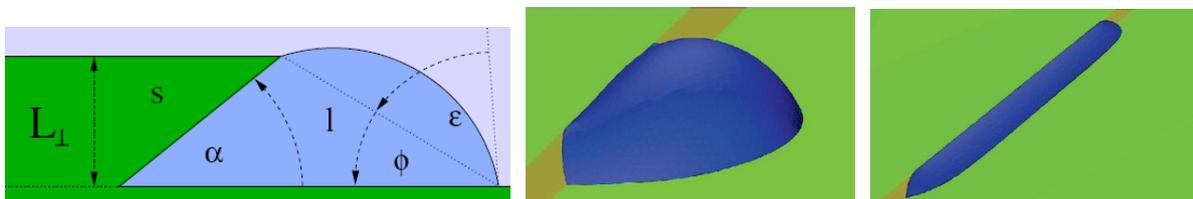


Fig 1-39 : Illustration des phénomènes pour un liquide semi-contraint⁵².

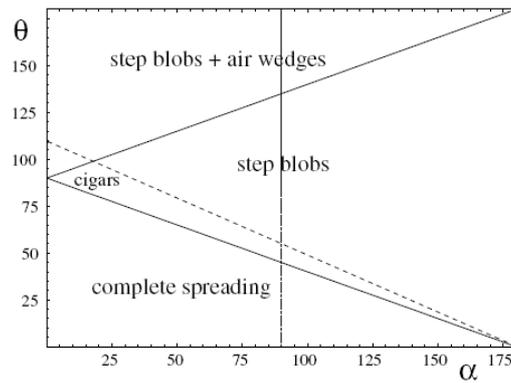


Fig 1-40 : Courbes théoriques des comportements d'un rivulet sur une surface semi-contraignante⁵².

La zone d'intérêt dans notre cas concerne le comportement en « cigare », et plus spécifiquement pour le paramètre $\alpha = 90^\circ$. Dans cette configuration, le paramètre $\theta = \varphi + \varepsilon$ ne peut prendre, selon la figure 1-40 ci-dessus, que des valeurs comprises environ entre 45° et 60°

L'année suivante, R. Seemann *et al.*⁵³ ont déterminé le lien existant entre les paramètres géométriques de canaux rectangulaires (largeur W , profondeur D , ratio d'aspect $X = D/W$) et l'angle de surface θ du liquide apparent. Ici aussi la surface est homogène mais non plane. Le régime d'intérêt correspond à la situation F^+ du graphique reproduit ci-dessous, figure 1-41 :

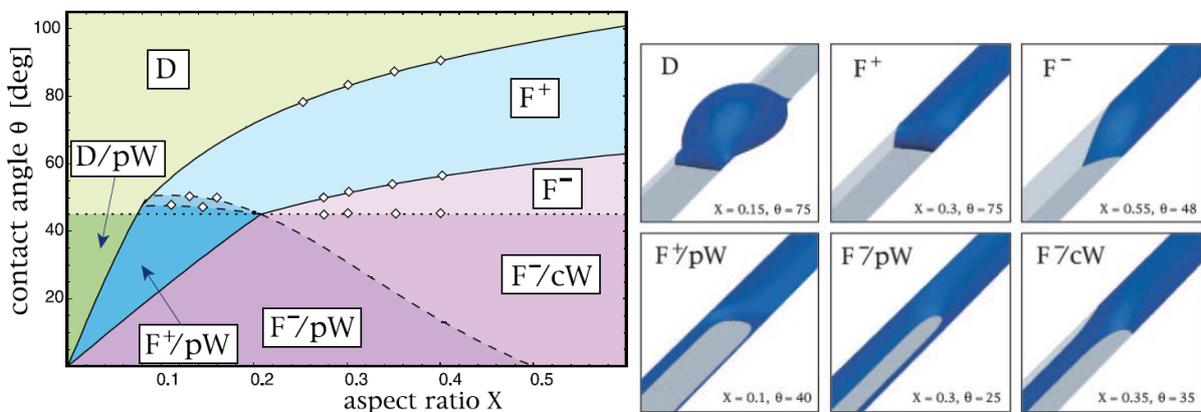


Fig 1-41 : Illustration des phénomènes pour un liquide contenu dans un canal rectangulaire⁵³.

Enfin, en 2009 R.L Speth *et al.*⁵⁴ ont démontré qu'il n'était pas pertinent d'utiliser des surfaces texturées sous forme d'un prisme triangulaire, car la configuration limite utile à l'établissement d'un rivulet stable est $\theta_c \leq 90^\circ$. Le cas a) de la figure 1-42 ci-dessous est donc instable. Cette démonstration est d'autant plus intéressante qu'elle couple les aspects géométriques du problème aux aspects de contraste de mouillabilité sur une surface, puisque les parties en rouge sont hydrophiles tandis que celles en jaune sont hydrophobes.

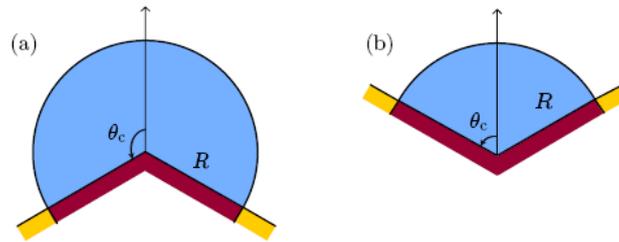


Fig 1-42 : Configuration d'un rivulet sur surfaces texturées⁵⁴.

III) Etude menée

1) Stratégie adoptée après analyse des techniques et des matériaux à notre disposition

Afin de respecter au mieux nos objectifs initiaux, il est essentiel de mettre en place un procédé rapide, peu coûteux et n'utilisant pas d'équipement technologique complexe. De ce fait, les techniques de lithographie sont exclues, puisqu'elles contredisent ces trois conditions. Les méthodes plus légères telles que la modification de surface par plasma sont en revanche attractives. La figure 1-43 ci-dessous résume ces constatations :

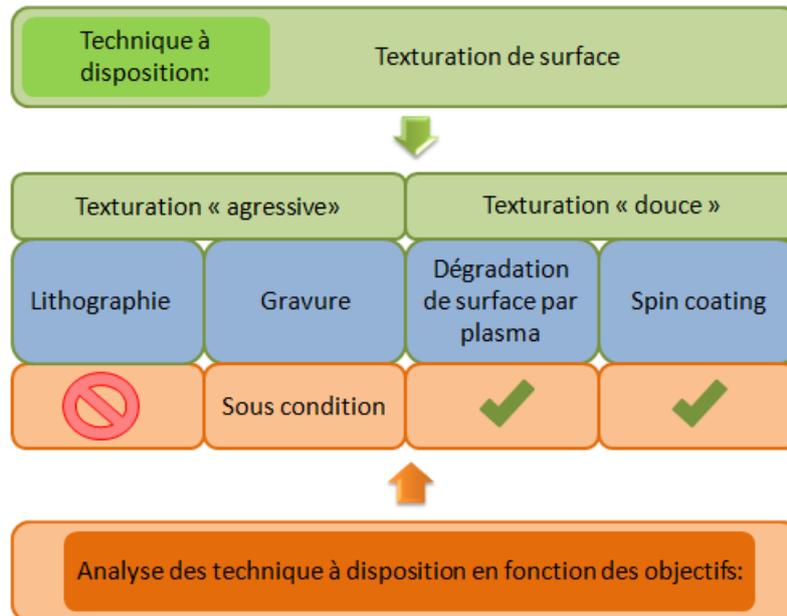


Fig 1-43 : Comparatif entre les techniques disponibles et nos objectifs.

D'autre part, le dispositif doit être transparent et peu fragile. Les matériaux tels que le silicium et le verre ne peuvent donc pas convenir pour l'usage prévu, tandis que le PDMS et l'alginate de sodium présentent les meilleures caractéristiques. La figure 1-44 résume nos choix :

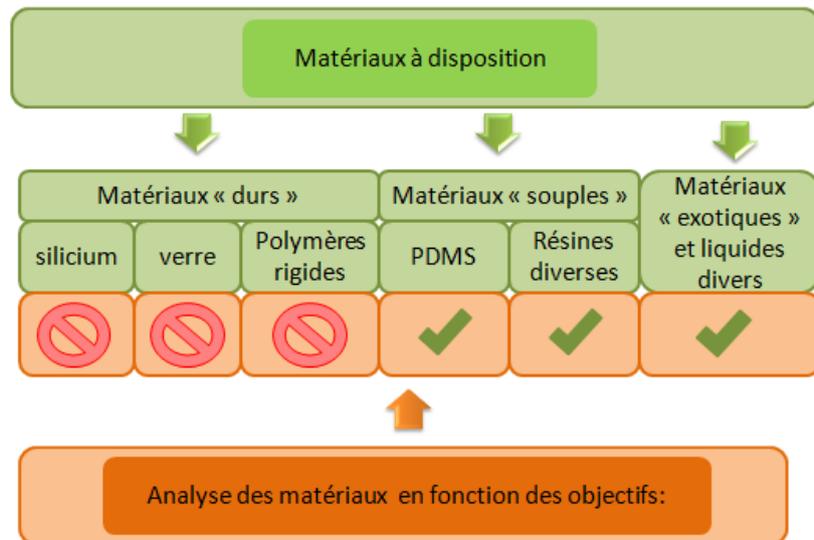


Fig 1-44 : Comparatif entre les matériaux disponibles et nos objectifs.

2) Expérimentation

a) Canaux créés à partir de filaments solides d'alginate

Cette méthode, que nous avons proposée est illustrée ci-dessous en figure 1-45, elle repose sur l'utilisation des propriétés de gélification et de dissolution de l'alginate de sodium. Elle permet une grande liberté dans la création de réseaux de canaux, mais son inconvénient majeur concerne l'échelle de taille. Il est en effet très difficile de travailler à la main à des échelles inférieures à 500 μm . Cependant, cette technique pourrait devenir intéressante si elle venait à être adaptée sur un banc automatisé.

Nous avons utilisé des aiguilles très fines pour seringues dentaires (gauge 30, soit un diamètre de 250 μm) pour produire en continu à l'aide d'un pousse-seringue un filet d'alginate de sodium. Ce filet liquide est récupéré dans un béccher contenant une solution de sulfate de zinc sous agitation magnétique modérée (un vortex de large diamètre doit tout juste être formé). Le filet d'alginate se solidifie alors. Il est récupéré, et coupé en courts tronçons fragiles mais manipulables à la pince. Le motif voulu pour un réseau de canaux peut alors être construit, fragment par fragment sous microscope. Les tronçons sont « collés » entre eux par une fine gouttelette d'alginate liquide. Il ne reste plus alors qu'à couler le PDMS de manière à emprisonner les fils. Une fois le PDMS réticulé, les plots d'accès aux canaux sont percés, et l'étape de dissolution de l'alginate peut débuter. Une solution écologique mais lente consiste à injecter

lentement à la seringue une solution de citrates. Le recours à des solutions aqueuses basiques ou à des solvants de type EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) est aussi possible.

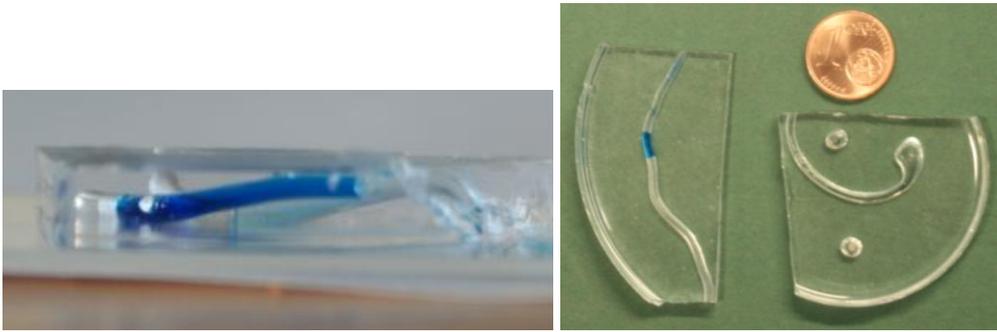


Fig 1-45 : Exemples d'architecture 3D par inclusion de fils d'alginate réticulé dans du PDMS.

b) Canaux créés sur surfaces planes texturées

i. Surface de PDMS

La centrale de technologie de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) dispose de deux équipements générant des plasmas oxygène. Un bâti « Pico » de chez Electronic Diener© et un bâti Plasmalab 80+ de chez Oxford Instrument.

Notre idée initiale consistait à créer des motifs hydrophiles sur des plaques de PDMS, afin de pouvoir y déposer des rivulets de liquides aqueux variés, puis de les mouler. La fabrication par usinage (sur le Campus de l'université de Lille 1) de masques, dans un matériau plastique rigide et à priori résistant aux plasmas, a constitué le premier pas de l'étude. Le design de ces masques est présenté en figure 1-46 :

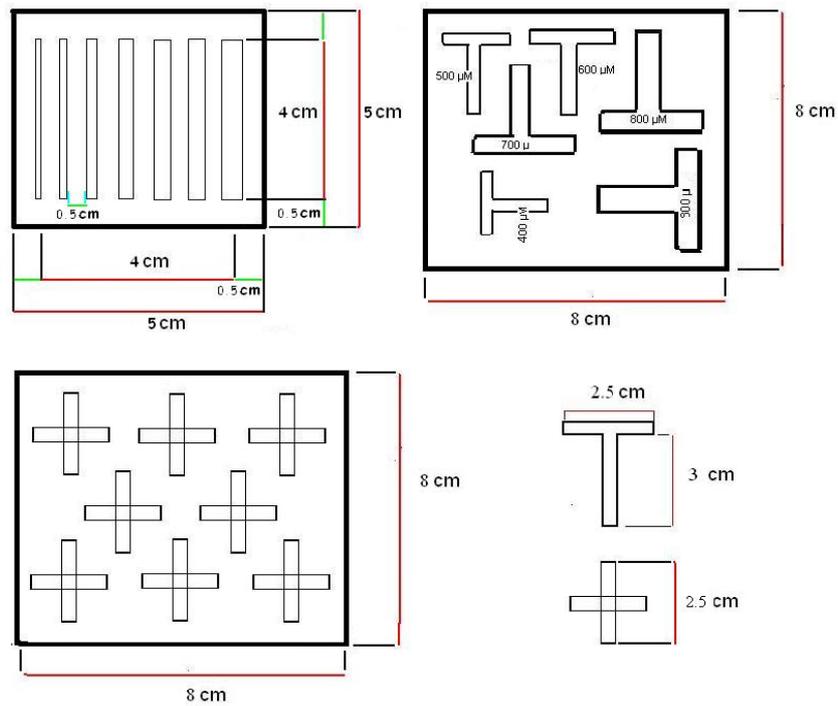


Fig 1-46 : Masques initiaux en polypropylène.

Plusieurs problèmes sont apparus à l'utilisation de ces masques. Il s'est avéré que leur épaisseur (2 mm) était trop importante pour que les plasmas oxygènes des bâtis puissent agir efficacement et de manière homogène à la surface du PDMS. De plus une bonne étanchéité ne pouvait pas être assurée entre le polymère et les masques, et les fuites existantes rendaient les contours des zones hydrophiles « floues ».

Par la suite un masquage par une sur-couche de PDMS comportant des ouvertures d'environ 700 μm de largeur a été tenté (figure 1-47). Cette sur-couche était placée soit au-dessus, soit en dessous d'une plaque complète de PDMS. L'exposition de cette bicouche s'effectuait dans le bâti Plasmalab 80+.

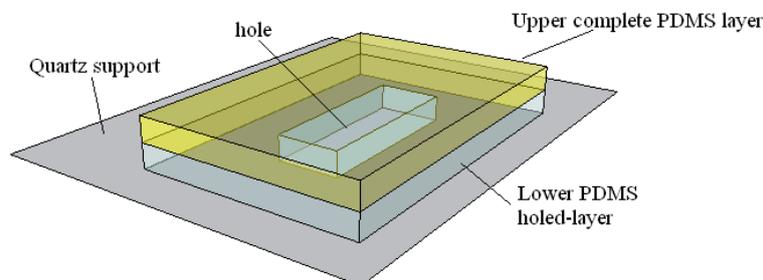


Fig 1-47 : Procédé de masquage par le dessous via une couche de PDMS ajourée.

Les paramètres en jeu sont la pression dans la chambre, la puissance du plasma et le temps d'exposition du polymère. La tension bias est une donnée permettant la vérification du bon déroulement de l'expérience et sa reproductibilité.

Le temps d'exposition a été fixé à 5 minutes maximum, afin de pouvoir avoir un contrôle sur l'angle de contact à la surface. Des expositions plus longues rendent le PDMS totalement hydrophile sur ses deux faces. La figure 1-48 présente les tendances évolutives des angles de contact en fonction de la puissance et de la pression. Les valeurs des courbes sont reportées en figure 1-49 :

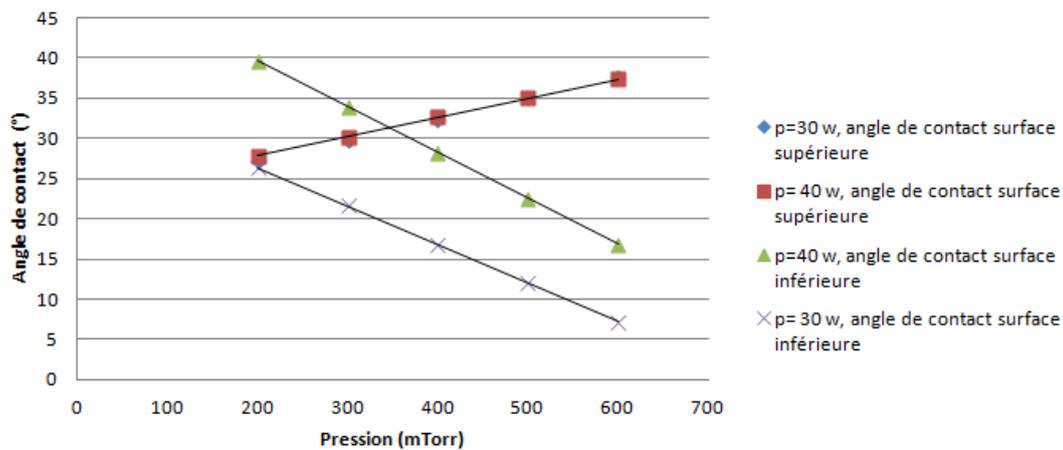


Fig 1-48 : Courbes d'évolution de l'angle de contact en fonction de la pression et de la puissance du plasma dans la chambre (on notera que les courbes bleues et rouges sont confondues).

Pression (mTorr)	Puissance de 40 W, surface supérieure	Puissance de 30 W, surface supérieure	Puissance de 40 W, surface inférieure	Puissance de 30 W, surface inférieure
200	27,2	27,8	39,6	26,4
300	29,8	30,2	33,9	21,6
400	32,4	32,6	28,2	16,8
500	35	35	22,5	12
600	37,6	37,4	16,8	7,2

Fig 1-49 : Table des valeurs d'angles de contact correspondant au graphique ci-dessus, et résultant d'un moyennage de 4 mesures pour chaque valeur.

Les tendances d'évolution retrouvées pour les angles de contact montrent que le plasma agit sur le polymère de la manière suivante :

- Pour une valeur de puissance donnée, l'augmentation de la pression conduit à une augmentation de l'angle de contact sur la partie supérieure du polymère tandis que l'angle de contact sur la partie inférieure est sujet à décroissance.
- Pour une valeur de pression donnée, l'augmentation de la puissance conduit à une décroissance de l'angle de contact sur la partie supérieure du polymère tandis que l'angle de contact sur la partie inférieure est sujet à croissance.

Une tension « bias » plus faible et une pression plus élevée sont synonymes de diminution du bombardement ionique. Il est donc logique que l'évolution de la surface supérieure suive une pente positive. De plus, on remarque qu'un plasma plus puissant aura tendance à moins « diffuser » en profondeur, la courbe des angles de contact des surfaces inférieures pour un plasma de 30 W étant en dessous de celle d'un plasma de puissance 40 W. L'évolution du bias en fonction de la pression et de la puissance du plasma est donnée en figure 1-50 :

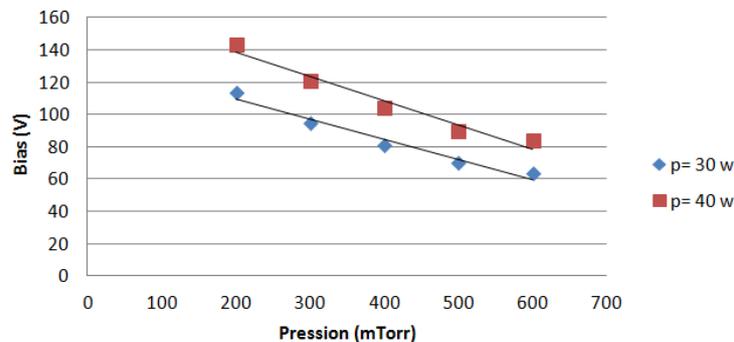


Fig 1-50 : Courbes d'évolution du Bias en fonction de la pression et de la puissance du plasma dans la chambre.

Les soucis majeurs de cette étude furent les suivants :

- Expérimentations excessivement nombreuses et difficilement reproductibles,
- L'hydrophilie acquise sur le PDMS s'est révélée trop fugace pour pouvoir obtenir un protocole robuste de fabrication de Lab On Chip.
- Ce masquage par PDMS présentait l'inconvénient de mener lui aussi à des contours de canaux « flous » (figure 1-51) :

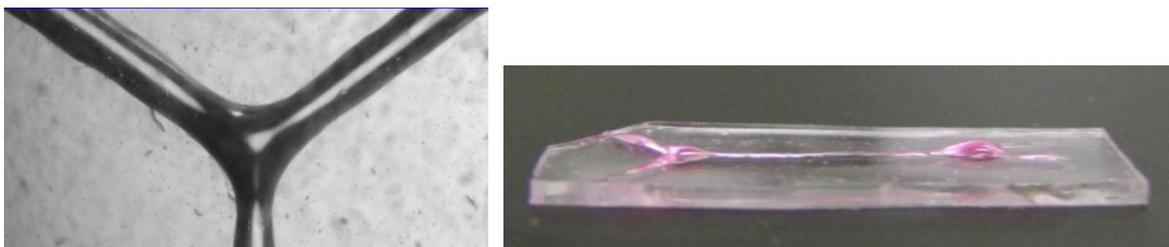


Fig 1-51 : Contours flous et phénomène de bombement.

Le moulage des rivulets d'eau menait à des sections finales trop peu arrondies pour être intéressantes, comme on le constate en figures 1-52 et 1-53. Un phénomène d'écrasement (comme le montre la photo du canal scellé ci-dessous) similaire à celui décrit dans les études de S.H. Chao *et al.*³³ et X. Liu *et al.*⁵¹ a été constaté. Une réduction d'un tiers de l'angle de contact initial avait lieu après moulage. (un rivulet d'angle de contact 75° menait à un canal avec une semi-ouverture finale de 50°).

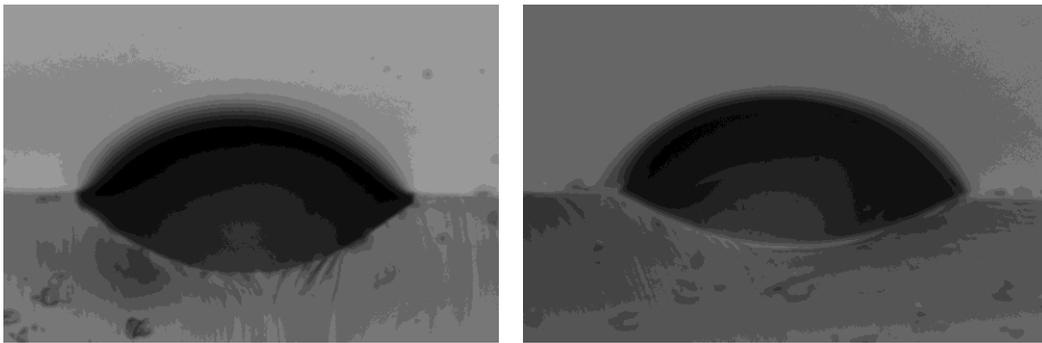


Fig 1-52 : Remplissage de la première moitié du dispositif PDMS.

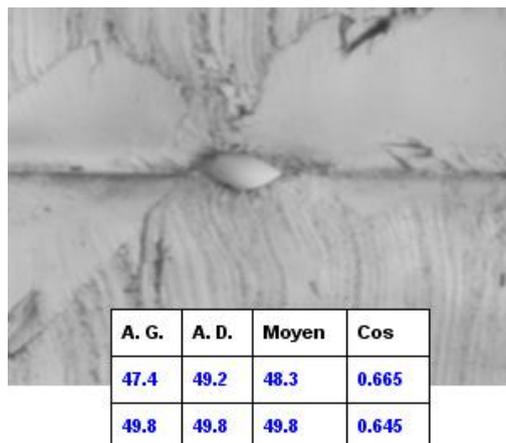


Fig 1-53 : Canal scellé, avec phénomène d'écrasement bien visible.

ii. Surfaces de silicium, canaux obtenus

Afin de remédier aux soucis techniques de « flous » des contours, des wafers en silicium affiné (300 μm d'épaisseur) ont été utilisés et ont permis de produire des masques à l'aide du bâti à plasma couplé par Induction (ICP) de chez Surface Technology System, qui est disponible en salle blanche de l'IEMN. Le protocole de fabrication est décrit en Annexe 1, page 190.

Des motifs à section variable ont été choisis (en noir sur la figure ci-dessous, l'unité est le micron), et les angles d'ouverture des motifs en Y sont diversifiés (en rose sur la figure 1-54 ci-dessous, l'unité est le degré d'angle).

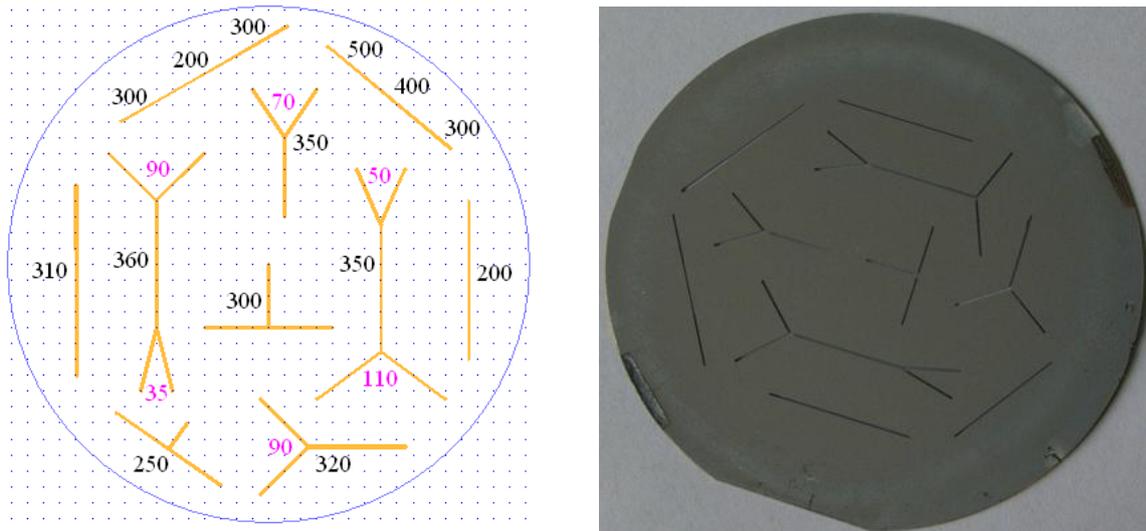


Fig 1-54 : Design et photographie d'un masque produit par procédé Bosch.

La technique employée consiste à traverser de part en part le wafer par gravure physique. Le procédé utilisé est le procédé Bosch présenté en page 21.

La largeur des motifs usinés a pu être réduite comparativement aux masques plastiques. Ces masques sont utilisés pour la fabrication de canaux à section circulaire présentant des embranchements.

Afin de créer des zones de fort contraste de mouillabilité il faut débiter le process à partir d'une surface superhydrophobe. A cette fin, deux types de surfaces sont fabriquées. Les unes à base de C_4F_8 , les autres à base d'OTS.

Les surfaces recouvertes de C_4F_8 sont rapides à obtenir (procédé partiel provenant du procédé Bosch), et la couche de polymère fluoré déposée est très fine (60 nm, en 10 secondes d'exposition à 220 sccm). Cependant il ne s'agit que d'une couche de surface, qui s'écaille telle de la peinture au contact de l'alginate de sodium. Une réaction chimique du sodium avec la surface fluorée est envisageable⁵⁵. La présence d'ions calcium ou zinc aggrave encore plus la situation. Le choix d'un autre polymère devient donc impératif, afin de rendre les surfaces hydrophobes.

Le dépôt d'une monocouche d'octadécyltrichlorosilane (OTS) sur un wafer de silicium est réalisé par un procédé chimique simple, pouvant être effectué sous atmosphère inerte si l'équipement existe au laboratoire, sinon directement à la paillasse. Le wafer est tout d'abord nettoyé à l'acétone puis à l'isopropanol, puis il est plongé dans un bain d'hexane et d'OTS (ratio v:v de 1:500 pour OTS:hexane) durant 4 heures au minimum. La surface est ensuite retirée du bain d'OTS et rincée (bains sur agitateur va-et-vient) :

- Au chloroforme ou au dichlorométhane (3 fois, 3 minutes par rinçage)
- A l'isopropanol (2 fois, 3 minutes par rinçage)

Puis, lorsque cette étape d'enduction est terminée, son bon déroulement est vérifié par le test de l'angle de contact de la surface. Un angle avoisinant les 125 - 130° doit être atteint comme illustré en figure 1-55.

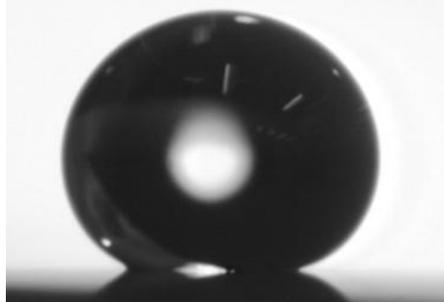


Fig 1-55 : Goutte d'eau sur une surface de silicium recouverte d'OTS.

Puis vient l'étape de dégradation sélective de la surface, par plasma UV-Ozone, au travers du masque en silicium précédemment fabriqué, comme on peut le voir en figure 1-56 :

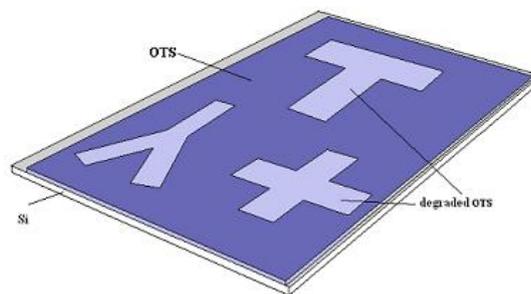


Fig 1-56 : Illustration du procédé de fabrication-1.

Le temps d'exposition au plasma détermine l'angle de contact final obtenu à l'intérieur des motifs. Pour atteindre un angle de contact interne de 80° il faut dès lors exposer les wafers 8 minutes à travers le masque.

Puis le dépôt à la seringue d'un rivulet d'alginate de sodium sur les parties rendues plus hydrophiles est effectué. Ce liquide assure un bon « empalement » sur les lignes de contact entre la surface hydrophile et la surface hydrophobe, de par ses caractéristiques chimiques. Du PDMS est ensuite coulé par-dessus le rivulet et laissé à recuire à température ambiante, comme l'illustre le schéma ci-dessous (figure 1-57):

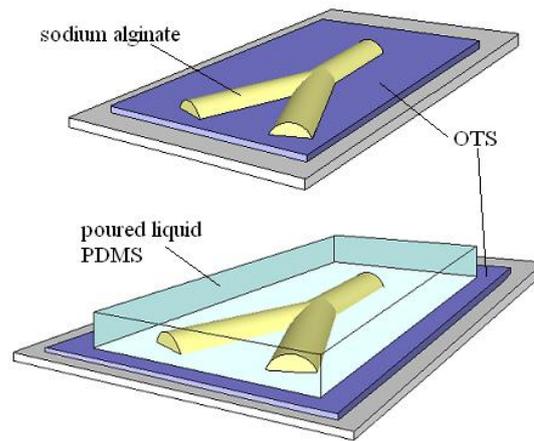


Fig 1-57 : Illustration du procédé de fabrication-2.

Lors du dépôt, le contrôle du volume est primordial, puisqu'un débordement du rivulet est irréversible, dû à la viscosité et à la texture collante de l'alginate. Les différentes photos regroupées en figure 1-58 illustrent ces débordements :

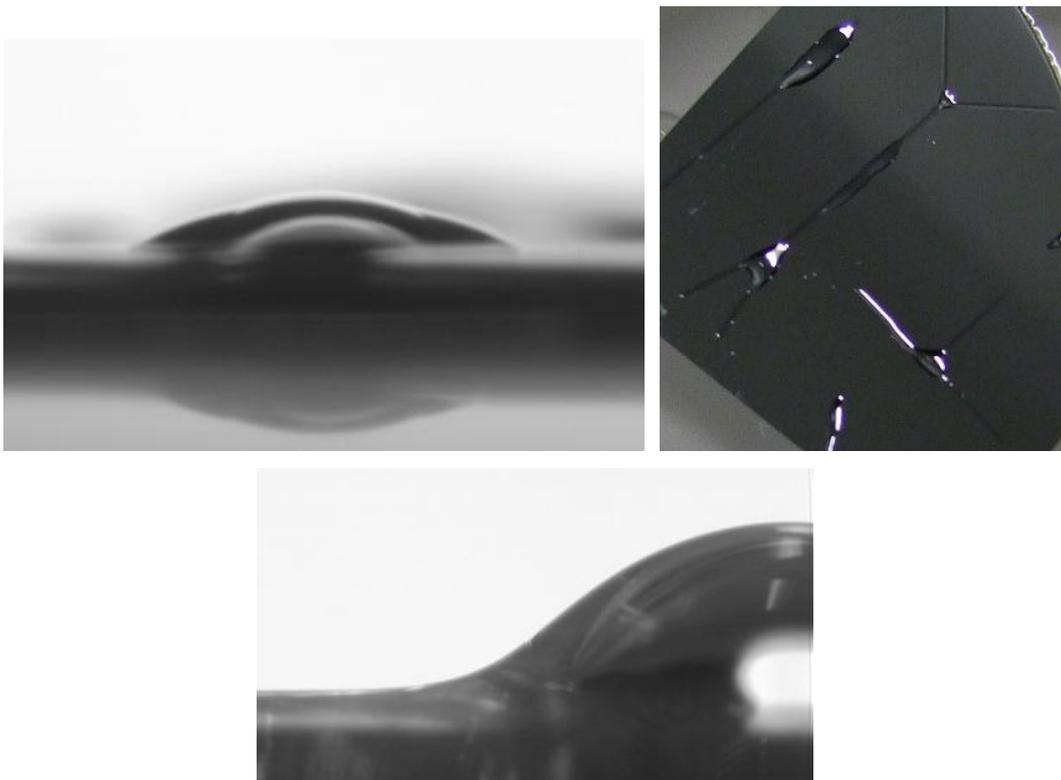


Fig 1-58 : Débordement du rivulet avant moulage si une quantité trop importante de liquide est déposée.

Les canaux finalement obtenus avec cette méthode donnent des résultats très intéressants, avec un TCA compris entre 60 et 70°, à la fois pour des canaux rectilignes mais aussi pour des embranchements, comme on peut l'observer en figure 1-59. Ces résultats nous placent au niveau de l'état de l'art, tout en employant des méthodes de fabrication plus simples.

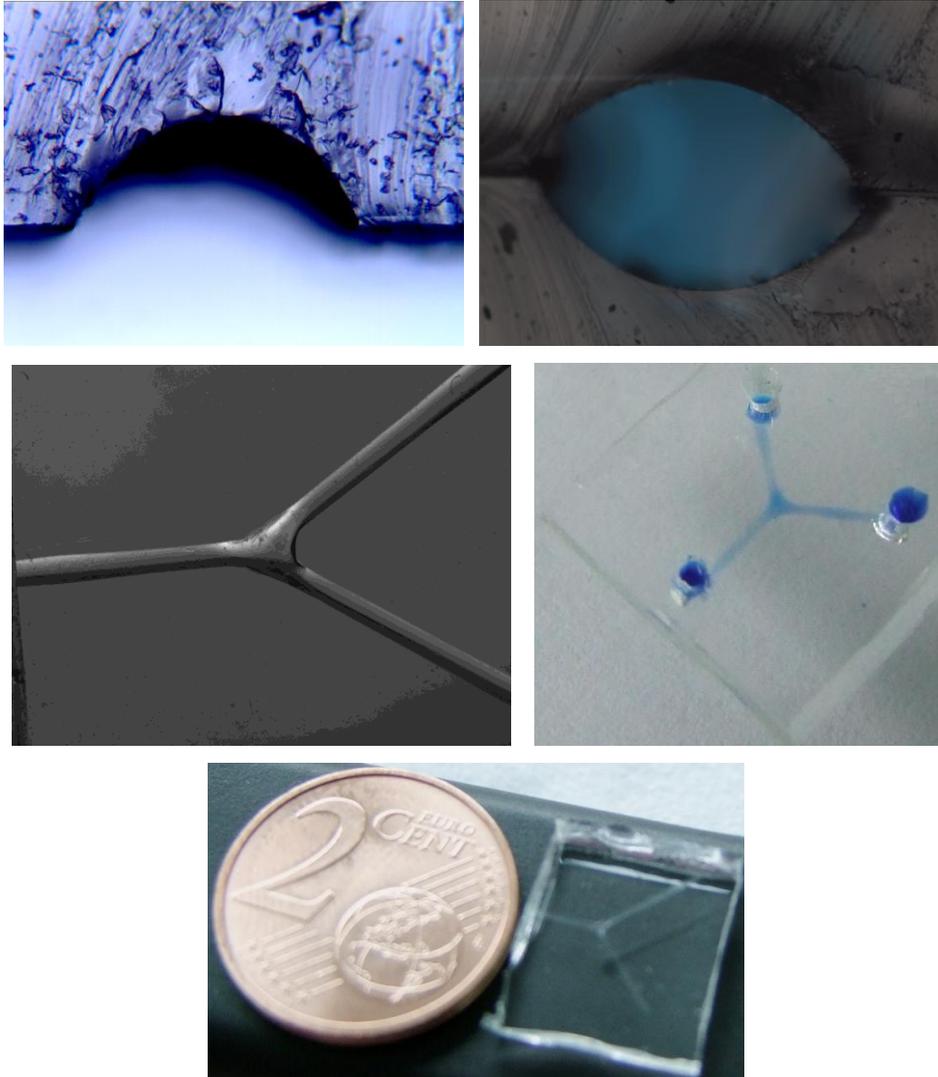


Fig 1-59 : Photographies de canaux à diverses étapes de fabrication.

c) Canaux créés sur surfaces non planes

i. Procédé de fabrication

Une autre méthode complémentaire de la précédente a été développée utilisant des surfaces non planes pour générer le canal. Une couche de PDMS de 100 μm d'épaisseur est déposée par spin-coating sur une plaquette de silicium préalablement recouverte de CHF_3 par

plasma. Cette couche est recuite sur une plaque chauffante en ayant pris soin au préalable que celle-ci soit de niveau. On l'expose ensuite au plasma CHF_3 , puis on spin-coat et on recuit une seconde fine couche de PDMS de 10 μm d'épaisseur au maximum par-dessus. Au final, une bicouche « séparable » est obtenue.

Le procédé est schématisé en figure 1-60 ci-dessous:

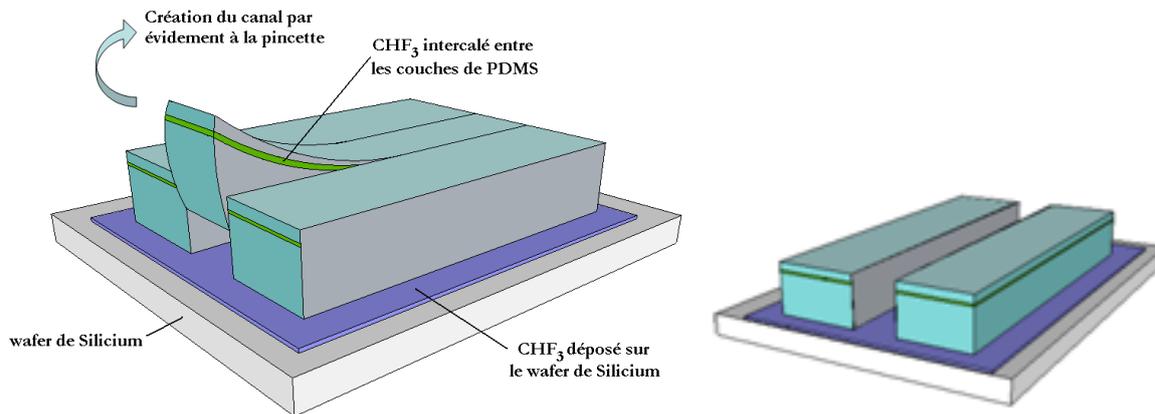


Fig 1-60 : Structuration de la bicouche de PDMS.

La mise à niveau lors du recuit est très importante, en effet, la planéité de la bicouche est capitale. On constate qu'une déviation de plus de 4 % (illustrée en figure 1-61) mène à l'échec du procédé de fabrication.

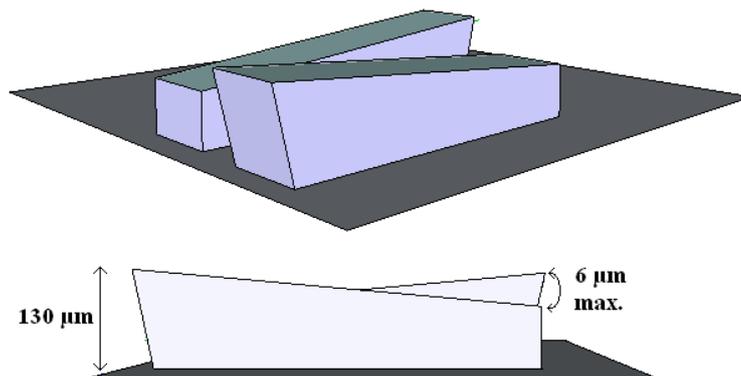


Fig 1-61 : Déviation maximale autorisée.

L'avantage notable de ce procédé, comparativement au précédent, est sa robustesse quant à l'obtention de canaux bien droits, quasiment à l'échelle du micron, comme on peut le constater en figure 1-62.



Fig 1-62 : Canal dont la déviation ne dépasse pas 3%.

Les rivulets avant moulage sont très réguliers (figure 1-63) :

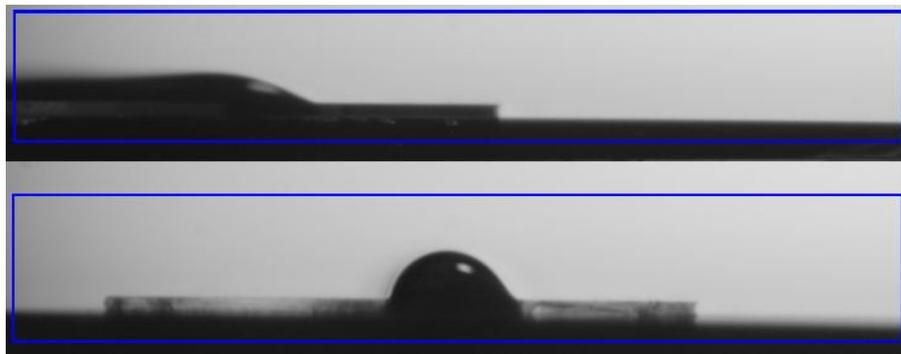


Fig 1-63 : Rivulet avant moulage, vu de profil et de face.

Seul le dépôt d'un volume trop important de liquide peut venir entraver le protocole, par l'apparition du phénomène de bombement, tel qu'illustré par la photographie (figure 1-64) ci-dessous.

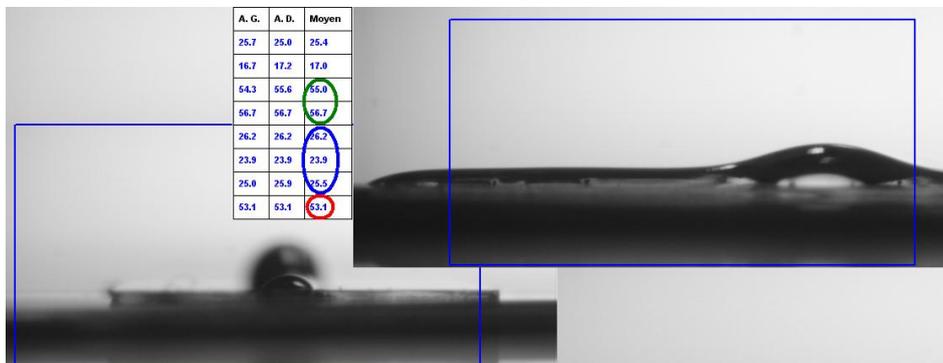


Fig 1-64 : Illustration du phénomène de bombement.

Ci-dessous sont présentées quelques photographies au microscope de rivulets d'alginate ayant commencé à sécher (l'angle de contact initial de 80° est alors progressivement diminué). Les extrémités des rivulets (figures 1-65 à 1-69) correspondent bien aux comportements attendus en fonction du ratio défini par R. Seemann *et al.*⁵³ :

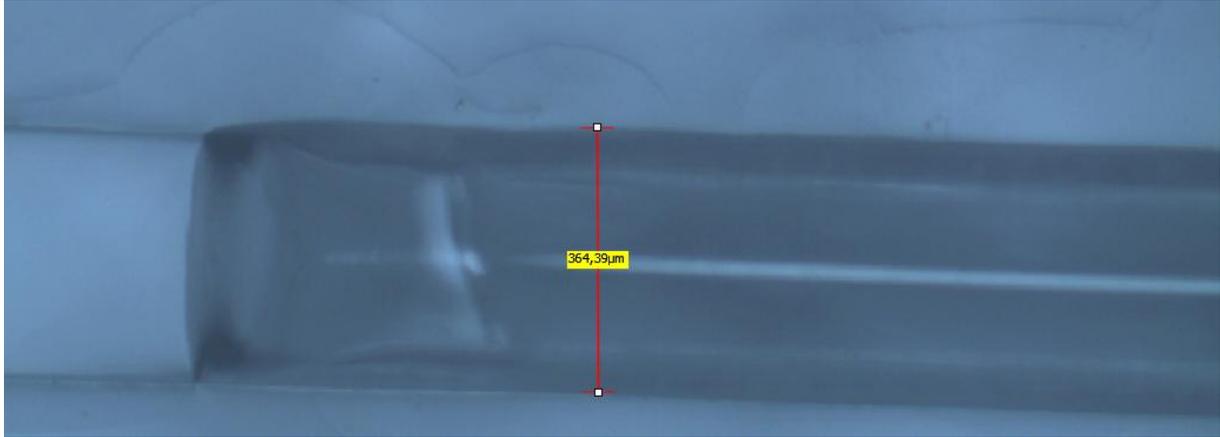


Fig 1-65 : Rivulet en comportement F+, valeur du ratio : 0,3 et angle de contact du liquide 80° .

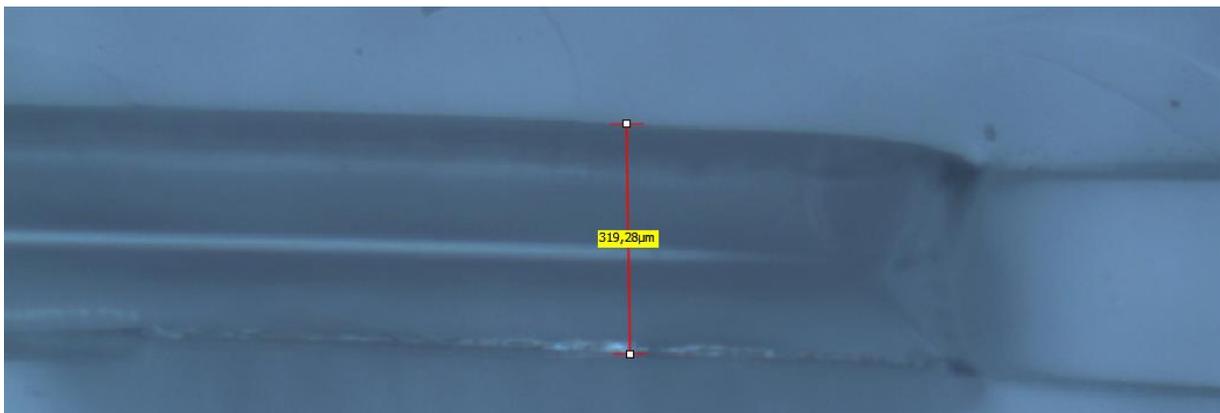


Fig 1-66 : Rivulet en comportement F-, valeur du ratio : 0,34 et angle de contact du liquide de 50° .



Fig 1-67 : Rivulet en comportement D, valeur du ratio : 0,2 et angle de contact du liquide 80° (la partie supérieure du bombement commence à sécher sous la lumière du microscope et provoque la ligne visible au centre du rivulet).

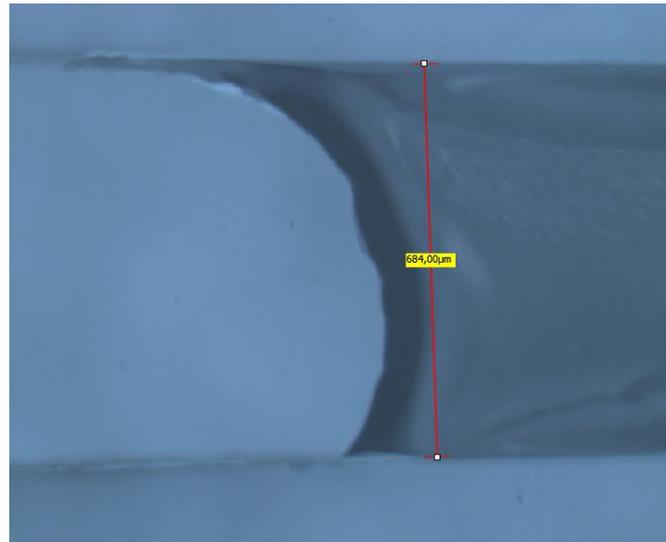


Fig 1-68 : Rivulet en comportement $F+/pw$, valeur du ratio : 0,16 et angle de contact du liquide 40° .

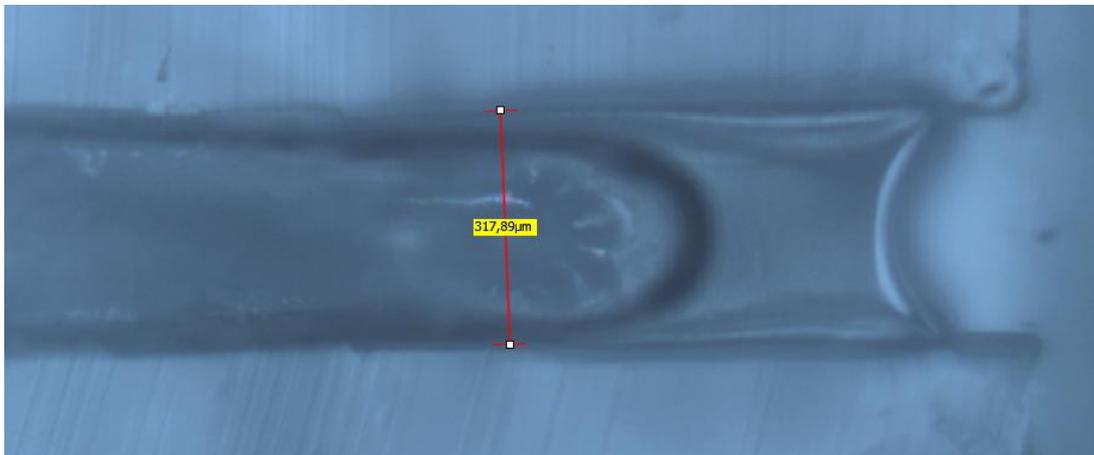


Fig 1-69 : Rivulet en comportement $F-/pw$, valeur du ratio : 0,3 et angle de contact du liquide 20° (une nappe de liquide se forme au bout du rivulet, plus épaisse aux bords qu'au centre).

ii. Canaux obtenus

Lorsque le PDMS a complètement réticulé à température ambiante, on le démoule.

Lors des premiers essais menés, avant la création de la couche de peeling, le démoulage menait à des structures présentant des « marches » (figure 1-70). Les canaux finaux avaient donc un aspect « ovalaire » :

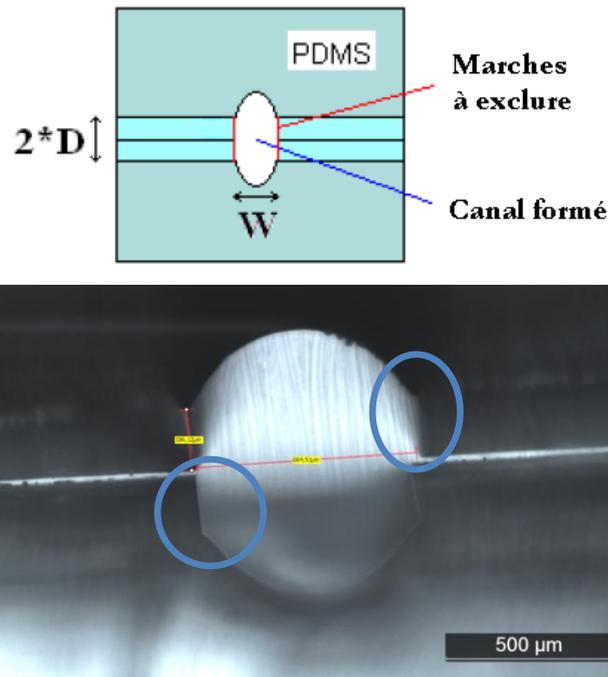


Fig 1-70 : Défauts dans la forme des canaux dûs à la présence de « marches » intercalaires.

Cet inconvénient a été résolu par l'ajout d'une fine couche de PDMS, comme nous l'avons mentionné auparavant. La première photographie ci-dessous (figure 1-71) présente un semi-canal avant peeling de la couche de PDMS d'épaisseur inférieure à $10 \mu\text{m}$. Les deux photographies suivantes montrent l'alignement puis la fermeture complète du canal. Le scellement peut avoir lieu par plasma oxygène, ou utilisation de quelques microgouttes de PDMS liquide.

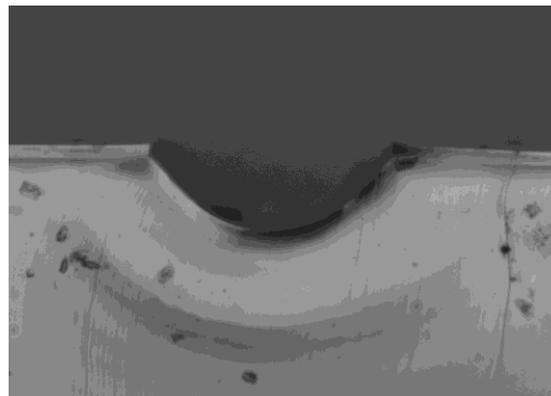


Fig 1-71 : Canal avant peeling de la bicouche.

Les canaux obtenus à la fin de procédure, après avoir été scellé par UV-Ozone ou par quelques gouttes de PDMS liquide ont des TCA de 70° à 80° , ce qui est pleinement satisfaisant (figures 1-72). Quelques irrégularités peuvent cependant se produire lors de l'alignement des deux parties du

canal sous microscope. Ces résultats nous placent au niveau de l'état de l'art, tout en employant des méthodes de fabrication plus simples.

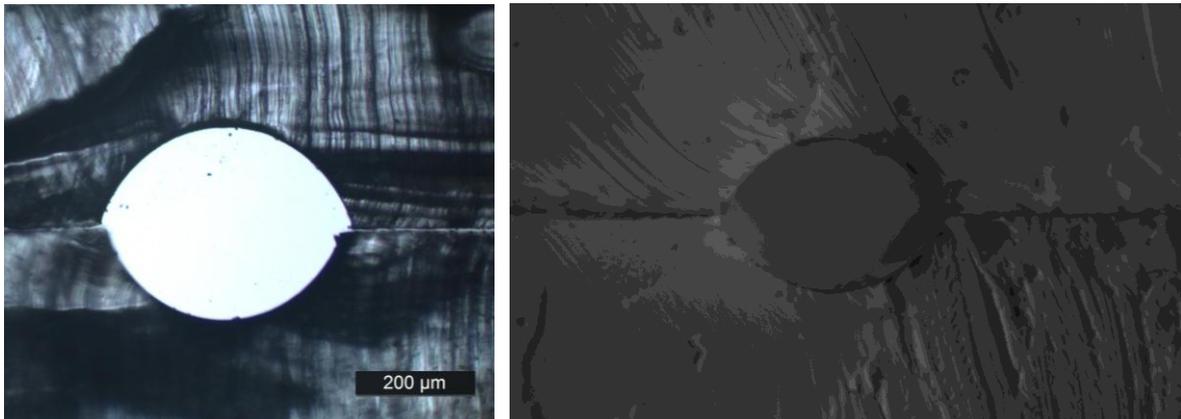


Fig 1-72 : Canal refermé, influence de l'alignement sous microscope.

Enfin, les résultats présentés précédemment ont été rendus possibles par l'utilisation de paramètres précisément définis (largeur et hauteur des canaux, volume de liquide déposé...). Pour aboutir à ces conclusions, nous avons testé de très nombreuses configurations, qui nous ont permis de définir le graphique suivant (figure 1-73), permettant de fournir des règles de dimensionnement.

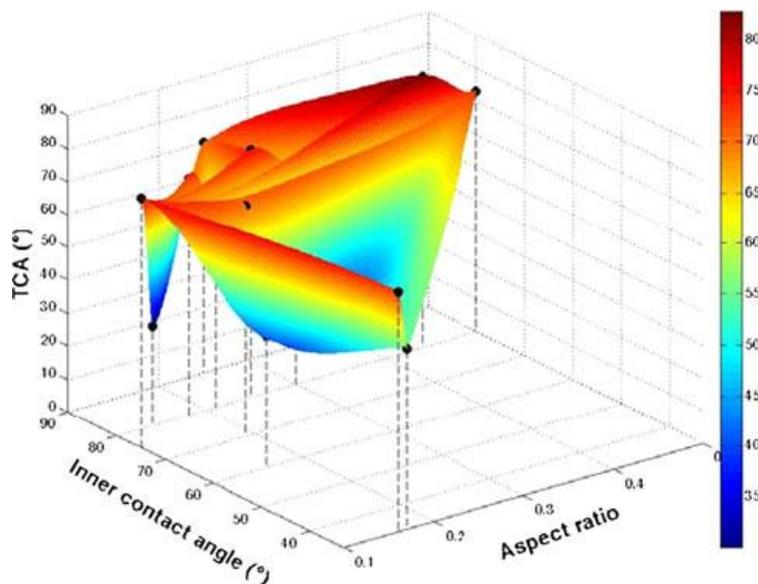


Fig 1-73 : Influence des paramètres fondamentaux des structures en jeu (angle de contact de la surface, ratio d'aspect des bordures) sur l'angle final TCA de la section du canal.

Les conditions les plus favorables à l'obtention de canaux quasi-circulaires correspondent donc à l'emploi de canaux de PDMS de faible ratio d'aspect si l'on ne cherche pas à contrôler l'angle de surface interne, tandis que les paramètres géométriques du canal importent peu si l'on choisit de calibrer l'angle de surface interne.

Conclusion

Le cahier des charges pour la création d'un dispositif microfluidique appliqué à la biologie regroupait les fonctions suivantes :

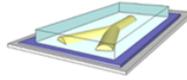
- amener rapidité et simplicité pour la fabrication,
- développer un procédé aussi écologique que possible,
- avoir un faible coût de revient,
- permettre une flexibilité dans le design des réseaux microfluidiques, avec, notamment, des intersections,
- garantir une biocompatibilité satisfaisante

Pour répondre au mieux à ces besoins, diverses approches ont été mises en œuvre avec des procédés originaux. Les critères visés ont été atteints de manière satisfaisante, puisque les dispositifs peuvent être fabriqués aisément et rapidement (48h au maximum). La figure 1-74 en page suivante synthétise nos approches et nos résultats.

Stratégie 1

Des filets d'alginate solidifiés sont fabriqués par écoulement à la seringue d'une solution d'alginate de sodium dans une solution de sulfate de zinc sous agitation

- Un réseau de canaux est créé manuellement
- Du PDMS liquide est versé et laissé à réticuler à température ambiante

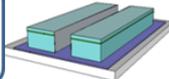


Stratégie 2

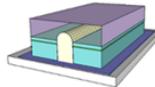
Sur un wafer de silicium:
 • Une épaisseur de PDMS de 140 µm est déposée par spin coating puis réticulée par recuit
 • Un dépôt de CHF₃ est réalisé
 • Une épaisseur de PDMS de 10 µm est déposée par spin coating et recuite



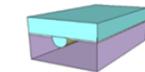
Des couches provenant de l'étape 1 sont découpées et reportées sur une surface de silicium recouverte d'OTS uniformément dégradées (angle de contact final 80°)



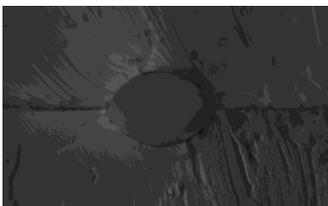
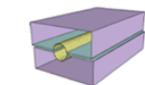
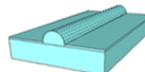
- Les sillons sont remplis avec de l'alginate de sodium
- Du PDMS liquide est délicatement versé par dessus et laissé à réticuler à température ambiante



- Le PDMS précédemment réticulé est démoulé
- Un nouveau dépôt de CHF₃ est effectué
- Du PDMS liquide est versé afin de créer un contre-moulage, et est laissé à réticuler à température ambiante



- Le contre-moule en PDMS est démoulé
- Un nouveau dépôt de CHF₃ est effectué sur le contre-moule
- Du PDMS liquide est versé afin de créer la seconde partie du futur dispositif, et est laissé à réticuler à température ambiante
- Enfin, les deux parties du dispositif sont alignées et scellées



Stratégie 3

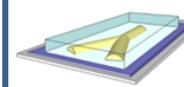
Sur un wafer de silicium:
 • un dépôt de CHF₃ est réalisé



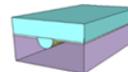
La surface d'OTS précédente est dégradée localement par plasma UV/Ozone à travers un masque



De l'alginate de sodium est déposé sur les motifs. Du PDMS liquide est déposé délicatement par-dessus, et est laissé à réticuler à température ambiante



- Le PDMS précédemment réticulé est démoulé
- Un dépôt de CHF₃ est effectué
- Du PDMS liquide est versé afin de créer un contre-moulage, et est laissé à réticuler à température ambiante



Le contre-moule en PDMS est démoulé

- Un nouveau dépôt de CHF₃ est effectué sur le contre-moule
- Du PDMS liquide est versé afin de créer la seconde partie du futur dispositif, et est laissé à réticuler à température ambiante
- Enfin, les deux parties du dispositif sont alignées et scellées

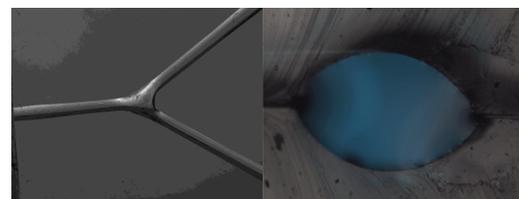
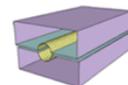
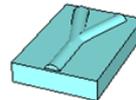


Fig 1-74 : Résumé des procédés de fabrication et des structures obtenues.

Par ailleurs, les principales caractéristiques des canaux présentés dans la littérature sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Technique ^{ref}	TCA du canal en degrés	Largeur typique (µm)	Forme du canal
Lithographie⁸	70	500	droit
Photocopie ²¹	5	180	croix
Shrinky-Dink impression ²²	20	200	double Y
Laser ¹⁷	45	400	droit
Couche liquide de PDMS³²	rond	300	droit
Membrane de PDMS ²⁸	43	400	droit
Membrane de PDMS ²⁸	25	200	Y
µPLAT ³³	15	900	croix
Gel patterning par shadowmask⁵¹	40	400	serpentin et Y
Notre étude	75	350	droit
Notre étude	55	350	Y

TCA= tangent chord angle

On constate que nos résultats sont satisfaisants au regard des valeurs de TCA qu'il est possible d'atteindre, notamment par usage de la lithographie. De même, nos résultats sont meilleurs que ceux de X.Liu et al. (gel patterning), tout en employant la même idée de base, à savoir la création d'un contraste hydrophile/hydrophobe sur une surface. Les techniques impliquant des dispositifs « actifs » (mise sous pression d'une couche liquide de PDMS) permettent d'atteindre des résultats un peu supérieurs, mais nécessitent plus de matériel.

Enfin, il est possible de compléter le procédé de fabrication, en intégrant des nanoparticules d'or au PDMS avant sa réticulation. Les nanoparticules peuvent être synthétisées directement dans le polymère⁵⁶, ou être ajoutées après avoir été fonctionnalisées (sur le même principe que celui utilisé par K.Y. Lee *et al.*⁵⁷).

On peut alors mettre à profit la propriété de transparence du polymère par l'emploi du dispositif en tant que détecteur colorimétrique. L'analyse des eaux (pollution aux métaux lourds⁵⁸, contamination microbiologique par *Cryptosporidium*^{59,60}) et la détection de molécules biologiques^{61,62} sont deux domaines d'application privilégiés parmi de nombreux autres^{63,64,65}.

La diffusion massive de ces dispositifs (peu coûteux, jetables, et à lecture rapide), qui combinerait PDMS et nanoparticules d'or, permettrait un usage à titre préventif, par exemple dans les pays en voie de développement, dans un but humanitaire.

Simple and low-cost fabrication of PDMS microfluidic round channels by surface-wetting parameters optimization

Magalie De Ville · Philippe Coquet ·
Philippe Brunet · Rabah Boukherroub

Received: 19 August 2011 / Accepted: 2 December 2011 / Published online: 30 December 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Convenient for both biologists and MEMS designers, Polydimethylsiloxane (PDMS) polymer is intensively investigated for its biocompatibility, transparency, high resistance under plasma treatment, flexibility and resistance to high temperature. However, for microfluidic applications, the fabrication of PDMS circular channels is difficult to achieve except by wire moulding. In this article, we present a simple, fast and low-cost fabrication method which can be applied out of clean-room environment. It is based on the deposition of alginic acid sodium salt aqueous solution, enabling the formation of a liquid cylinder on the most hydrophilic part of a hydrophilic/hydrophobic patterned surface. We experimentally studied the interaction between liquid rivulets and surfaces presenting a contrast of wettability and/or a stepwise texture. Subsequent moulding of the half-cylinder of liquid produces round PDMS microfluidic channels. The optimal parameters for hydrophilic/hydrophobic patterns have then been applied to produce the roundest possible channels. The realisation of both straight channels 300–500 μm wide, 1 cm long and 75° tangent chord angle at best, and Y-shaped channels with the same dimensions and 55° TCA is demonstrated.

Keywords Round-channels · PDMS · Alginate · Patterning · Wetting

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10404-011-0929-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. De Ville (✉) · P. Coquet · P. Brunet · R. Boukherroub
Institut d'Electronique, de Microélectronique et de
Nanotechnologie, CNRS UMR 8520, Avenue Poincaré,
59658 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: magalie.de-ville@ed.univ-lille1.fr

1 Introduction

Closed and perfectly circular channels are of great interest for the mimicry of biological systems like vein networks. In this optic the use of a “green” approach is also highly desirable, and the notion of a “single-use” chip is necessarily associated to the requirement of a low-cost process. The circular shape of a microchannel constitutes the optimal condition for the generation of a fixed flow-rate at minimal pressure (Mortensen et al. 2005). Indeed, the pressure required to create a flow at a given rate in a circular channel is minimal, as compared to that in a rectangular channel of similar dimensions. Therefore, the challenge is to design solid channels with a tangent chord angle (TCA) α close to 90° (Fig. 1), by exploiting materials as supports and varying their surface contact angles (SCA).

The TCA tally to the final angle of the solid channel and SCAs tally to the angle θ involved in the Young's relation for a liquid in air: $\cos\theta = (\gamma_s - \gamma_{sl})/\gamma_{lv}$, where γ_s is the surface tension of the solid surface, γ_{sl} is the solid–liquid surface tension and γ_{lv} is the liquid–vapour surface tension.

Furthermore, the versatile and exhaustive fabrication of such channels in various configurations requires processes based on simple and low-cost steps, in the spirit of what we propose in the present study. The fabrication of round channels for microfluidics has recently attracted much attention within a host of different methods described thereafter.

A first approach consists on the generation of solid moulds with a round shape. A conventional way is photolithography: Futai et al. (2004) used a backside diffused light photography strategy combined with small aperture sizes on their photomask to produce 200 μm wide semi-round channels. Wang et al. (2007) have fabricated 500 μm wide and 70° TCA channels using a negative photoresist

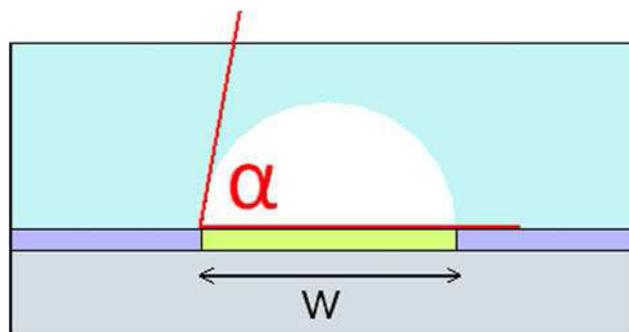


Fig. 1 Sketch of the cross section of a channel. α is the tangent chord angle of the channel, W denotes the width of the inner hydrophilic green domain (SCA 1) compared to the outer hydrophobic purple domain (SCA 2) of the grey supporting material. We have of course $SCA 1 < SCA 2$. The light blue colour corresponds to the final solid channel

(THB 120N from JSR Inc.) with a reflow after development. A positive photoresist (AZ9260, Hoechst) combined to a plasma polymerization technique of tetramethyldisiloxane (TMDS) was employed to create 25 μm wide straight rounded channels (Abbas et al. 2009). Channels of 180 μm width and 5° TCA were successfully obtained by photocopying patterns on a transparency (Tan et al. 2001). The dried ink was used as master to cast the PDMS, which was peeled after curing. A similar method was employed by Grimes et al. (2008). They used a shrinky-dink material which was printed with a LaserJet printer. This material is a retractable plastic sheet, enabling the shrinkage of the ink patterns by baking. Using the pattern of baked ink as master, they obtained 20° TCA for 200 μm wide channels. Independently, straight channels of 400 μm in width and 45° TCA were created by laser patterning onto PMMA (Luo et al. 2007). Channels are formed on PMMA then PDMS is poured to create the counter mould, which can be used several times to create semi-rounded channels. On the other hand, Song et al. (2010) used metal wire moulding technique to form 300 μm wide and perfectly round channels, but without any intersections. The metal was removed by heating.

Another approach is to use the viscous property of liquid PDMS before curing to achieve a coating. By stacking three layers of PDMS, keeping the interlayer in the liquid state, and the upper layer with a 300 μm wide squared channel, a meniscus was formed and gave rise to a semi-rounded channel (Lee et al. 2007). Abdelgawad et al. (2010) used straight-squared channels of PDMS, filled with liquid PDMS and they injected an air stream to produce 100 μm wide round channels with a maximum length of 16 cm. The round-shaped deformation of the PDMS membrane obtained under pressure was used to prepare 400 μm wide straight channels and 200 μm wide Y-shaped channels with 43° and 23° TCA, respectively (Hongbin

et al. 2009). Using the similar membrane technique, Kang et al. (2010) elaborated SU8 moulds and achieved channels of TCA larger than 70°, but with a width larger than 600 μm . Other strategies rely on the local modification of the surface wetting properties, on which a half-cylindrical rivulet of liquid eventually utilized as a mould can be formed, tailored and maintained. Typically, a 3D profile or a 2D stripe zone with higher surface energy, on the substrate, can help to prevent the pinch-off or the formation of bulges on such rivulets that would occur otherwise as the consequence of a capillary-originating instability (Lenz 1999; Brinkmann and Lipowsky 2002; Brinkmann and Blossey 2004; Speth and Lauga 2009). For example, West et al. (2007) used microplasma patterning of glass surfaces modified with dichlorodimethylsiloxane giving rise to flat aqueous liquid straight or Y-shaped patterns. In the same way, local degradation of PDMS by O_2 exposure using microscale plasma activated templating technique (μPLAT) provided 900 μm wide channels with 15° TCA after PDMS curing (Chao et al. 2007). Liu et al. (2009) prepared surfaces carrying out hydrogel patterns by UV lithography. Glycerol deposition is then made as liquid mould and PDMS is poured over it and cured. By this way, they have reached 20° TCA for 200 μm wide channel and 40° TCA for 400 μm wide channels for serpentine and Y shapes. Finally, some groups tried to directly etch PDMS, but this material is robust against chemical etching (Garra et al. 2002).

From these results, it is obvious that the preparation of PDMS round channels is a real challenge. The reported methods require sometimes sophisticated equipment and several steps. In the present work, we propose a simple and low-cost method to produce PDMS round channels, combining together previously reported techniques, but also differing from them by limiting both the number of time-consuming steps and the use of multi-specific equipments. Our method can be used in any lab without the need for clean-room facilities. It is based on the optimization of the wetting parameters to produce hydrophobic/hydrophilic steps for the channel pattern definition together with the use of alginate sodium salt aqueous solution. The specific properties of the alginate solution are an asset for damping interfacial instabilities and for producing the master for PDMS moulding.

Using this method we have realized two types of samples. In the first one, the channel pattern is defined as a three-dimensional (3D) structuration with stepwise variations of SCA, while in the second one, octadecyltrichlorosilane (OTS)-coated surfaces are degraded by UV in order to achieve a bi-dimensional pattern of stepwise-varying SCA. The choice between those two processes is done according to the final shape desired for the channels.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and instruments

PDMS was purchased as Sylgard 184 from Dow Corning and prepared at classical ratio 10:1 (base:curing agent).

Isopropanol, methanol, acetone, alginic acid sodium salt A0682 powder and OTS (octadecyltrichlorosilane, 95%) were supplied from Sigma-Aldrich. One side polished *n*-type Si(100) ($5\text{--}10\ \Omega\ \text{cm}^{-1}$) wafers provided by Siltronix were used as substrates.

Oxford Plasmalab 80+ was used for a very clean and precise deposition of 100 nm thick CHF_3 layers. The following conditions were used: exposure time 25 min, power 250 W, pressure 40 mT, gas flow 30 sccm. The use of this equipment is not necessarily required, as a simple “Teflon spray” gives also quite good results.

UVO cleaner 42 (500 W mercury lamp, 253 nm UV radiation, Jelight Company Inc., USA) was used for OTS layer degradation. After 5 min irradiation, the SCA decreased from 105° to 80° .

Glovebox (PLAS-LABS type) was used for the thorough deposition of octadecyltrichlorosilane (OTS) in nitrogen atmosphere.

GBX Digidrop with CCD camera and image analysis software (ImageJ) allow the visualization of the wetting properties of the different materials by SCA measurements.

Syringes with 30G needles enable alginic acid sodium salt solution deposition.

2.2 Experimental methods

In this section, we present the two processes we developed to render possible the fabrication of round channels networks with a minimum of easily accessible equipments, a minimum of time and limited steps. Our results show that this goal is possible to reach by combining the existing techniques presented in our introduction.

Our specifications were:

- To obtain the roundest mould possible with various shapes.
- To use the viscous properties of liquids.
- To locally modify the surface wetting properties combined with a 3D structuration or a 2D stripe zone on the substrate.

Thus, let us first remind the definition of wetting properties in Fig. 2:

2.2.1 First attempt: direct degradation of PDMS

In order to produce channels with a large TCA α value, the wettability contrast between the outer (θ_{outer}) and the inner

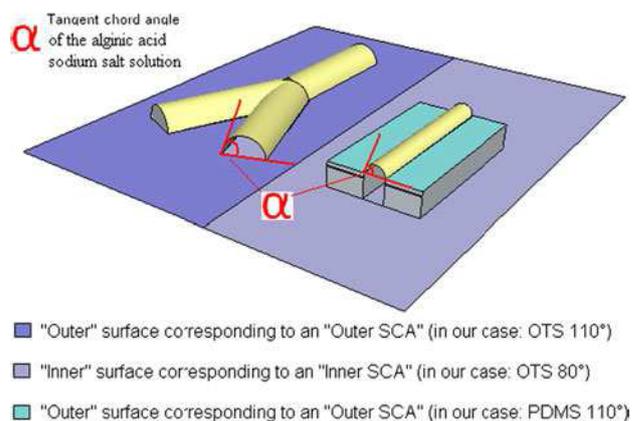


Fig. 2 Definition of the surface wetting properties

(θ_{inner}) angles was optimized. We firstly tried a method to control the surface contact angle steps by exposure of PDMS substrates to O_2 plasma through shadowmasks. This was mainly motivated by the simplicity of the method previously reported by Chao et al. (2007). They used microscale Plasma Activated Templating technique to create patterns on a planar PDMS surface which is locally completely degraded. There was no attempt to control the inner angle or to investigate the hydrophilic/hydrophobic contrast for the channel definition. Furthermore, their liquid mould was made of water, which led their experiments to flat channels (TCAs $\sim 5^\circ$). In our experiments, to control the inner angle, the PDMS film was exposed to O_2 plasma through a shadowmask. We varied the pressure, power and time (Supporting information can be obtained from the authors) to obtain channels with TCAs from 5° to 49° . However, we have found that this method was not easily reproducible, and we have encountered similar problems of mould flattening as in Chao et al. (2007): water gives a good TCA before pouring PDMS (around 80°), and gives a final TCA of 49° (at best, as mentioned above) for the channel after demoulding, which means a decrease of 37%. Thus, we did not carry on this method further.

Our strategy has been then to work with hydrophobic surfaces; the initial coating with OTS is eventually degraded using UV/Ozone for an accurate control of both inner and outer angles.

2.2.2 How to choose the liquid for the mould?

The physical and chemical properties of the liquid serving as mould are crucial for the optimization of the quality, stability and geometrical features of the final channel.

First, a few attempts with alternative liquids were made. Water is easy to manipulate, as capillarity directs the liquid flow on the hydrophilic patterns, but the TCA of the liquid cylinder is hard to control due to fast evaporation of the

small volume involved. Moreover, the overflowing outside the patterns happens easily. In order to preserve the high TCA when the liquid PDMS is poured, gelatine and agarose aqueous solutions were also investigated. These liquids display a high density, a high viscosity, and are easily turnable from liquid to solid. However with these liquids, the main drawback is the required temperature to maintain them in the liquid state (45°C for gelatine, and 85°C for agarose), which renders difficult the deposition by syringes or capillaries.

Another reminiscent issue for liquid moulding as exposed before is the flattening during the subsequent moulding step. We have used three liquids: water, glycerol, and sodium alginate, with the properties shown in Table 1.

Our initial idea was to use a highly viscous liquid, keeping the surface tension relatively high, in order to damp the influence of external mechanical perturbations that would initiate interface instabilities. Also, glycerol and alginate are non-volatile liquids compared to water.

Assuming that the flattening could be partly due to the Rayleigh–Taylor instability (Piriz et al. 2006), the choice for the denser glycerol would be natural. This instability happens when gravity is acting on two fluids of different densities, with the denser fluid being above a fluid of lesser density. The possible consequences are that the denser liquid will replace the light one, or a mixing between the two liquids will occur. However, it turns out that the lighter sodium alginate gives the best results in terms of mould robustness against flattening.

By trying to understand this surprising result, we have noticed that a solid protective shell is formed by this liquid at the interface with PDMS, especially when the curing process is accelerated by heating at 50°C. This shell seems to resolve the evaporation problem encountered with water and it increases the crush resistance of the alginic acid sodium salt solution. Thus it permits the channel fabrication with a TCA decrease of 10° (12%) at the worst, after pouring the PDMS (Fig. 11). Therefore, the choice of sodium alginate is optimal to keep a weak flattening.

2.2.3 Ways of fabrication

Resulting from those ideas and observations, we have elaborated two fast and simple protocols for microfluidic devices fabrication.

Table 1 Liquid physical properties

Liquid	Density (g cm ⁻³)	Viscosity (Pa s)	Surface tension (N m ⁻¹)
Glycerol	1.261	1.412	0.065
Sodium alginate	1.0072	1.642	0.075

OTS-terminated silicon surfaces used for our local modification of the surfaces wetting properties were prepared as follows: first, the wafers were oxidized during 30 min using UV/Ozone and then immersed in 5×10^{-3} M OTS/hexane solution for 4 h at room temperature. The resulting surfaces display a water SCA of 110° and a relatively low-hysteresis of about 10° to 15° (Coffinier et al. 2007).

2.2.3.1 Process I: realisation of straight channels For this first method, the patterning was achieved by cutting out rectangular stripes of PDMS coated with CHF₃ and by reporting them onto uniformly degraded OTS surface (SCA = 80°). These stripes are used for 3D structuration of straight channels, and are constituted of alternated layers of PDMS and CHF₃. They are prepared on preliminary wafers using a spin coating equipment, before their cut and their transfer, as shown in Fig. 3a. The thickness is controlled through the usual parameters: speed and time of rotation, according to Fig. 3b. The CHF₃ layer enables passivation and detachment of PDMS from wafers as well as layers separation.

The transfer of layers on the OTS-coated surfaces was made using a blade to cut up a straight channel in a full strip, removing the exceeding using tweezers. Figure 4 illustrates the patterning process leading to straight channels:

Our choice to create stacks of PDMS and CHF₃ layers is motivated by the ability to remove the effect of the height of the PDMS steps after moulding as explained later.

2.2.3.2 Process II: realisation of channels with cross-links For this second method, patterning was performed through a shadowmask to locally degrade OTS layer using UV/O₃ treatment. This method enables to obtain a pattern with a more complex geometry compared to process I.

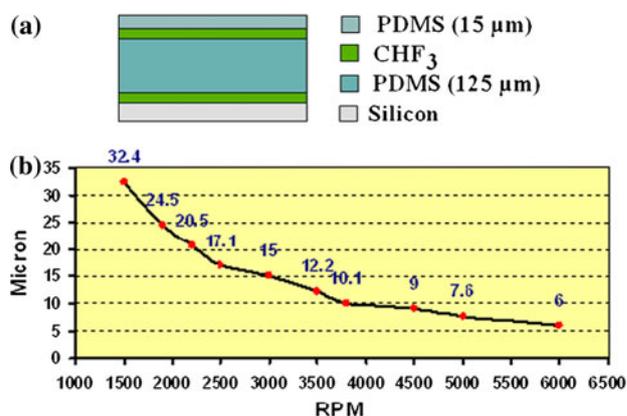


Fig. 3 a PDMS and CHF₃ layers, deposited on a silicon substrate, used for the process I, b parameters for thin PDMS layers deposition

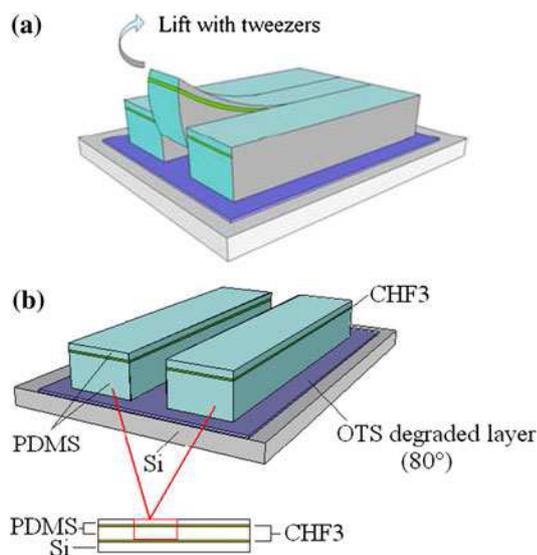


Fig. 4 Process I using layers patterning on OTS-terminated silicon substrate uniformly degraded ($SCA = 80^\circ$) by (a) reporting PDMS/CHF₃ stacks, b blade cutting and lift with tweezers

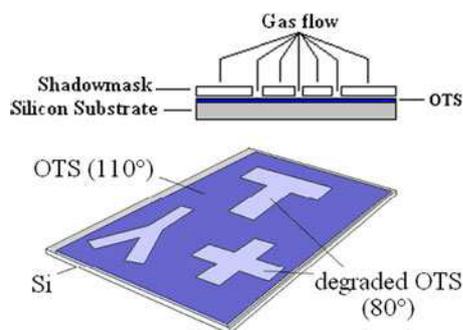


Fig. 5 Schematic illustration of OTS patterning using a shadowmask for process II

Shadowmasks were designed using clewin3 software, and used to create hydrophobic/hydrophilic contrast on the OTS-terminated surfaces as shown in Fig. 5.

For convenience we have fabricated the shadowmask using clean room facilities, but they can be produced at low cost using mechanical manufacturing.

The fabrication of the shadowmask involves aluminium deposition by cathodic pulverization on a wafer followed by AZ1518 resist spin coating (4,000 rpm, 8 s), a pre-baking during 60 s at 110°C, exposure to UV light through a chromium-glass mask and post-baking. The resist is revealed in a AZ726 remover bath. The Al layer is locally etched by orthophosphoric acid and final silicium drilling is achieved by deep ICP-RIE etching using SF₆/O₂ mixed gas (Bosch process). These shadowmasks are completely reusable.

Once the pattern is defined using one of the two methods described above, the channels (Process 1) or the

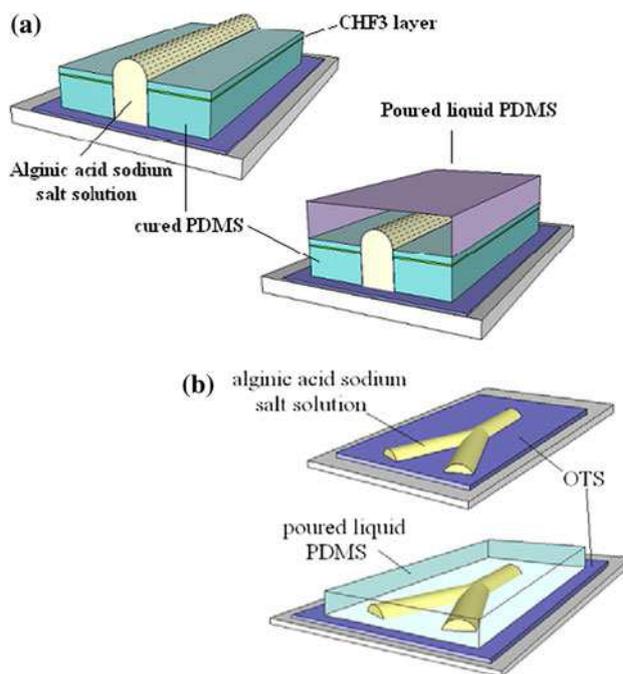


Fig. 6 a Semi-channel formation using the process I, b semi-channel formation using the process II

hydrophilic stripes (Process 2) are filled (Fig. 6a, b) with an aqueous solution of alginic acid sodium salt. Eventually, PDMS is then slowly poured on the rivulets, and dried at room temperature.

For channels with D as thickness of the 3D structuration layer and W as width, it must be mentioned that without the PDMS/CHF₃ stacks, the profile shown in Fig. 7 can be obtained, leading to an error of $[(2 \times D)/W] = 61\%$ on the roundness of the channel. With our method, only 10 μm of PDMS are left on each part of the channel, so the error at the end of the process never exceeds 5%.

The liquid deposition of alginate is realised manually using 30G syringes, using “drop by drop” deposition method. The aqueous solution is prepared by dissolving 6 g of alginic acid sodium salt powder in 300 mL of DI water leading to the following measured values: a density of 1.0072 g cm⁻³ and a kinematic viscosity of 1,630 cSt (or a dynamic viscosity of 1.642 Pa s).

When a semi-channel is obtained, it is then used to create a replica in two different ways: (a) cast again alginic acid sodium salt solution and recover with liquid PDMS,

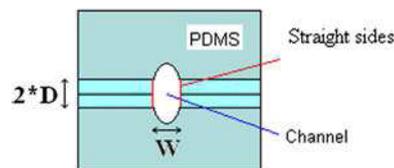


Fig. 7 Channel processed without the PDMS/CHF₃ stacking method

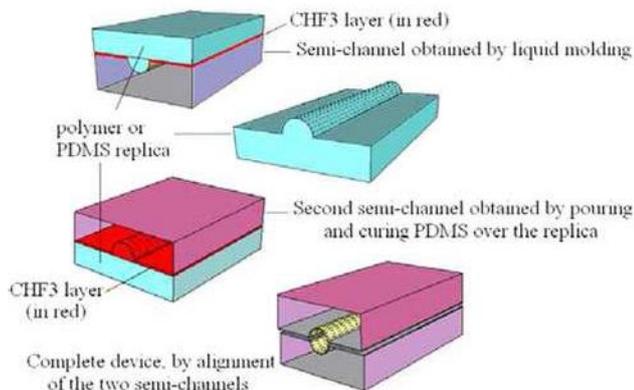


Fig. 8 Channel replication

(b) deposit CHF_3 as an anti-adhesive layer on the semi-channel and use PDMS or another more hard-wearing polymer to create a reusable negative mould.

Successive mouldings are performed at room temperature. If a residual film of dried alginic acid sodium salt is found on the cured PDMS, it is easily mechanically removed, but can also be dissolved using citrate aqueous solutions. It can also be let in place, and be used as bio-compatible coating.

At the end, the two parts are exposed to O_2 plasma, aligned under a microscope with help of methanol, and pressed together to form the channel.

Figure 8 schematically depicts the second technique:

3 Results and discussion

From the results reported in the literature, photolithography (Wang et al. 2007) provides very good results (70° TCA, $500\ \mu\text{m}$ wide channels). Original techniques such as photocopying (Tan et al. 2001) or metal wire moulding (Song et al. 2010) give either low TCA (5°) or channels without junctions. In the present study, we propose to go further by experimentally analysing the links between the four main key parameters that we had identified in order to get large TCA values: (1) the choice of the liquid for the mould, (2) the aspect ratio between channel's height and width, (3) the value of the inner SCA, (4) the volume of the liquid deposited in the channel.

These analyses gave rise to two simple fabrication methods of closed round microchannels with various shapes and dimensions, with results at the state of art level.

Below we show two pictures of the straight channels obtained using process I. The channels produced have a length of 1.5 cm.

Figure 9 shows the channel before PDMS pouring onto the alginic sodium salt rivulet, while Fig. 10 illustrates the channel after the liquid moulding, but before the peeling of

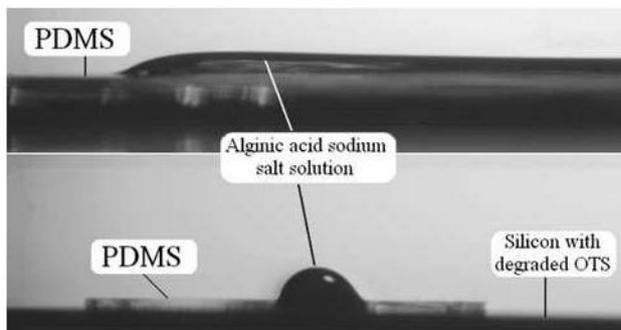


Fig. 9 The meniscus shape of alginic acid sodium salt solution rivulet before PDMS pouring

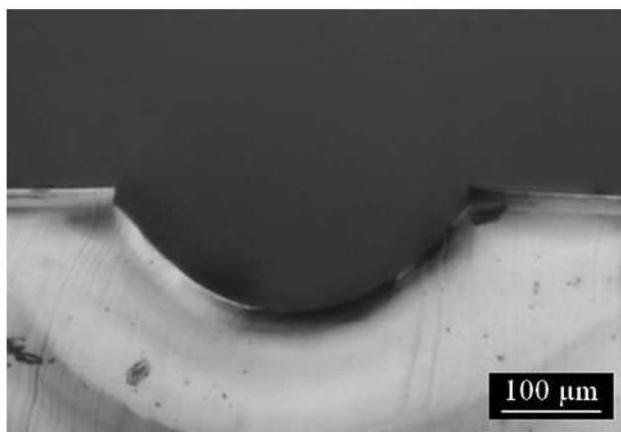


Fig. 10 Front view of a 65° TCA, $350\ \mu\text{m}$ wide straight half-channel

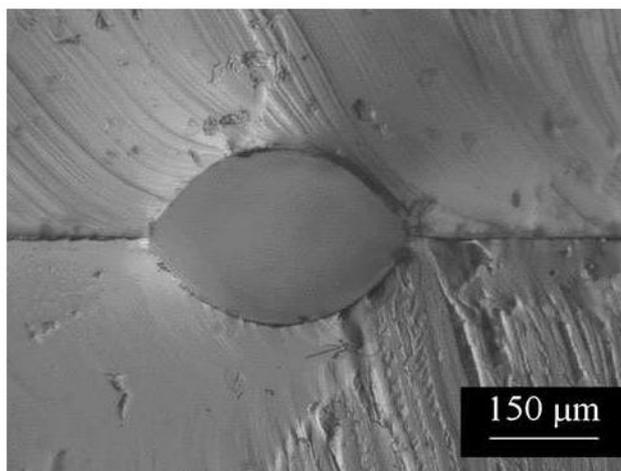


Fig. 11 Front view of a 75° TCA, $350\ \mu\text{m}$ wide straight and closed channel

the straight sides. Figure 11 depicts a sealed channel with a TCA of 75° .

The second process based on OTS degradation through a shadowmask enables to vary more easily the shape of the

channels. Conditions on the volume deposited and inner angle values are the same as for the process I.

However, for the straight and Y-shaped channels, the control of the gradient between the “outer” and “inner” angles is more difficult due to the substrate and shadow-mask sensitivity to superimposition. Indeed, blurred patterns cannot be tolerated.

The results obtained with process II are then less impressive than those obtained with the process I, giving 55° as the best measure, and at the best, branches of 1 cm long. Figure 12 displays optical images of the same Y-shaped channel at various steps of fabrication: (a) image of a semi-channel, (b) channel sealed and filled with a blue ink.

3.1 Aspect ratio

Seemann et al. (2005) have demonstrated that rivulets shape and behavior depend on aspect ratio parameter between channels height and width. Their study consisted in a 3D structuring with the same SCA between the top and

bottom of a channel (same “inner” and “outer” angles). They have investigated theoretically the morphology of liquid rivulets as a function of the channel aspect ratio X (defined as depth on width, $X = D/W$) and SCA (which was varied from 5° to 80°), and obtained a diagram determining the behavioral zones (bulge, rivulet, concave meniscus) of liquid on the surface. This diagram was adapted for the present work to optimize the processes (see Sect. 3.2 below).

To create straight channels, PDMS stripes of approximately $140\ \mu\text{m}$ in thickness were used, with the aim to fabricate $300\ \mu\text{m}$ wide channels. These values led to an aspect ratio of $X = 140/300 = 0.46$ and a maximum TCA $\approx 82^\circ$ has been measured after moulding. Important care has been devoted to preserve the PDMS flatness during the spin coating of the wafers and reporting of layers. Indeed, it has been observed that a deflection larger than 5% leads to process failure (see supporting information figure S1 for definition of the deflection notion).

3.2 Value of the inner contact angle

Concerning the value of the inner contact angle, the choice to use uniformly degraded OTS (80°) is dictated by the empirical law $\alpha_F = \theta + 90^\circ = 180^\circ$ reported by Seemann et al. (2005) to describe the “fattest” rivulet that can be obtained in their (F+) regime (liquid filaments without wedges). In this equality, the α_F corresponds to our TCA plus 90° , and θ corresponds to their uniform SCA. Then, the condition to get the “fattest” rivulet in their study is obviously to have SCA value $\theta = 90^\circ$. However, our experimental tests revealed that the results are better if the angle chosen is slightly smaller than this limit. Thus we used degraded OTS layers with a SCA of 80° .

3.3 Relation between aspect ratio and inner contact angle

We have experimentally investigated the liquid rivulets formation for aspect ratios varying from 0.1 to 0.5 and inner angles from 30° to 90° . Figure 13 exhibits the measured TCA of the rivulets after the complete fabrication of a straight channel as a function of the inner angle and aspect ratio (the inner angle is known before alginate sodium salt solution deposition and the outer angle is always 110°). From this figure, we can deduce that:

1. for a high inner angle ($>60^\circ$) and an aspect ratio higher than 0.15, the TCA values for the channels range from 65° to 75° , which corresponds to fairly round channels. Compared to the previous attempts with liquid moulds (Tan et al. 2001; Grimes et al. 2008; Chao et al. 2007; Liu et al. 2009), the performance here represents a step forward.

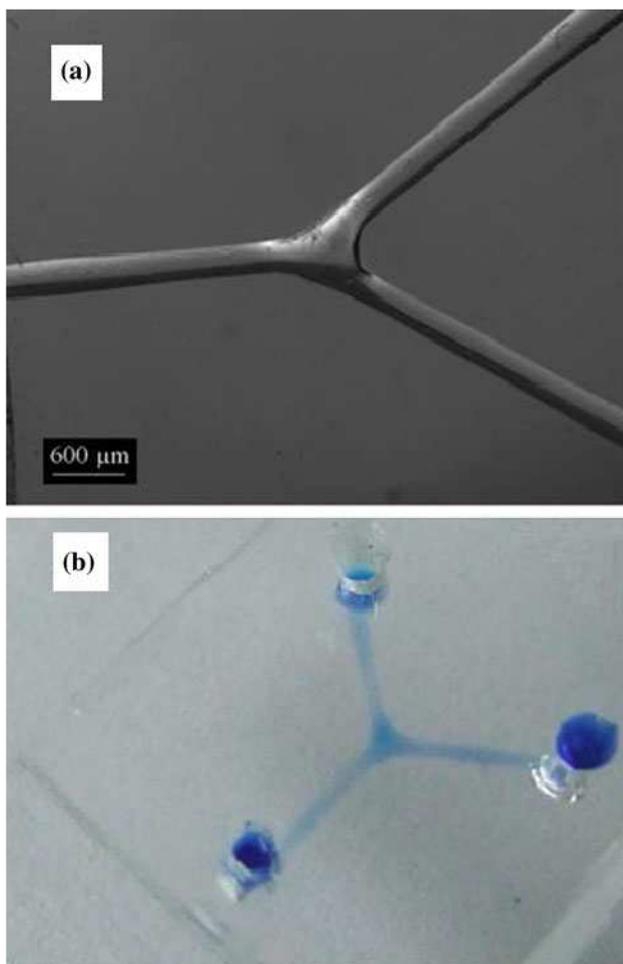


Fig. 12 Y-shaped $350\ \mu\text{m}$ wide channel

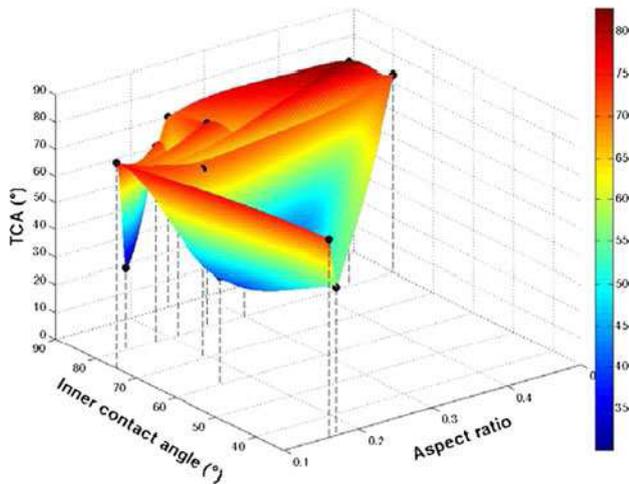


Fig. 13 Channel TCA as a function of the inner angle and aspect ratio of the channel (for more details see supporting information Table S2)

- for an inner angle below 60° and/or an aspect ratio lower than 0.15 or higher than 0.5, the conditions are pretty unstable, and the channels have lower TCA values.

All the behaviors theoretically predicted by Seemann et al. (2005) for very small channels were experimentally identified, even if our channels are about 10 times bigger than theirs. However, the range of parameters of our curves by superimposition on their “phase diagram” is slightly different. It can be explained as the consequence of the main difference between our experimental conditions and the frame of their theory: we used different “outer” and “inner” angles between the top and bottom sides of the channels (as defined in Fig. 2) while they have the same value for both contact angles (no wetting contrast), and we used alginic acid sodium salt solution to create the rivulets while they used liquid structures created by vapour condensation of polystyrene.

3.4 Volume of liquid

Another important parameter is the volume of liquid deposited in the channels. Darhuber et al. (2000) showed that there is a link between the volume of liquid on the hydrophilic stripe and a “bulge” state. They have proposed an inequality (Eq. 1) to evaluate the maximum of volume to deposit, and demonstrated that the control of SCA contrast (between the “outer” and “inner” angles) is crucial to avoid the rivulet overflow. Here, V is the volume of liquid deposited on the pattern, l and w are, respectively, the length and the width of the pattern, and α is the rivulet TCA.

$$\frac{V}{l} < \frac{w^2}{4\sin^2\alpha} \left(\alpha - \frac{1}{2} \sin^2\alpha \right) \tag{1}$$

In our case, the TCA of the liquid cylinder is controlled by the volume of the liquid deposited. The maximum volume is limited by the bulge formation, as demonstrated before (Gau et al. 1999; Lipowsky 2001; Lipowsky et al. 2005a, b).

Figure 14 exhibits a bulge, which appears in a microchannel if a large amount of liquid is deposited.

The maximum volumes which can be deposited into the channels, depending of their characteristics (width, length, SCA) have been measured and calculated using Eq. (1). The comparative results are given in Table 2.

We noticed that the volume of alginic acid sodium salt solution initially deposited is larger, approximately twice, than the volume predicted by Darhuber et al. (2000) as shown in Table 2. It can be explained by the differences between the methods and the experimental conditions employed.

To create straight channels with high TCA values, we took advantage of the bulge formation. The alginic acid sodium salt aqueous solution stripe is achieved by gently adding liquid until the bulge begins to form. Then, as the volume involved is small, evaporation occurs. A camera is used to visualize the bulge appearance and disappearance. Then the rivulet mould is covered with PDMS at the time corresponding to the disappearance of the bulge, when the rivulet becomes stable again.



Fig. 14 Bulge formation in a microchannel

Table 2 Liquid volume’s to deposit in the channels, according to Darhuber et al. formula, to avoid overflow

Channel width (μm)	Channel length (μm)	Theta (°) from Eq. (1)	Volume from Eq. (1) to deposit (μL)	Real volume deposited (μL)
200	5,000	55	0.036	0.08
		80	0.063	0.13
	10,000	55	0.073	0.17
		80	0.13	0.25
400	5,000	55	0.15	0.27
		80	0.25	0.50
	10,000	55	0.29	0.55
		80	0.5	0.90

4 Conclusion

We have optimized the morphology of a liquid rivulet at steps edges by controlling the wetting state. Circular microchannels ranging from 300 to 500 μm in diameter have been fabricated, with a TCA of 75° for straight channels and 55° for the Y-shaped ones. The processes proposed in this study offer several advantages: (1) they can be operated at ambient temperature, (2) they are adapted to tailor channels into soft and biocompatible materials like PDMS, (3) the processing onto various substrates (glass...) is possible, (4) they are achievable with simplicity, cheapness and rapidity (completed within a few hours), (5) quantitative results are at the state of the art, and (6) only basic equipments are required.

We believe that the technique reported in this work is useful for many microfluidic applications (their roundness reduce the fluid strengths of friction) such as cells separation/distribution.

References

- Abbas A, Supiot P, Mille V, Guillochon D, Bocquet B (2009) Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized TMS for fluidic MEMS technology. *J Micromech Microeng* 19:045022
- Abdelgawad M, Wu C, Chien WY, Geddie WR, Jewett MAS, Sun Y (2010) A fast and simple method to fabricate circular microchannels in polydimethylsiloxane (PDMS). *Lab Chip* 11:545–551
- Brinkmann M, Blossey R (2004) Blobs, channels and “cigars”: morphologies of liquids at a step. *Eur Phys J E* 14:79–89
- Brinkmann M, Lipowsky R (2002) Wetting morphologies on substrates with striped surface domains. *J Appl Phys* 92:4296–4306
- Chao SH, Carlson R, Meldrum DR (2007) Rapid fabrication of microchannels using microscale plasma activated templating (μPLAT) generated water molds. *Lab Chip* 7:641–643
- Coffinier Y, Janel S, Addad A, Blossey R, Gengembre L, Payen E, Boukherroub R (2007) Preparation of superhydrophobic silicon oxide nanowire surfaces. *Langmuir* 23:1608–1611
- Darhuber AA, Troian SM, Miller SM, Wagner S (2000) Morphology of liquid microstructures on chemically patterned surfaces. *J Appl Phys* 87:7768–7775
- Futai N, Gu W, Takayama S (2004) Rapid prototyping of microstructures with bell-shaped cross-sections and its application to deformation-based microfluidic valves. *Adv Funct Mater* 16:1320–1323
- Garra J, Long T, Currie J, Schneider T, White R, Paranjape M (2002) Dry etching of polydimethylsiloxane for microfluidic systems. *J Vac Sci Technol A* 20:975–982
- Gau H, Herminghaus S, Lenz P, Lipowsky R (1999) Liquid morphologies on structured surfaces: from microchannels to microchips. *Science* 283:46–49
- Grimes A, Breslauer DN, Long M, Pegan J, Lee LP, Khine M (2008) Shrinky dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded channels. *Lab on a Chip* 8:170–172
- Hongbin Y, Guangya Z, Siang CF, Shouhua W, Feiwen L (2009) Novel polydimethylsiloxane (PDMS) based microchannel fabrication method for lab-on-a-chip application. *Sens Actuators B* 137:754–761
- Kang E, Shin SJ, Lee KH, Lee SH (2010) Novel PDMS cylindrical channels that generate coaxial flow, and application to fabrication of microfibers and particles. *Lab Chip* 10:1856–1861
- Lee K, Kim C, Shin KS, Lee J, Ju BK, Kim TS, Lee SK, Kang JY (2007) Fabrication of round channels using the surface tension of PDMS and its application to a 3D serpentine mixer. *J Micromech Microeng* 17:1533–1541
- Lenz P (1999) Wetting phenomena on structured surfaces. *Adv Mater* 11:1531–1534
- Lipowsky R (2001) Structured surfaces and morphological wetting transitions. *Interface Sci* 9:105–115
- Lipowsky R, Brinkmann M, Dimova R, Franke T, Kierfeld J, Zhang XZ (2005a) Droplets, bubbles, and vesicles at chemically structured surfaces. *J Phys Condens Matter* 17:S537–S558
- Lipowsky R, Brinkmann M, Dimova R, Haluska C, Kierfeld J, Shillcock J (2005b) Wetting, budding, and fusion—morphological transitions of soft surfaces. *J Phys Condens Matter* 17:S2885–S2902
- Liu X, Wang Q, Qin J, Lin B (2009) A facile “liquid-molding” method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography. *Lab Chip* 9:1200–1205
- Luo LW, Teo CY, Ong WL, Tang KC, Cheow LF, Yobas L (2007) Rapid prototyping of microfluidic systems using a laser-patterned tape. *J Micromech Microeng* 17:N107–N111
- Mortensen NA, Okkels F, Bruus H (2005) Reexamination of Hagen-Poiseuille flow: shape dependence of the hydraulic resistance in microchannels. *Phys Rev E* 71:057301
- Piriz AR, Cortazar OD, Cela JLL, Tahir NA (2006) The Rayleigh-Taylor instability. *Am J Phys* 74:1095–1098
- Seemann R, Brinkmann M, Kramer EJ, Lange FF, Lipowsky R (2005) Wetting morphologies at microstructured surfaces. *Proc Natl Acad Sci* 102:1848–1852
- Song SH, Lee CK, Kim TJ, Shin IC, Jun SC, Jung HI (2010) A rapid and simple fabrication method for 3-dimensional circular microfluidic channel using metal wire removal process. *Microfluid Nanofluid* 9:533–540
- Speth RL, Lauga E (2009) Capillary instability on a hydrophilic stripe. *New J Phys* 11:075024
- Tan AM, Rodgers K, Murrhby JP, O’Mathuna C, Glenmon JD (2001) Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. *Lab Chip* 1:7–9
- Wang GJ, Ho KH, Hsu SH, Wang KP (2007) Microvessel scaffold with circular microchannels by photoresist melting. *Biomed Microdevices* 9:657–663
- West J, Michels A, Kittel S, Jacob P, Franzke J (2007) Microplasma writing for surface-directed millifluidics. *Lab Chip* 7:981–983

Simple and low-cost fabrication of PDMS microfluidic round channels by surface wetting parameters optimization

Magalie De Ville*, Philippe Coquet, Philippe Brunet and Rabah Boukherroub

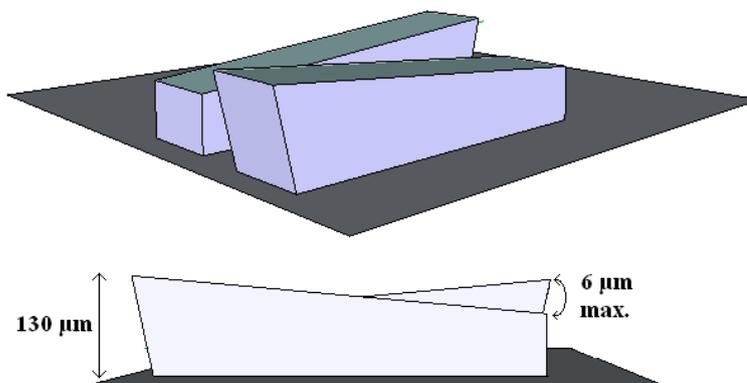


Figure S1: Notion of deflection:

The layer reporting must be realised carefully to avoid a subsidence and to preserve the PDMS flatness. More than 5% of variation render impossible a good deposition of the liquid in the channel, leading to a rivulet breaking or an overflowing.

Table S2. Exemples of combinations for PDMS layers and behaviour noticed for the alginate rivulets

Aspect ratio	Outer angle	Inner angle	Rivulet behaviour predicted by Seemann et al.	contact angle recorded at vertex
0.10	110	75	overflowing	76
0.14	110	80	overflowing	30
0.14	110	140	overflowing	40
0.15	110	140	overflowing	55
0.16	110	33	convexe trickle at edges	73
0.16	110	60	rivulet	40
0.16	110	120	overflowing	40
0.17	110	33	convexe trickle at edges	55
0.18	110	80	overflowing	72
0.19	110	70	rivulet	70
0.19	110	140	overflowing	82
0.21	110	80	overflowing	60
0.25	110	80	rivulet	75
0.25	110	90	overflowing	70
0.26	110	140	overflowing	30
0.30	110	80	rivulet	67
0.30	110	140	overflowing	72
0.44	110	80	rivulet	82
0.50	110	80	rivulet	73

De Ville Magalie
 Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie,
 CNRS UMR 8520
 Avenue Poincaré, 59658 Villeneuve d'Ascq, France
magalie.de-ville@ed.univ-lille1.fr, +33 (0)3 62 53 17 41

Chapitre 2 : Imagerie médicale par rayons X et particules d'or

Introduction

Le chapitre 1 de notre étude visait le développement de canaux micro-fluidiques circulaires à faibles coûts. Les principales applications sont la simulation des systèmes biologiques, comme le systèmes veineux et la création de tests à détection colorimétrique rapides à base de particules d'or. Par suite, afin de poursuivre dans cette même voie, nous avons souhaité déterminer s'il existe une influence de la forme et de la taille de particules métalliques sur le contraste en imagerie par rayons X.

Cette problématique s'inscrit dans une même optique que précédemment : améliorer la détection rapide et précoce, à moindre coût, de pathologies, et notamment des cancers. En effet, la France reste l'un des pays européen dans lequel un niveau de vie élevé (2nd PIB européen en 2011) ne garantit pas l'accès rapide à des techniques de diagnostic performantes (délai d'attente moyen de 30 jours pour un examen IRM en 2013 !).

Afin de compenser ce déficit, un effort peut être réalisé non seulement dans le développement d'équipements plus performants, mais aussi dans le développement de nouveaux agents de contrastes permettant une meilleure précision.

Des études concernant la conception de nouveaux produits de contraste existent depuis de nombreuses années, mais un nouvel essor de la discipline a vu le jour depuis les années 2000 dû à l'engouement pour la production de nanoparticules de toute sorte. L'une des premières publications remarquée dans le domaine des rayons X fut celle de Hainfield *et al.*⁶⁶ en 2004. La génération de particules multimodales pouvant être détectées par plusieurs modalités d'imagerie CT/IRM, CT/optique est également un axe porteur.

Depuis, de nombreuses études ont été menées sur l'utilisation de nanoparticules d'or comme agent de contraste pour de l'imagerie par rayons X, avec pour objectif de remplacer les produits iodés usuellement utilisés⁶⁷⁻⁸⁰.

Dans le cadre de ce second chapitre, nous nous sommes de ce fait tout d'abord penchés sur l'historique général des connaissances concernant les rayons X et leurs interactions avec la matière, puis nous nous sommes intéressés à un phénomène physique qui a fortement influencé notre étude : le phénomène k-edge.

1) Histoire de l'iode, de la découverte des rayons X et de l'imagerie médicale, problématique associée

Les propriétés médicinales de l'iode sont connues depuis des siècles. Une des traces les plus anciennes remonte à 1500 av JC : les égyptiens utilisent empiriquement des remèdes à base de sel pour soigner les goîtres et tentent déjà de les opérer⁸¹.

Bien plus tard, en 1895, Röntgen découvre un rayonnement nouveau, qu'il nomme rayons X. Il crée la radiographie médicale, discipline qui ne cessera d'évoluer (figure 2-1) et d'être améliorée par la suite, notamment grâce aux agents de contraste, dont les composants iodés sont les représentants les plus connus.

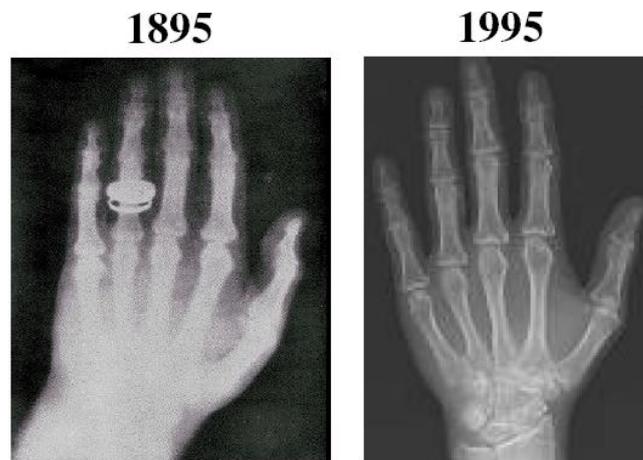


Fig 2-1 : Evolution de la radiographie.

L'amélioration des images obtenues grâce à ces rayons devient un défi scientifique important. Röntgen s'est immédiatement aperçu de la caractéristique phare de ces rayons en imagerie : le contraste repose sur la densité du matériau que l'on image. A cette époque, la connaissance des atomes est encore basique. Le tableau périodique de Mendeleiev, paru en 1870, n'a acquis une certaine reconnaissance que depuis 10 ans.

Les premiers essais d'agents de contraste, y compris à base de micro et nanoparticules ont fait des ravages de toxicité (sels de bismuth⁸², colloïdes et sels d'argent, dioxyde de thorium⁸³, iodures de sodium et potassium). Les agents de contraste présentés dans le tableau suivant (figure 2-2) avaient été choisis expérimentalement, du fait de la facilité de leur fabrication en solution :

Elément	Numéro atomique	Particularités
Le bismuth	Z(Bi)= 83	interdit en France en 1974, et sa nature radioactive a été déterminée récemment ⁸⁴
L'argent	Z(Ag)= 47	les sels précipitent sous l'action des rayons X ⁸⁵ , les colloïdes avaient un usage médical très répandu à l'époque (soins dentaires et ophtalmiques ⁸⁶), et encore de nos jours (désinfection des plaies ⁸⁷)
Le thorium	Z(Th)= 90	utilisé durant de nombreuses années sans que l'on constate immédiatement sa nocivité (scandale du Thorotrast ⁸³) (due, comme pour le bismuth à sa radioactivité)
Les iodures	Z(I)= 53	ils présentaient à la fois une efficacité et une toxicité légèrement moindre

Fig 2-2 : Agents de contraste historiquement utilisés.

II) Contexte actuel en imagerie médicale

Les techniques d'imagerie usuelles sont l'échographie, l'IRM et le scanner. L'IRM est une technique précise mais coûteuse. L'utilisation d'équipements scanner est une alternative possible lorsqu'il n'existe pas de contre-indication pour le patient. Néanmoins, la France accuse un retard global comparativement à ses voisins européens au niveau de son taux d'équipements disponibles, comme le montre la figure 2-3 ci après. Des informations complémentaires sont disponibles en Annexe 2 page 209.

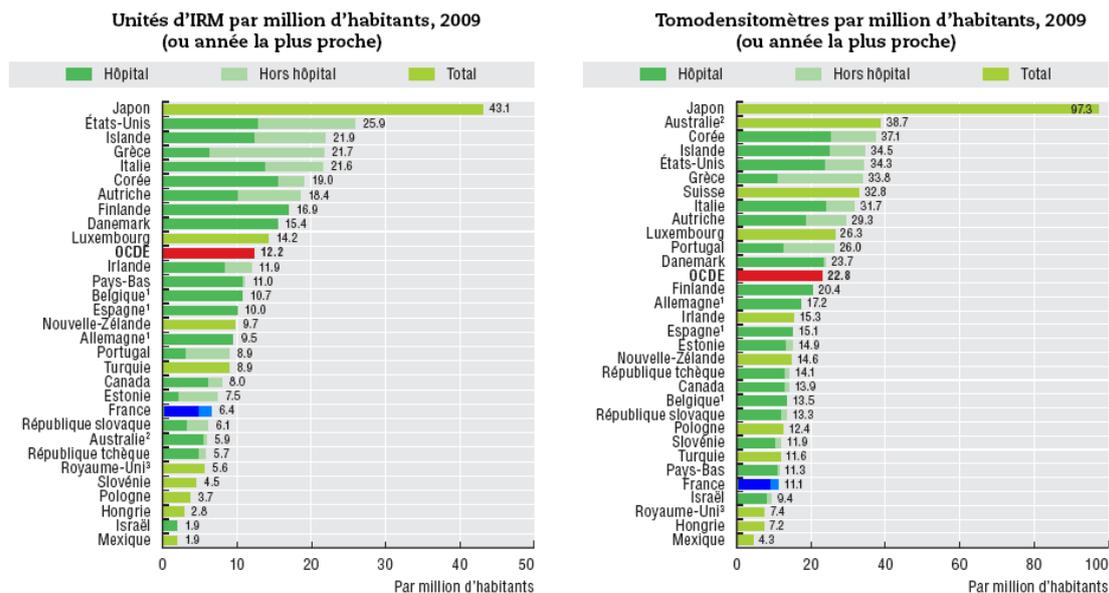


Fig 2-3 : Disponibilités d'équipements IRM et scanner selon les pays. On constate que la France est globalement sous équipée.

Ainsi, si l'IRM est fortement appréciée pour sa netteté d'image (résolution), elle présente deux inconvénients majeurs : le temps d'acquisition des images est lent, et il existe parfois une contre-indication (patient portant des implants métalliques). Les équipements scanner se révèlent donc plus accessibles (en terme de coût et de localisation géographique), mais moins précis.

Par ailleurs, les techniques qui peuvent être employées pour acquérir les images médicales sont aussi nombreuses⁸⁸ qu'il existe de types d'équipement scanner et IRM. En effet, chaque fournisseur (Philips, Toshiba, General Electric, Siemens...) fabrique ses appareils en les dotant de sources et de détecteurs aux caractéristiques diverses et variées⁸⁹, pour des applications biologiques ciblées. Le nombre de combinaisons possibles est dès lors démultiplié. Il en résulte une difficulté dans la comparaison des études menées par les chercheurs, puisque les protocoles sont spécifiques à chaque machine.

Enfin, il existe depuis 10 ans un engouement pour la fabrication de nanoparticules de toutes sortes. Ces particules ont un but thérapeutique, mais doivent également contribuer à l'amélioration du contraste des images médicales^{90,91}.

Le domaine spécifique des particules d'or a ainsi vu le nombre de publications augmenter exponentiellement ces 10 dernières années^{92,93}.

III) Rayons X et équipements d'imagerie moderne

Les rayons X ont un spectre de longueurs d'ondes allant de 0,03 à 10 nm. Ils sont produits dans des tubes spécifiques (figure 2-4), et sont issus de l'interaction entre des électrons accélérés et une anode métallique (souvent en tungstène).

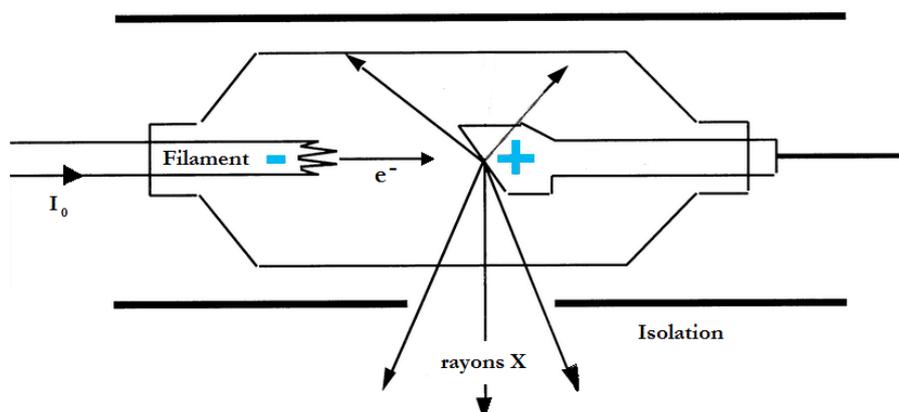


Fig 2-4 : Structure du tube produisant les rayons X.

L'intensité I_0 du courant qui chauffe le filament du tube est proportionnelle à la quantité de rayons X émis. La différence de potentiel appliquée entre le filament et l'anode cible est exprimée en kilovolt (kV). Elle donne aux rayons X leur puissance de pénétration.

On classe de manière générale les rayons X sous trois catégories :

Rayons X 25-50 keV: les rayons mous

Rayons X 60-70 keV: les rayons intermédiaires

Rayons X 100-130 keV: les rayons durs

Il est très important de savoir qu'un tube à rayons X dont on dit « qu'il produit un faisceau à P keV » (exemple ci-dessous en figure 2-5, avec $P = 80$ keV) délivre en réalité tout un spectre dont l'énergie globale (en jaune) est inférieure à l'énergie mentionnée :

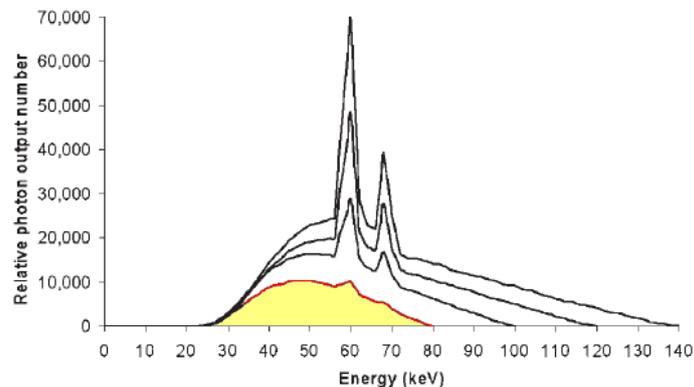


Fig 2-5 : Spectres réels pour une source à anode de tungstène opérant respectivement à 80, 100, 120, et 140 keV ⁹⁴.

Schématiquement, un équipement scanner est constitué de deux éléments : une source de rayons X et un détecteur (figure 2-6). Ceux-ci sont placés l'un en face de l'autre, et de part et d'autre de l'objet à imager. Les photons, émis par la source, qui n'interagissent pas avec la matière, atteignent directement le détecteur.

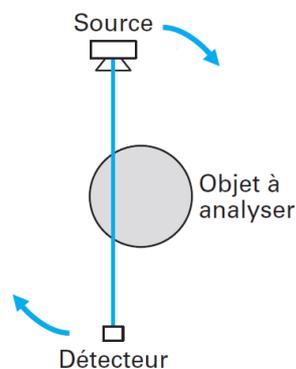


Fig 2-6 : Schéma de principe d'un équipement scanner.

Dans notre cas, obtenir l'accès à un CT-scanner à visée humaine n'a pas été possible. Cependant des équipements de recherche médicale existent pour des études sur de petits animaux. Une collaboration a été mise en place avec la plateforme « Imagerie du Vivant » récemment installée au CHRU de Lille (équipements acquis en 2009 et mis en fonctionnement « ouvert » mi-2010). Cette plateforme dépend de l'IFR 114 via l'Institut de médecine prédictive et de recherche thérapeutique (IMPRT).



Fig 2-7 : μ CT/ μ PET-scanner Inveon Siemens.

L'équipement (figure 2-7) possède une source de rayons X à anode de tungstène, qui fonctionne avec une puissance de 80 W, et dont **l'étendue de réglage en voltage va de 35 à 80 kVp.**

Ce dernier point est fondamental. En effet, afin d'acquérir des images via un équipement scanner et de pouvoir les reconstruire puis les analyser, il faut tout d'abord assigner des valeurs aux deux principaux paramètres de contrôle de la machine, à savoir : la tension et l'intensité des rayons X auxquels on soumet le sujet ou l'échantillon.

Le μ CT-scanner auquel nous avons eu accès au CHRU de Lille est donc pilotable via ce couple [tension-courant] appliqué à la source générant les rayons X. Ce couple de paramètres permet notamment de régler la dose d'irradiation du sujet, en le combinant au paramètre temps. Il est important de souligner le fait que le couple de paramètre [80keV-500mA] est très important puisqu'il fait le lien entre les équipements dédiés aux petits animaux et les équipements utilisés pour l'imagerie du corps humain.

Par ailleurs, ces deux paramètres ont en effet un impact extrêmement important sur l'image finale.

L'image (figure 2-8) ci-dessous extraite de l'étude de A.M. Dion *et al.*⁹⁵ montre que la diminution de l'intensité appliquée pour un voltage donné permet d'affiner l'image (passage de l'image a à l'image b). De même pour la diminution du voltage (passage de l'image a à l'image c) :

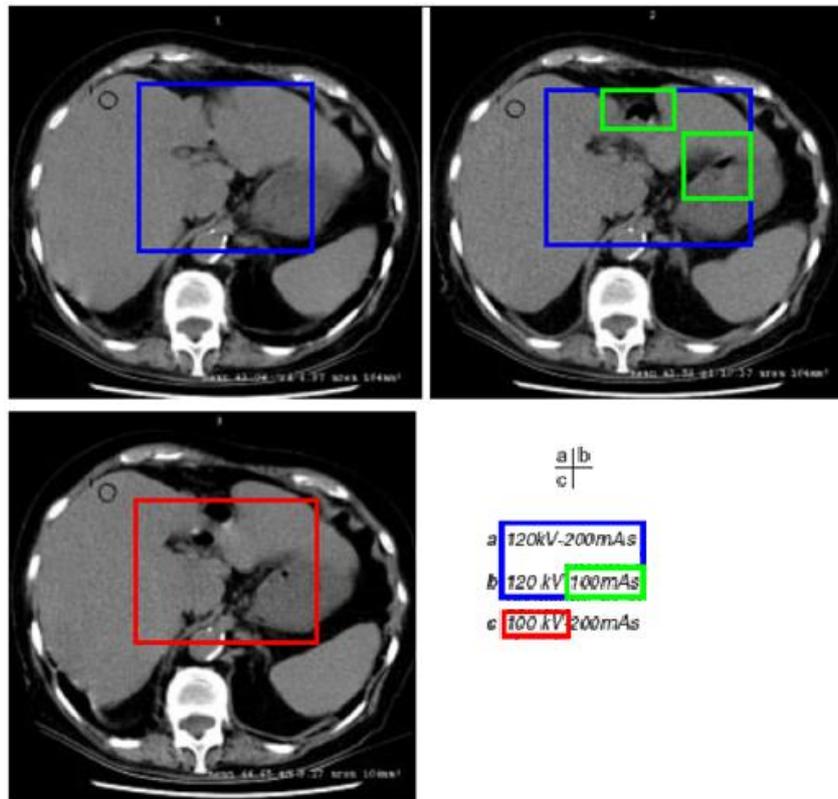


Fig 2-8 : Influence des paramètres de réglage (tension et courant) de l'équipement scanner⁹⁵.

De façon technique, l'intensité électrique détermine l'amplitude du spectre, et donc la quantité de rayons X transmis au patient. Le paramètre tension, lui, affecte la qualité du faisceau de rayons X, puisqu'il détermine l'énergie des photons.

Selon nos propres constatations (figure 2-9), nous avons également remarqué que sur notre μ -scanner un voltage bas a tendance à dilater l'échelle de contraste de nos images :

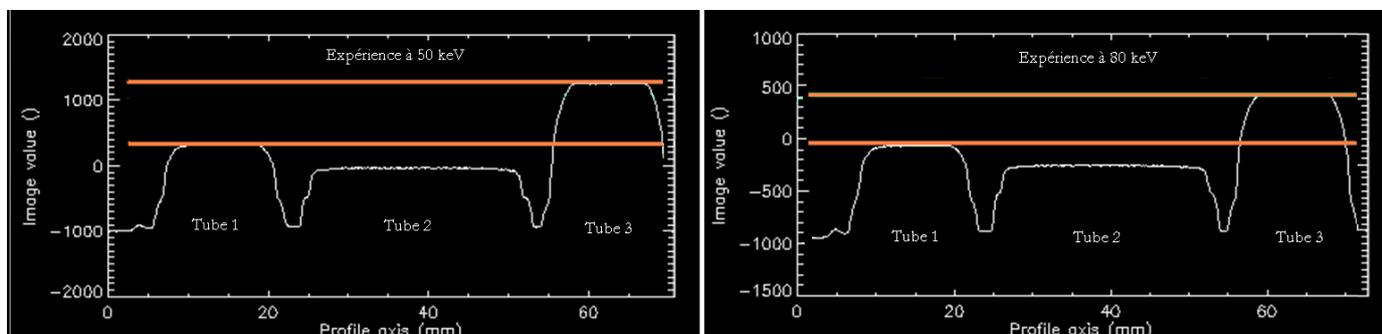


Fig 2-9 : Profil en unité HU de trois tubes selon le voltage appliqué (figure de gauche : 50keV, figure de droite : 80keV). Les tubes contiennent respectivement de l'eau DI additionnée de 1g de NaCl (tube 1); de l'eau DI seule (tube 2); et de l'eau DI additionnée de 3g de NaCl (tube 3).

La détection des rayons X est assurée par une caméra CCD de 125 mm, donnant accès à une image de 3072 x 2048 pixels, soit un champ de vue (field-of-view = FOV) de 8,4 x 5,5 cm. **La précision maximale qu'il est possible d'atteindre dans ces conditions est de 40 μm !**

De plus, certains compromis doivent être faits, puisque la quantité de données à stocker et leur durée d'acquisition et de traitement-machine dépend directement du choix de la qualité de précision souhaitée (trois niveaux sont possibles : faible, moyen, élevé – voir graphique ci-dessous). Il est possible de régler le scanner de manière à optimiser la balance qualité-temps, par l'intermédiaire du paramètre « Binning » :

Le binning est le processus de fusion de plusieurs pixels en un seul mégapixel. Il peut prendre les valeurs 1, 2 et 4. Le facteur de binning 1 n'applique pas de binning, tandis qu'un facteur de binning de 2 signifie que le mégapixel sera composé de 2 x 2 pixels. Appliquer un binning réduit la taille de l'ensemble des données et réduit le bruit dans l'acquisition par une augmentation du rapport signal/bruit, mais réduit aussi la résolution de l'image finale, comme le montre la figure 2-15 (un binning de 2 amène à une taille de mégapixel de 48 μm de côté, soit une dégradation en volume de 72% par rapport à la précision maximale atteignable de 40 μm !).

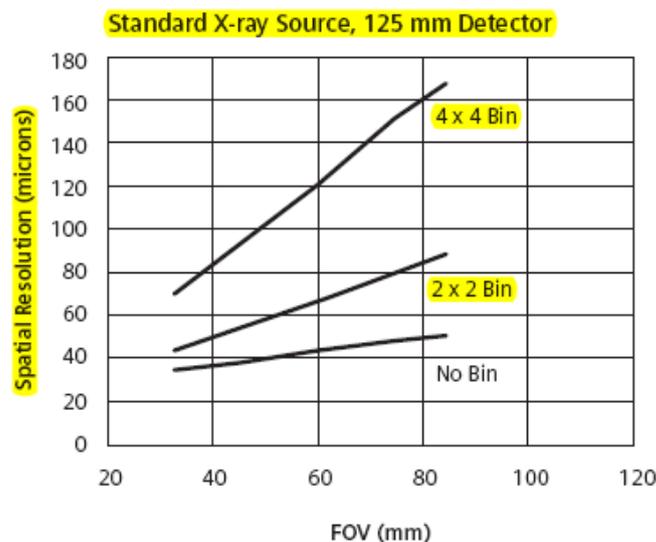


Fig 2-10 : Résolution spatiale en fonction du binning (défini ci-dessous) et du champ de vue choisis (extrait du manuel constructeur).

La fenêtre de paramétrage de l'acquisition de notre μ -scanner (figure 2-11) permet de régler les paramètres de tension et de courant de la source de rayons X et le paramètre de binning :

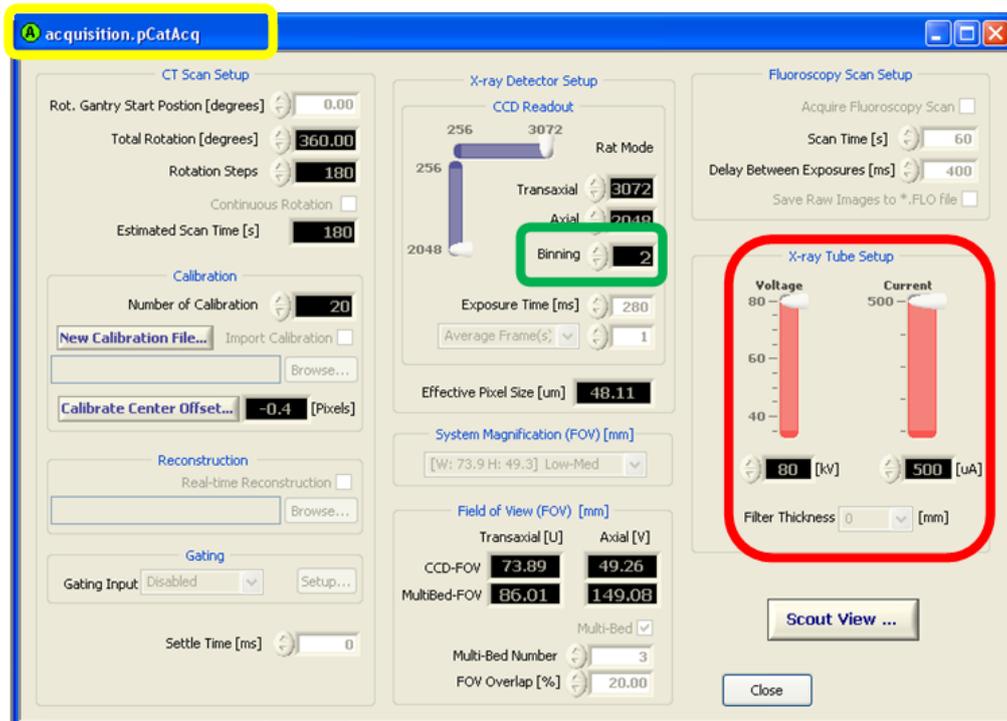


Fig 2-11 : Fenêtre de paramétrage de l'acquisition.

Dans la réalité, le rayonnement incident auquel est soumise la matière n'est pas idéal, il est de fait poly-énergétique. Une curiosité en découle : l'apparition d' « artefacts de durcissement du faisceau ».

En traversant un objet dense les rayons de plus faible énergie du spectre sont plus atténués que les rayons les plus énergétiques. De ce fait, une fois l'objet très dense traversé, il reste les rayons de haute énergie: le faisceau s'est "durci". Il y a un décalage du spectre des rayons X vers le haut.

Sur notre μ -scanner, le paramètre « Beam Hardening » permet d'appliquer une correction polynomiale au faisceau afin de gérer cet évènement durant la procédure de reconstruction (lorsque du métal — à échelle macroscopique — est présent dans le champ de vision, et qu'on sélectionne ce paramètre, les artefacts de ce métal sont exacerbés).

La fenêtre de paramétrage de la reconstruction des images de notre μ -scanner (figure 2-12) permet de régler les paramètres de « Downsample factor » (voir annexe 12 page 255), « Beam Hardening » et d'« Image Scale » (voir page 83) :

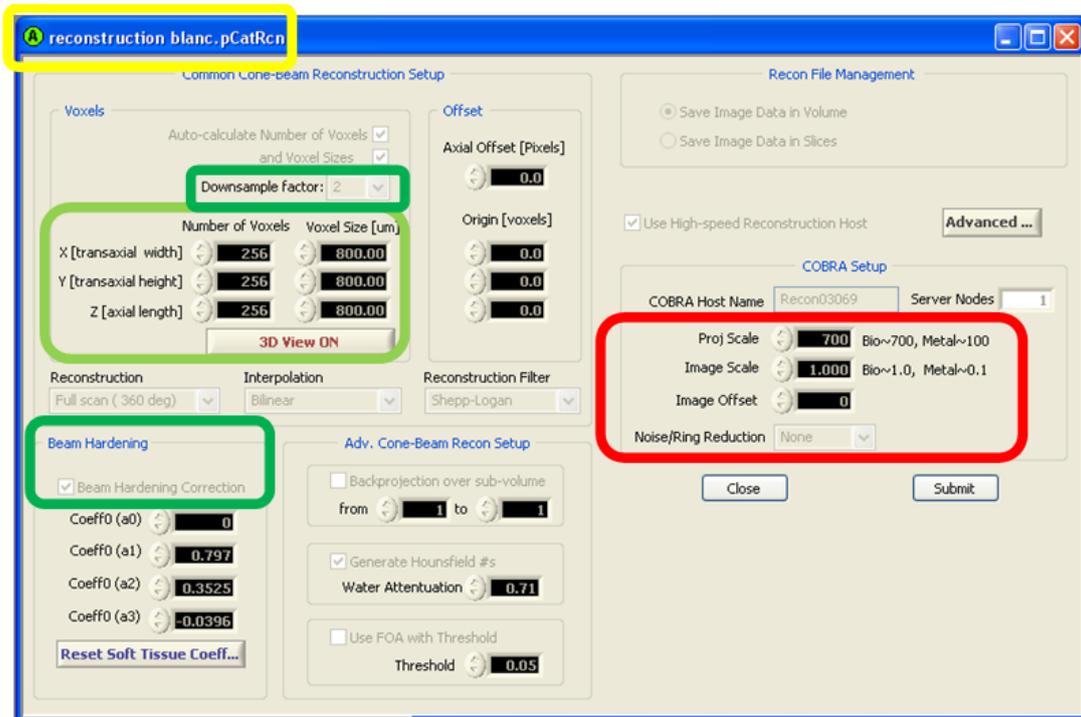


Fig 2-12 : Fenêtre de paramétrage de la reconstruction.

Par ailleurs, lorsqu'un faisceau de rayons X traverse un matériau, il subit également d'autres altérations. Une absorption (effet photoélectrique), une diffusion (effet Compton) ou une matérialisation peut avoir lieu.

✓ Effet photoélectrique :

La probabilité d'atténuation par effet photoélectrique (Φ) s'exprime en fonction du numéro atomique, selon la relation suivante (k est une constante) :

$$\mu(\Phi) = k * \frac{Z^3}{E^3}$$

Cet effet donne naissance à un phénomène d'intérêt : le saut « k-edge » (figure 2-13).

L'interaction photoélectrique ne peut avoir lieu que si le photon incident a une énergie $E(p)$ égale ou supérieure à l'énergie de liaison $E(l)$ de l'électron ciblé. Dans ce cas, un sursaut de l'atténuation survient brusquement. On parle de « K absorption edge » et de « L absorption edge » selon les couches atomiques concernées.

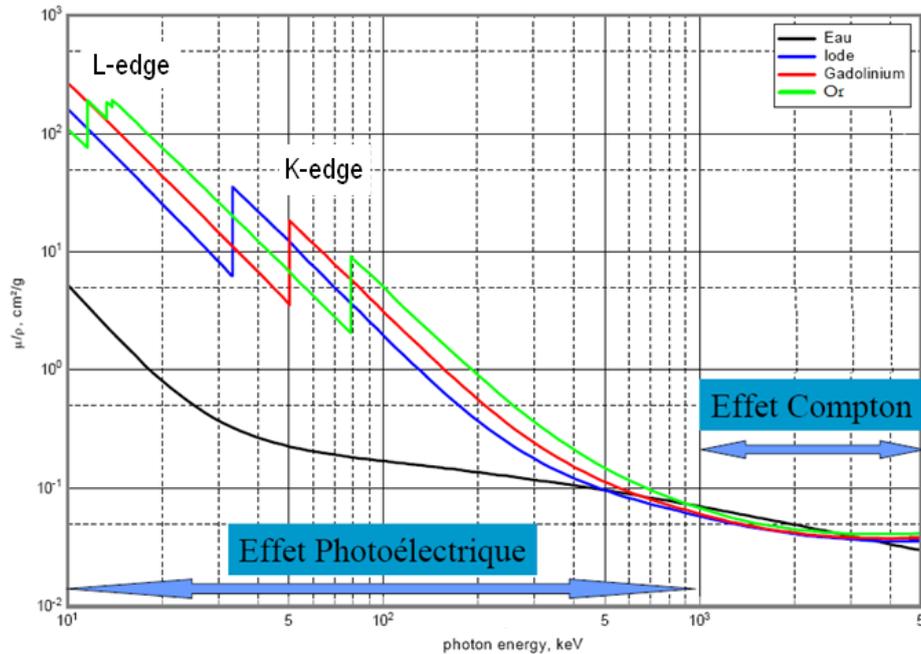


Fig 2-13 : Représentation des sauts « k-edge ».

On pourra retenir les valeurs de K-edge ci-dessous (figure 2-14) pour les éléments constituant majoritairement les tissus biologiques :

Elément	K-edge (keV)	Numéro atomique Z
H	0,01	1
C	0,28	6
N	0,40	7
O	0,53	8
Ca	4	20

Fig 2-14 : Valeurs de références des sauts « K-edge » dans le corps humain.

Le phénomène de k-edge peut être mis à profit pour maximiser le contraste obtenu en imagerie scanner. Pour cela, il faut régler la source de rayons X de manière à faire coïncider le spectre de la source et le pic d'atténuation par k-edge. La partie V de ce second chapitre détaille plus précisément ce phénomène.

✓ Effet Compton :

Pour des énergies « basses » ($E < 0,5 \text{ MeV}$), l'effet Compton existe, mais est peu probable lorsque Z est élevé (voir figure 2-16 page 82).

✓ Phénomène de matérialisation :

Ce phénomène n'existe qu'aux hautes énergies ($E > \text{quelques MeV}$). Il ne nous intéresse donc pas au vu des énergies mises en jeu pour notre μ -scanner.

Des informations complémentaires sur ces trois phénomènes sont disponibles en Annexe 3 page 210.

Ces trois phénomènes provoquent une atténuation du faisceau de rayons X suivant une loi exponentielle :

$$N(x) = N(0) * e^{-\mu x}$$

où μ est la probabilité d'atténuation (par unité de longueur) d'un photon d'interagir avec la matière, $N(0)$ est nombre de photons incidents, et $N(x)$, le nombre de photons transmis.

Le paramètre μ s'exprime donc en cm^{-1} , et est caractéristique de l'énergie du rayonnement et du matériau traversé.

Le coefficient μ prend ici sa définition la plus générale. Il est en effet la somme de trois composantes provenant des effets photoélectrique (μ_p), Compton (μ_c) et matérialisation (μ_m) présentés précédemment :

$$\mu = \mu_p + \mu_c + \mu_m$$

Le contraste que l'on visualise sur une image scanner est dû à cette atténuation subie par les rayons X ayant traversé la matière.

On peut ensuite passer de la relation concernant la variation du nombre de photons, à la relation concernant la variation de l'intensité du faisceau de photons.

Ainsi, quand un faisceau (en théorie, monochromatique) de rayons X pénètre dans un échantillon de densité uniforme avec une intensité initiale I_1 , il en ressort avec une intensité I_2 qui est elle aussi fonction des coefficients d'atténuation (μ_i) et de l'épaisseur (x_i) des différentes couches de matériaux qui ont été traversées (figure 2-15, à gauche) :

$$I_2 = I_1 * \exp [\sum(-\mu_i * x_i)]$$

Le contraste à l'image résulte donc du produit de l'épaisseur de l'échantillon par la concentration en agent de contraste. On peut donc avoir une valeur similaire de contraste entre un échantillon fin (épaisseur E) et un échantillon plus épais (épaisseur E'), tant que les concentrations C et C' en agent contrastant sont ajustées de manière à ce que $E \times C = E' \times C'$.

De même, l'intensité I_2 de sortie des rayons x peut être la même pour deux pixels, même si les empilements de couches rencontrés sont très différents (figure 2-15, à droite):

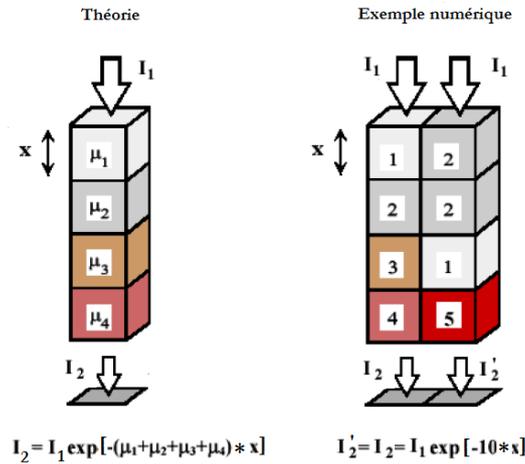


Fig 2-15 : Principe de calcul de l'intensité de sortie des rayons X ayant traversé un matériau inhomogène.

Par ailleurs, le diagramme ci-dessous (figure 2-16) présente les domaines d'influence pour les deux phénomènes électroniques d'importance en imagerie médicale, en fonction du numéro atomique des éléments chimiques. On note que l'effet Compton est prédominant pour les tissus biologiques, tandis que l'effet photoélectrique prédomine pour les matériaux denses (numéro atomique Z élevé) :

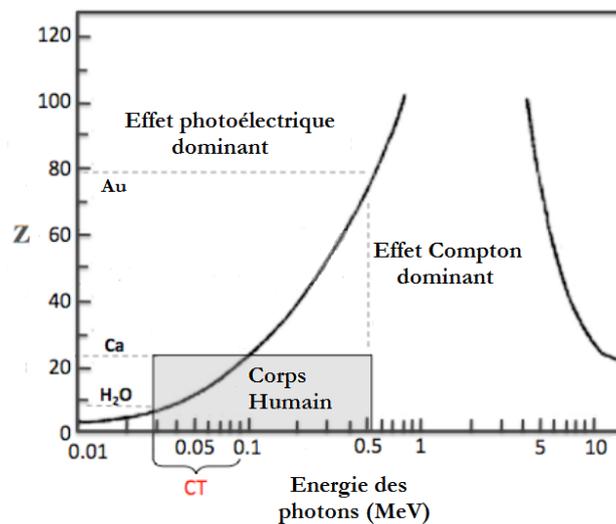


Fig 2-16 : Domaines de prédominance des différents phénomènes électroniques (photoélectrique, Compton).

Néanmoins, les coefficients μ ne sont pas directement utilisés lors de la visualisation à l'écran des images acquises.

Afin de présenter les images de manière plus conviviale, on remplace les valeurs de ces coefficients d'atténuation μ_c qui ont été calculées, en appliquant une normalisation par rapport au fluide biologique de référence, c'est-à-dire l'eau.

Les valeurs obtenues sont appelées « nombres CT » ou encore « nombres Hounsfield » :

$$CT = 1000 \times \frac{\mu_c - \mu_{eau}}{\mu_{eau}}$$

On pose par définition $\mu_{eau} = 0$ et $\mu_{air} = -1000$.

Sur notre μ -scanner, le paramètre « Image Scale » doit être recalculé pour chaque couple [courant-tension] de la source de rayons X. Ses variations sont très importantes aux faibles valeurs de tension (comme nous l'avons constaté, en réalisant notre cartographie spécifique figure 2-17). Ce paramètre permet de faire la conversion entre les valeurs des pixels et l'échelle Hounsfield. Il permet également de positionner correctement cette dernière en fonction de l'élément pris pour référence (ici, l'eau).

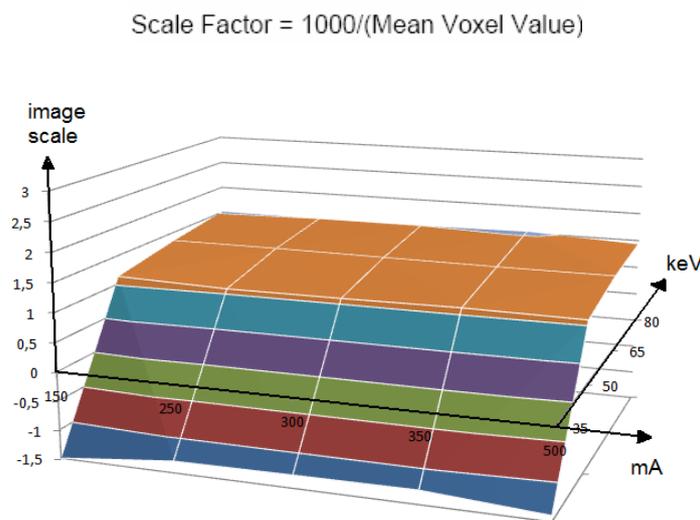


Fig 2-17 : Cartographie, que nous avons réalisée via le μ -scanner, des valeurs du paramètre « Image Scale » en fonction de la tension et du courant appliqués.

Avec notre μ -scanner, le logiciel ASIProTM (figure 2-18) permet de :

- Déterminer la valeur « mean voxel value » utile au calcul du paramètre « Image Scale »
- Passer des unités Hounsfield aux coefficients μ

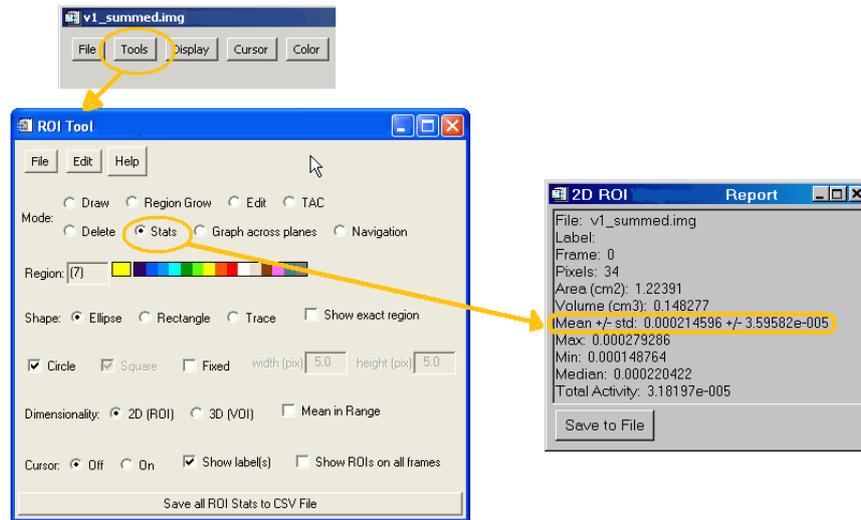


Fig 2-18 : Interface du logiciel ASIPro, donnant la valeur du paramètre « mean voxel value ».

Les nombres CT sont des entiers, que l'on peut classer sur une échelle, l'« échelle Hounsfield » (HU = « Hounsfield Unit »), et prennent des valeurs allant de -1000 à +1000.

Cependant, la création d'une échelle si fine pose un problème d'une part pour la visualisation sur écran, et d'autre part pour l'œil humain. Par chance, il est nécessaire qu'un matériau diffère d'au moins 1% avec son voisin pour qu'une différence de niveau de gris soit détectable lors du calcul de rétroprojection par l'ordinateur, ce qui correspond à un étalement de 10 nombres CT.

Par ailleurs, une stratégie peut être mise en place pour faciliter encore plus la lecture des images: le fenêtrage. Il s'applique à l'histogramme issu des valeurs en HU.

Sur notre μ -scanner, le traitement des données se fait à partir du logiciel : Inveon Research Workplace (IRW). Il est possible d'y paramétrer les régions d'intérêt (ROI) à analyser (forme, taille) et de régler l'histogramme (figure 2-19) :

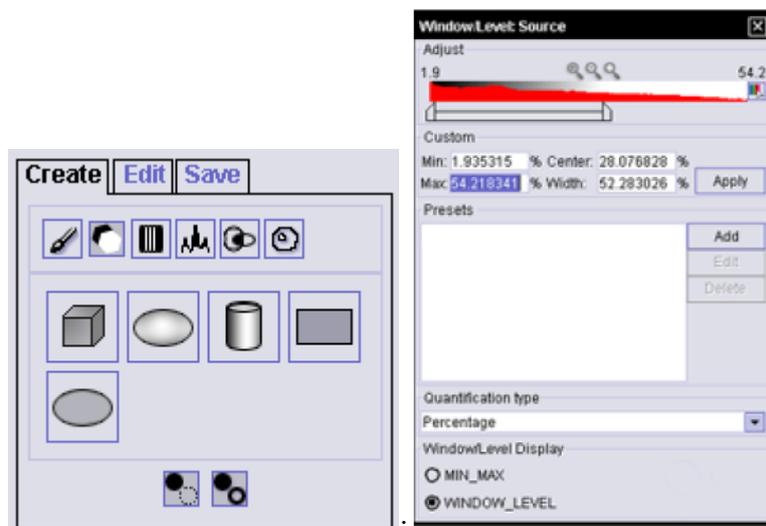


Fig 2-19 : Fenêtres de création des ROI et de réglage de l'histogramme.

Il s'agit de choisir une valeur de centrage (niveau) de la fenêtre (« window center ») de manière à cibler le matériau que l'on veut étudier, puis d'étendre la plage d'étude (« window width ») autour de ce centre (figure 2-20). La largeur (pente) du fenêtrage affecte directement l'échelle de contraste: une largeur faible donne un contraste fort et inversement. Une modification du niveau modifie les données (en HU) visualisées.

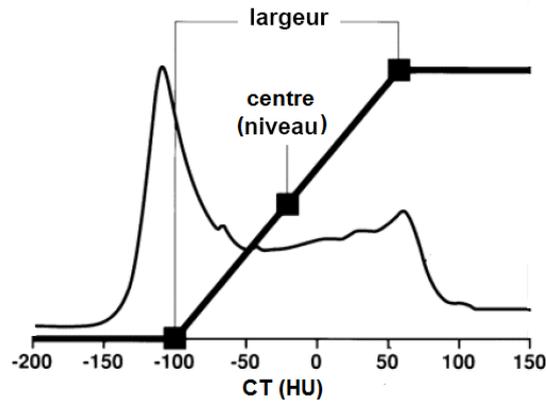


Fig 2-20 : Fenêtrage des valeurs CT.

Par exemple, on peut choisir d'étudier le pancréas en prenant pour centre une valeur de 45 HU, et une plage d'étude allant de 20 à 80 HU, qui englobe aussi les autres organes, comme l'illustre la figure 2-21 :

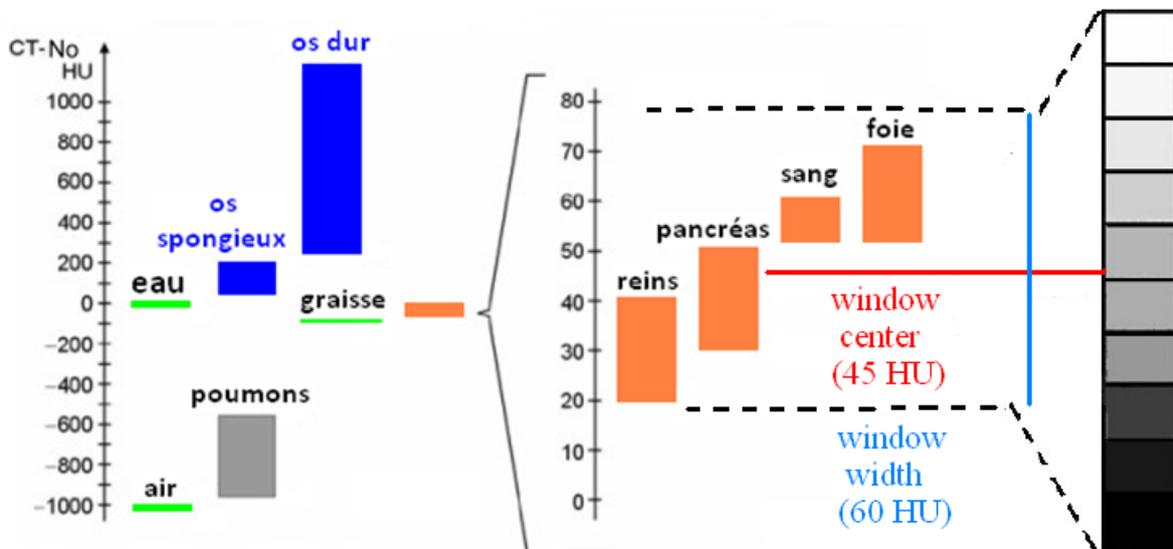


Fig 2-21 : Echelle Hounsfield et position des principaux éléments biologiques.

Suite à ces constatations théoriques et pratiques, il est possible de résumer notre protocole d'acquisition d'images au μ -scanner par le diagramme suivant, en figure 2-22 :

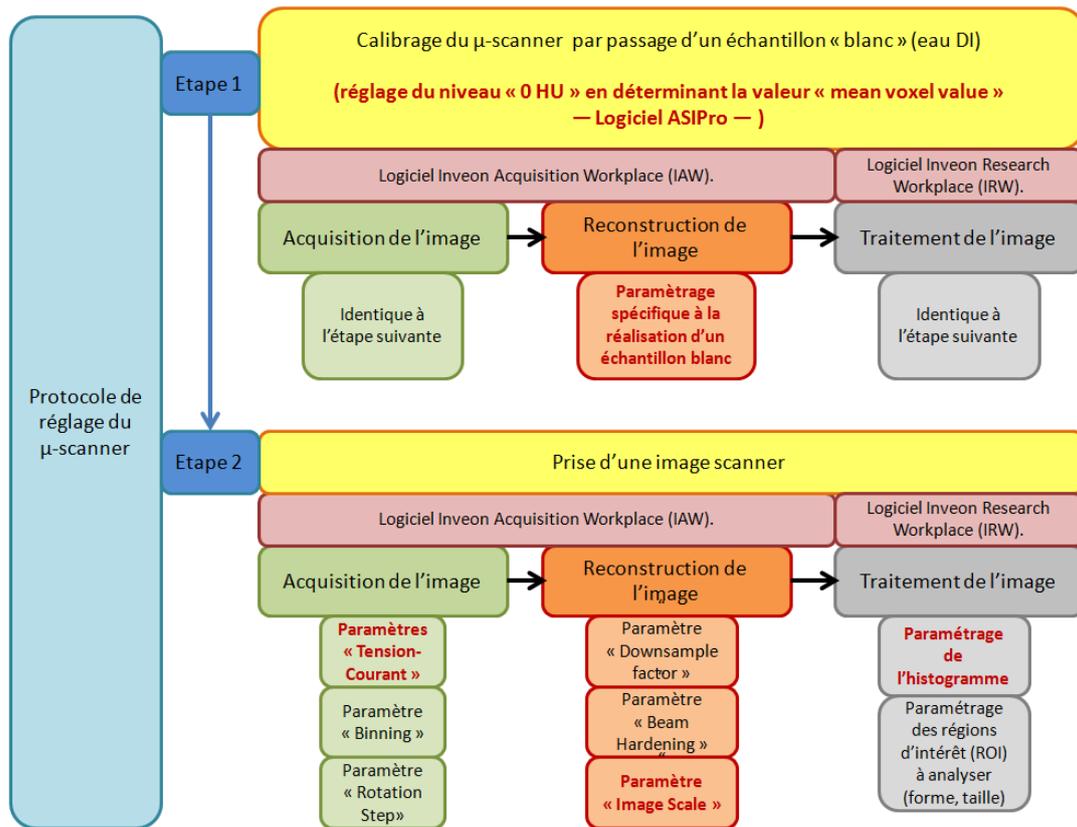


Fig 2-22 : Diagramme résumant notre protocole au μ -scanner du CHRU de Lille.

IV) Digression concernant l'imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique utilise, comme son nom l'indique, les propriétés de résonance magnétiques des noyaux atomiques, la RMN⁹⁶. De plus amples informations sont disponibles en Annexe 4 page 214.

Les produits de contraste utilisés pour améliorer les clichés IRM peuvent être classés en deux catégories :

- Les produits superparamagnétiques (par exemple, les particules SPIO – SuperParamagnetic Iron Oxide)
- Les produits paramagnétiques (par exemple, les chélates de manganèse ou de gadolinium) :

Ces agents sont constitués d'ions qui possèdent un moment magnétique naturellement élevé (atomes possédant de nombreux électrons non appariés). Le produit commercialisé à base de gadolinium (Magnevist®) sur la figure 2-23 suivante en est un exemple.

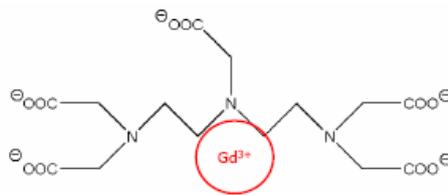


Fig 2-23 : Agent de contraste Magnevist, contenant du gadolinium, injecté lors d'examen IRM.

Le cas du gadolinium est particulièrement intéressant, puisqu'il s'agit, rappelons-le, d'un élément possédant un numéro atomique élevé ($Z = 64$), et un K-edge à 50 keV.

Le développement d'un agent de contraste unique, commun à de nombreux dispositifs d'imagerie est un sujet attrayant. Des études ont ainsi été publiées, combinant des particules utilisables en imagerie à rayons X et des composés utilisables en IRM :

- Particules SPIO et bismuth ou barium⁹⁷
- Particules d'or sous forme de core-shell avec le matériau (Fe_3O_4) constitutif des particules SPIO^{98,99}
- Particules d'or avec oxydes d'hafnium¹⁰⁰, chélates de vanadium¹⁰¹ ou de gadolinium^{102,103}

Par ailleurs, des études se penchent sur l'utilisation de liposomes¹⁰⁴ ou de molécules fluorées^{105,106}.

Conscients de l'intérêt d'une combinaison de ces éléments (comme nous l'expliquons dans la partie 5 ci-dessous), nous avons choisi de fabriquer deux sortes de ces particules « mixtes » (particules d'or-gadolinium, et particules fluorées), afin de pouvoir les comparer aux particules d'or traditionnelles.

V) Comment choisir un élément afin de synthétiser un agent de contraste efficace en imagerie par rayons X ?

La première question qui se pose est la suivante : pourquoi utiliser de l'or en imagerie à rayons X ?

Métal noble par excellence, l'or, de configuration électronique $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$, présente de nombreux avantages qui lui permettent d'être un excellent candidat pour le développement d'agents de contraste (densité élevée, résistance à la corrosion et à l'oxydation d'où résulte une très bonne innocuité...). La résistance à l'oxydation de l'or métallique s'explique grâce à l'orbitale 5d complètement occupée qui se situe au dessus de l'orbitale 6s, selon l'ordre des niveaux d'énergie de la règle de Klechkowski (figure 2-24).

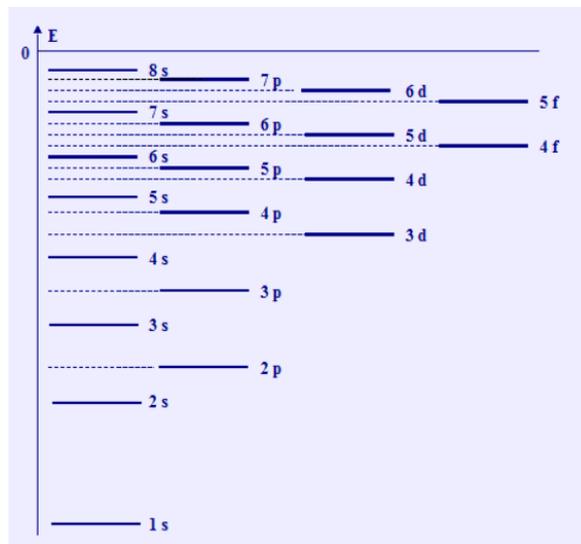


Fig 2-24 : Niveaux d'énergie des orbitales atomiques de l'or.

Par ailleurs, comme on l'a vu auparavant (fig 2-16 page 82), l'utilisation de matériaux denses permet de bénéficier pleinement de l'effet photoélectrique dans la matière.

Le choix des atomes qui constitueront les particules doit se faire en fonction des bénéfices attendus, et de façon à maximiser la différence d'absorption avec l'eau, principal composant du corps humain. De nombreux types de particules constituées d'atomes à haut numéro atomique ont été testés ces dernières années^{107,108,109,110,111,112,113}. L'étude de Albrecht *et al.*, datant de 2000 et portant sur l'utilisation de complexes Gd-DTPA¹¹², est d'ailleurs l'une des premières à envisager l'usage de cet atome en imagerie scanner, au lieu de l'utilisation traditionnelle en imagerie IRM.

La figure 2-25 ci-après, présente les atomes d'intérêt du tableau périodique qui ont déjà été utilisés dans la littérature (ainsi que dans la pratique) afin de créer des agents de contraste :

37 85,5 Rb Rubidium	38 87,6 Sr Strontium	39 88,9 Y Yttrium	40 91,2 Zr Zirconium	41 92,9 Nb Niobium	42 95,9 Mo Molybdène	43 99 Tc Technétium	44 101,1 Ru Ruthénium	45 102,9 Rh Rhodium	46 106,4 Pd Palladium	47 107,9 Ag Argent	48 112,4 Cd Cadmium	49 114,8 In Indium	50 118,7 Sn Étain	51 121,8 Sb Antimoine	52 127,6 Te Tellure	53 166,9 I Iode	54 131,3 Xe Xénon
55 132,9 Cs Césium	56 137,3 Ba Baryum		72 178,5 Hf Hafnium	73 180,9 Ta Tantale	74 183,9 W Tungstène	75 186,2 Re Rhénium	76 190,2 Os Osmium	77 192,2 Ir Iridium	78 195,1 Pt Platine	79 197,0 Au Or	80 200,6 Hg Mercure	81 204,4 Tl Thallium	82 207,2 Pb Plomb	83 209,0 Bi Bismuth	84 210 Po Polonium	85 210 At Astaté	86 222 Fr Francium
87 223 Fr Francium	88 226 Ra Radium		104 261 Rf Rutherfordium	105 262 Db Dubnium	106 266 Sg Seaborgium	107 264 Bh Bohrium	108 269 Hs Hassium	109 268 Mt Meitnerium	110 271 Ds Darmstadtium	111 272 Rg Roentgenium	112 285 Uub Ununbium	113 284 Uut Ununtrium	114 289 Uuq Ununquadium	115 288 Uup Ununhexium	116 292 Uuh Ununseptium	117 Uus Ununoctium	118 Uuo Unanocium
57 138,9 La Lanthane	58 140,1 Ce Cérium	59 140,9 Pr Praseodyme	60 144,2 Nd Néodyme	61 145 Pm Prométhium	62 150,4 Sm Samarium	63 152,0 Eu Europium	64 157,3 Gd Gadolinium	65 158,9 Tb Terbium	66 162,9 Dy Dyprosium	67 164,9 Ho Holmium	68 167,3 Er Erbium	69 168,9 Tm Thulium	70 173,0 Yb Ytterbium	71 175,0 Lu Lutétium			

Fig 2-25 : Classification périodique. En vert, les éléments qui ont été testés avec plus ou moins de succès ces 100 dernières années. En jaune, l'or, notre sujet d'étude.

Puisque l'atténuation aux rayons X est directement proportionnelle au numéro atomique de l'élément traversé, nous avons donc décidé lors de notre étude, de vérifier la linéarité d'atténuation en unité Hounsfield en fonction du numéro atomique des éléments choisis :

Pour cette expérimentation, dont les résultats sont présentés sur la figure 2-26, toutes les solutions ont la même concentration en atome d'intérêt : 0,05M. Ces solutions sont ensuite passées au μ -scanner avec les paramètres (80 keV, 500mA).

Composé chimique	Numéro Atomique Z de l'atome d'intérêt	Atténuation Hounsfield (Hu)
CaCl_2	20	86
TiO_2	22	119
KBr	35	163
Complexe de Molybdène ($\text{Na}_2\text{Mo}_6\text{Br}_8(\text{N}_3)_6$)	42	324
Omnipaque (Iode)	53	369
KI	53	381
BaCl_2	56	407
GdCl_3	64	586
Complexe de Rhénium ($\text{K}_4\text{Re}_6\text{S}_8(\text{OH})_6$)	75	696
Sel d'or : HAuCl_4	79	836

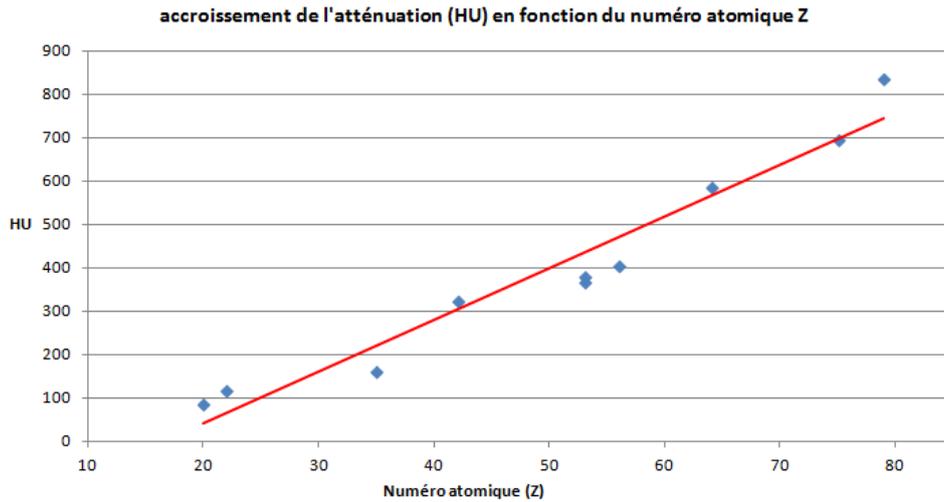


Fig 2-26 : Evolution de l'atténuation en fonction du numéro atomique de l'atome d'intérêt.

Ce graphique nous permet de constater via notre propre équipement scanner que les éléments les plus lourds permettent une meilleure atténuation.

Après avoir vérifié cette linéarité, revenons à l'intérêt de l'effet photoélectrique dans notre cas.

Cet effet est prédominant aux énergies de fonctionnement de l'équipement scanner qui est à notre disposition. Il concerne largement les atomes lourds ($Z > 50$), donc il concerne directement l'or ($Z=79$) et le gadolinium ($Z=64$) et est lié au phénomène physique de « k-edge » comme il a été précisé auparavant.

Quelle est donc l'utilité de l'effet k-edge dans notre cas ?

Il est possible de tracer les courbes approximant l'accroissement de l'atténuation d'un élément vis-à-vis de l'eau en fonction de la tension appliquée en keV.

Ces courbes (figure 2-27) sont calculées d'après les données du NIST¹¹⁴ (National Institute of Standards and Technology). Elles montrent la variation des coefficients μ de certains atomes lourds par rapport au coefficient μ de l'eau.

$$P = \frac{\mu_{\text{élément}}}{\mu_{\text{eau}}}$$

Lorsque l'on visualise ces courbes, il est clairement visible que l'iode est le meilleur choix si l'on souhaite exploiter le phénomène K-edge (la première bande liée au L-edge étant beaucoup plus faible). Le gadolinium quant à lui possède deux bandes assez similaires. L'or en revanche possède exclusivement une bande d'intérêt en L-edge aux énergies considérées (la bande associée au K-edge se développe **à partir de 80 keV**).

On en déduit que la charnière entre efficacité K-edge et L-edge se situe pour les éléments dont le numéro atomique avoisine 65.

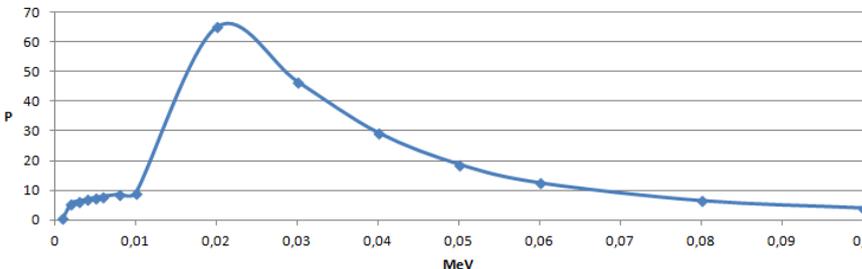
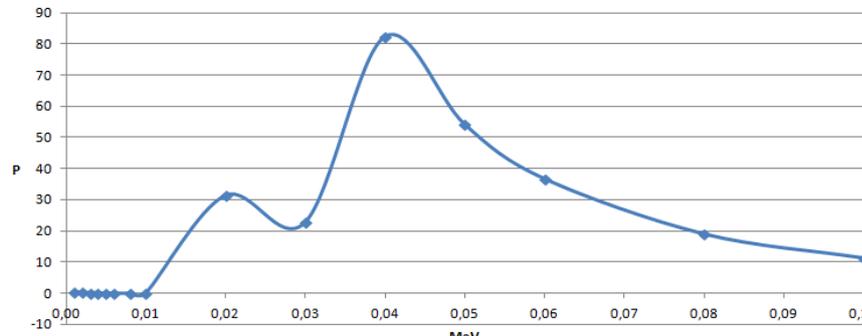
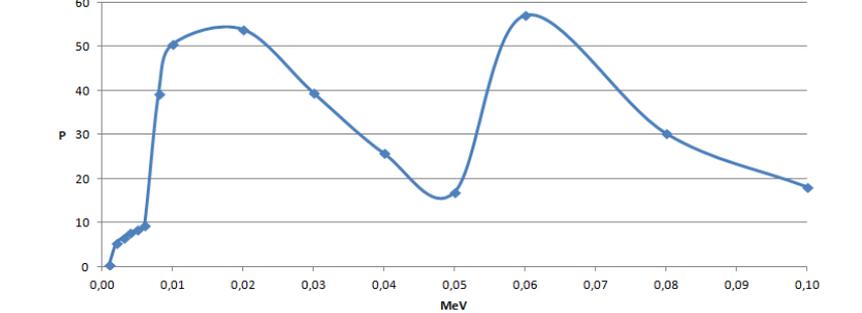
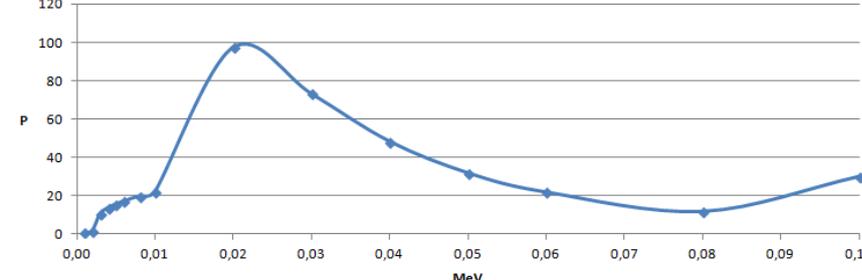
<p>Courbes approximant l'accroissement de l'atténuation d'un élément vis-à-vis de l'eau : $P = \mu_{\text{élément}} / \mu_{\text{eau}}$</p>	<p>Valeurs théoriques</p>
<p style="text-align: center;">Potentiel d'accroissement de l'atténuation pour l'élément Brome (Z = 35)</p> 	<p>K-edge à 13 keV</p>
<p style="text-align: center;">Potentiel d'accroissement de l'atténuation pour l'élément Iode (Z = 53)</p> 	<p>K-edge à 33 keV L-edge à 5 keV</p>
<p style="text-align: center;">Potentiel d'accroissement de l'atténuation pour l'élément Gadolinium (Z = 64)</p> 	<p>K-edge à 50 keV L-edge à 8 keV</p>
<p style="text-align: center;">Potentiel d'accroissement de l'atténuation pour l'élément Or (Z = 79)</p> 	<p>K-edge à 80 keV L-edge à 14 keV</p>

Fig 2-27 : Courbes d'accroissement de l'atténuation comparativement à l'eau, pour les éléments Br, I, Gd, et Au.

Ces faits se retrouvent illustrés dans l'étude menée en 2010 par D.P. Cormode *et al.*¹¹⁵ (figure 2-28), où les bandes d'action (L-edge de l'or en rouge, K-edge des deux éléments en bleu) en fonction de l'énergie appliquée sont bien visibles:

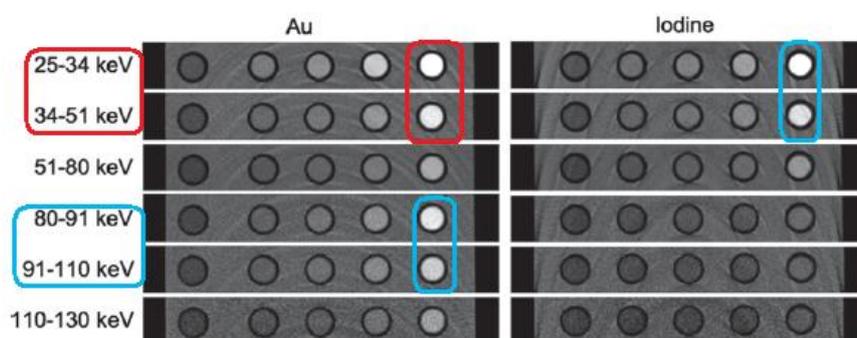


Fig 2-28 : Mise en évidence des bandes K-edge en bleu et L-edge en rouge pour l'or et l'iode, en fonction du voltage appliqué¹¹⁵.

On en conclut que dans notre cas spécifique, avec un microscanner pilotable via une tension comprise entre 35 et 80 keV, ni l'iode (K-edge théorique à 33 keV), ni l'or (L-edge théorique à 14 keV et K-edge théorique à 80 keV), ne sont les éléments les plus favorables. En revanche, les associations iode-gadolinium ou or-gadolinium présentent un réel intérêt.

Cette conclusion ne nous est malheureusement apparue clairement qu'après avoir réalisé un nombre conséquent d'expérimentations au μ -scanner, qui nous semblaient décevantes. C'est donc en cherchant l'origine de ce problème que nous avons découvert cet effet k-edge et ses conséquences. C'est pour remédier à cette situation que nous avons décidé de synthétiser des particules bimodales orgadolinium et d'encapsuler des particules d'or dans des capsules lipidiques.

Grâce à ces connaissances, nous allons maintenant nous intéresser, dans un troisième chapitre, à la synthèse de particules d'or.

Dans ce troisième volet de notre étude, nous verrons tout d'abord les différentes approches existant dans la communauté scientifique (chapitre 3, partie I), puis nous nous intéresserons à l'état de l'art, afin de réunir les connaissances utiles à la compréhension des phénomènes se produisant au cours de nos réactions chimiques (chapitre 3 partie II, points 2 et 3). Enfin, nous présenterons les résultats de nos synthèses (images MEB) et de leur caractérisation par UV-Visible (chapitre 3, partie II, points 4 et 5), ainsi que les résultats obtenus après passage au μ -scanner du CHRU de Lille (chapitre 3, partie II, point 6).

Chapitre 3 : Synthèse de particules d'or pour l'imagerie par rayons X

Introduction

Les particules d'or sont devenues des particules d'intérêt pour la recherche dès 1980, mais leur réel essor n'a eu lieu que vers les années 2000, comme le montrent les graphiques ci-dessous. La France y est représentée en avant dernière position (figure 3-1).

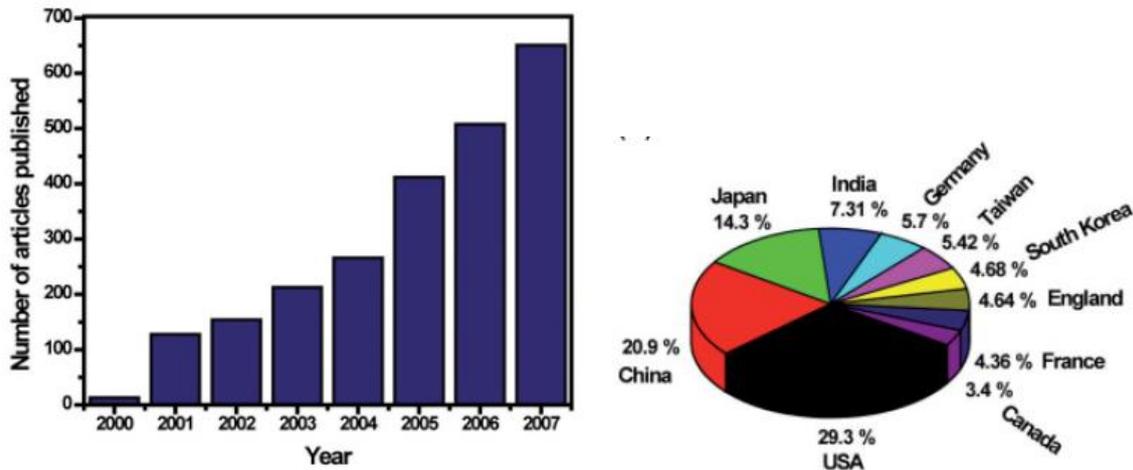


Fig 3-1 : Evolution du nombre de publications scientifiques concernant les particules d'or depuis les années 2000, Pourcentages en fonction des pays¹¹⁶.

Pourtant, les domaines potentiels d'application de ces particules d'or sont extrêmement variés, de la catalyse¹¹⁷ aux biocapteurs^{118,119} en passant par l'imagerie cellulaire et médicale^{120,121}. Des informations complémentaires sont disponibles en Annexes 5 à 8, pages 216 à 222.

Un autre exemple de concurrence entre sociétés de nanotechnologie peut être cité. Midatech en Angleterre et NanoSpectra aux Etats-Unis, se trouvent aux coudes à coudes dans la course aux tests cliniques. NanoSpectra, fabriquant des AuroShellsTM (colloïdes sphériques issus des recherches menées à l'Université de Rice), a reçu un accord d'essai clinique depuis 2008. Le milieu de la recherche universitaire a lui aussi connu une explosion. Une des publications de référence du domaine date de 2004. JF. Hainfeld *et al.*⁶⁶ y mettent en œuvre des colloïdes d'or de forme sphérique de 2 nm de diamètre. Nous reviendrons sur ces travaux par la suite. Cependant, si les essais menés par les start-up précédemment citées sont toujours basés sur des colloïdes d'or sphériques de taille avoisinant le nanomètre, de nombreux articles universitaires proposent des méthodes de fabrication de particules d'or de tailles et de formes très variées. Les deux domaines (imagerie médicale / fabrication de particules d'or) ont peu d'interactions en commun. C'est pourquoi il est si intéressant de mener une étude pour répondre à la question suivante : *La forme des particules d'or en solution influe-t-elle sur le contraste constaté à l'image lors de l'examen d'un patient ?* Répondre à cette question a été l'un des objectifs de ce travail de thèse.

1) Cheminement de reflexion, approche de la problématique

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les travaux concernant les particules d'or mettent en jeu quasi exclusivement des particules sphériques de diamètre compris entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres. Cela est dû à une séparation nette des disciplines d'étude (figure 3-2): d'une part, les équipes spécialisées dans le domaine de la chimie créent des particules de formes originales, d'autre part, les équipes spécialisées dans le domaine médical achètent des particules commerciales pour mener leurs études cliniques sur l'animal :

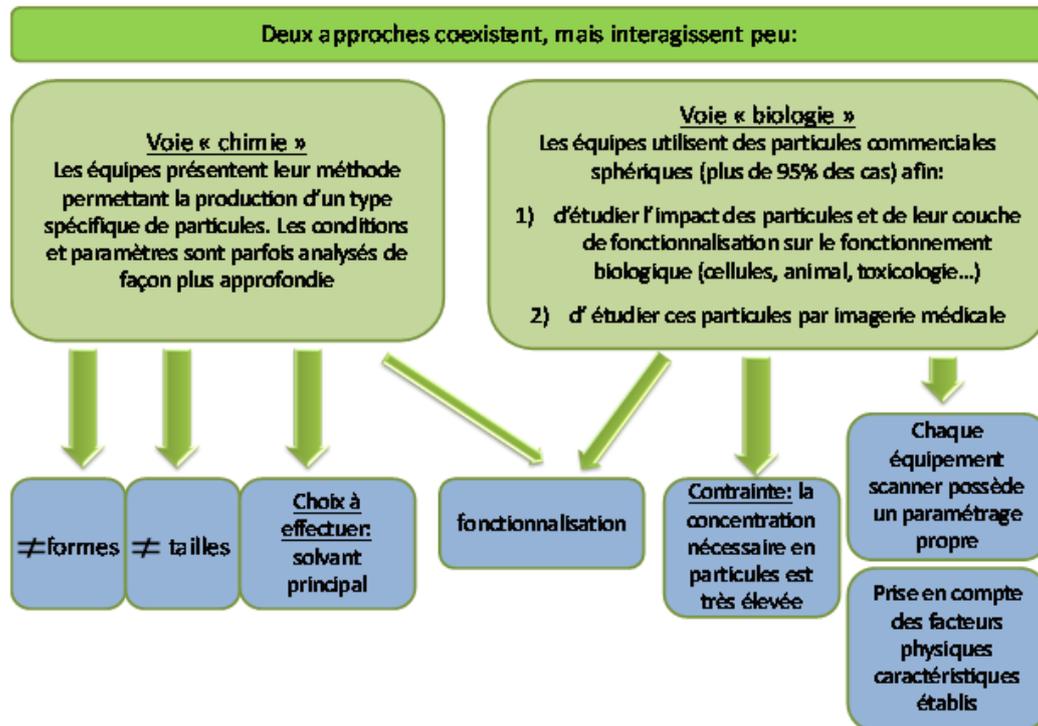


Fig 3-2 : Approches existantes selon la discipline scientifique initiale.

Les études tendent parfois à se rejoindre, surtout dans le domaine de la fonctionnalisation. En effet, les enrobages ajoutés aux particules combinent une double vocation : éviter l'agrégation de ces dernières dans le milieu où elles sont amenées à évoluer, mais aussi apporter des molécules thérapeutiques.

Du point de vue « chimie », les synthèses qui requièrent des solvants autres que l'eau présentent un avantage majeur : les particules peuvent être produites en grande quantité, avec une concentration élevée obtenue par évaporations successives de solvant à l'évaporateur rotatif.

Leur principal inconvénient réside dans la faible résistance des enrobages biologiques à ces mêmes solvants. C'est pour cette raison que notre choix final pour cette étude s'est porté vers les synthèses en milieu aqueux

Les articles initiaux qui lient l'utilisation de particules d'or à l'imagerie scanner sont ceux de J.F. Hainfeld *et al.* en 2004 (que nous avons mentionné précédemment) et 2006^{122,123}, et C. Xu *et al.*¹²⁴ en 2008.

J.F. Hainfeld est notamment le président fondateur de la société américaine Nanoprobes, qui commercialise des particules d'or sphériques sous la marque AuroVistTM.

Dans son étude de 2006¹²², il utilise les nanoparticules d'or sphériques de très petite taille (2 nm) produites par son entreprise, pour réaliser une étude sur modèle murin. Cette étude est réalisée sur un équipement de mammographie à 22 keV, et avec une concentration en particules d'or de 10mg/ml de sang, valeur extrêmement élevée.

De façon générale, les études existantes démontrent que la quantité d'or nécessaire pour obtenir un contraste similaire, voire meilleur à celui des produits iodés du marché (ex : Omnipaque) est assez conséquente (plusieurs mg par ml de sang pour l'animal étudié !). Ils concluent également que les particules de faible taille permettent non seulement un meilleur contraste, mais aussi une meilleure viabilité cellulaire.

L'étude de Xu *et al.*¹²⁴ (figures 3-3 et 3-4) a également donné de bons indicateurs concernant les valeurs en unité Hounsfield que l'on peut obtenir pour des particules sphériques de petite taille (jusqu'à 60 nm), mais les barres d'erreurs démontrent la difficulté à établir une comparaison entre ces particules, puisque les scanners actuels ont une marge d'erreur d'environ 50 HU.

Il est à noter que cette étude a été menée sur une plage de concentration allant de 1.10^{-2} mol/L à $1,6.10^{-1}$ mol/L et avec les paramètres scanner de 80 mA and 120 kVp.

Par ailleurs, l'étude montre une meilleure efficacité de l'or sur l'iode, ce qui est logique sachant que ces essais ont été menés au-delà de 80 keV :

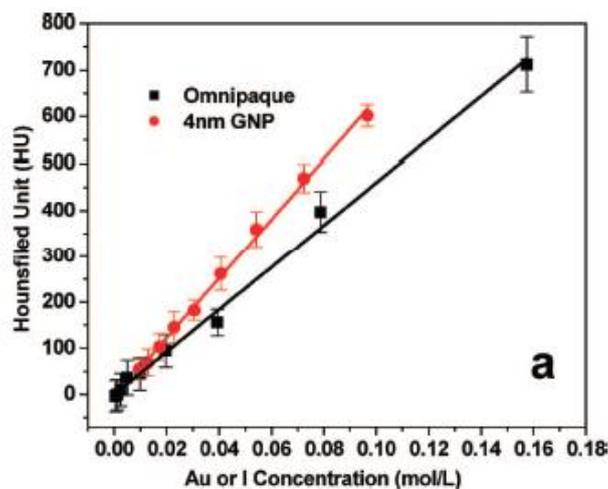


Fig 3-3 : Comparaison de l'atténuation due à des particules d'or sphérique avec l'atténuation due à l'une des molécules iodées usuellement utilisées pour l'imagerie CT-scanner (Omnipaque)¹²⁴.

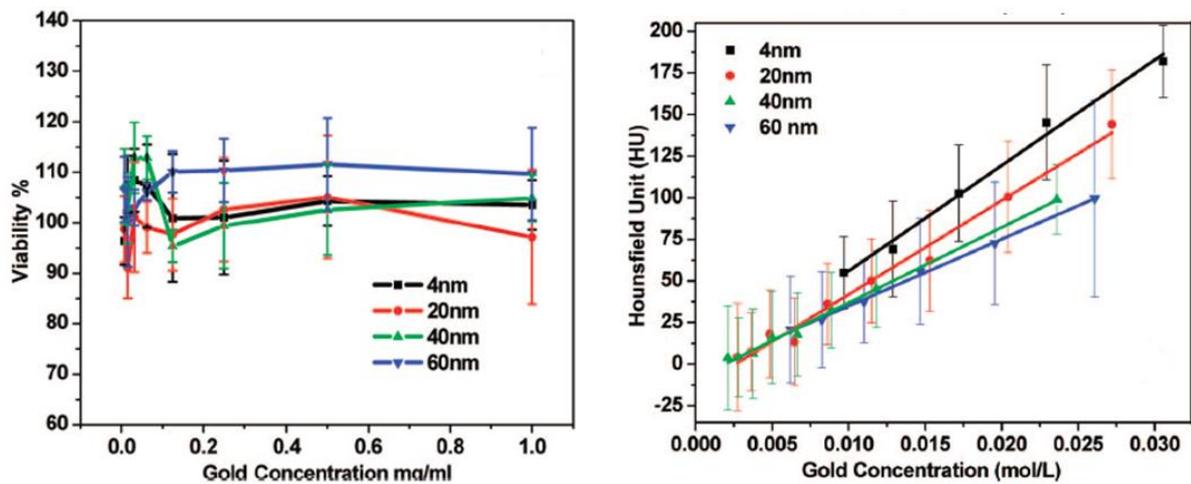


Fig 3-4 : Effet de la taille des particules d'or sur la viabilité cellulaire et le contraste en imagerie scanner ¹²⁴.

On notera que l'on peut passer de l'unité mol/L à mg/mL en prenant comme référence 0.01 mol/L = 1,97 mg/mL.

Par ailleurs, la nécessité d'un seuil minimal de concentration en or, en dessous duquel la qualité des images acquises n'est plus garantie a été évoquée par J.F. Hainfeld *et al.* Ces derniers fixent ce seuil à 100 µg/ml de sang. Le choix des paramètres d'irradiation par les rayons X (tension et courant appliqués) est aussi discuté.

*Les études plus récentes portant sur l'influence de la forme des particules sont rares. Elles abordent essentiellement la facette « biologie » du problème posé^{125,126,127,128}. Deux études un peu plus complètes ont néanmoins été menées par P.Jackson *et al.*¹²⁹ (figure 3-5). Les études ont été menées d'une part à faible voltage (< 80 keV) sur un équipement de radiographie, d'autre part à voltage plus important (> 80 keV) sur un équipement scanner et se sont limitées à la comparaison de la réponse de particules sphériques à celle de nanofils.*

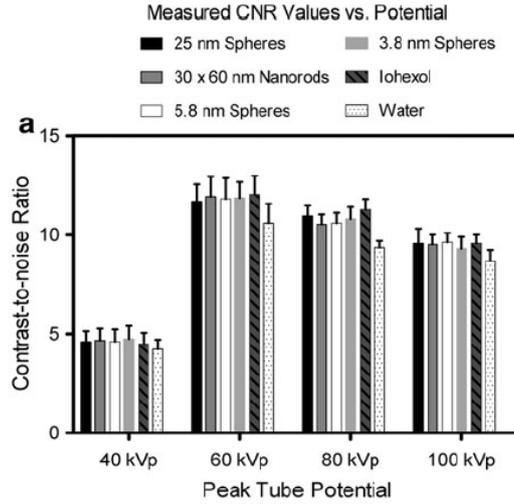


Table 2 Measured contrast values and associated contrast to noise ratios for CM samples in images shown in Fig. 4

Sample	40 kVp		60 kVp		80 kVp		100 kVp	
	Contrast (I_{CM}/I_{BG})	CNR	Contrast	CNR	Contrast	CNR	Contrast	CNR
25 nm Spheres	214.3 ± 4.0	4.61 ± 0.53	102.7 ± 1.3	11.68 ± 0.86	83.8 ± 1.1	10.95 ± 0.52	77.5 ± 1.7	9.57 ± 0.74
Nanorods	217.0 ± 2.5	4.67 ± 0.60	104.9 ± 0.4	11.93 ± 1.01	80.6 ± 0.8	10.53 ± 0.50	77.1 ± 0.6	9.51 ± 0.48
Iohexol	209.0 ± 0.8	4.49 ± 0.56	105.8 ± 1.2	12.03 ± 0.95	86.2 ± 1.3	11.26 ± 0.55	77.6 ± 1.2	9.57 ± 0.43
5.8 nm Spheres	214.5 ± 1.5	4.62 ± 0.61	103.8 ± 0.7	11.81 ± 1.04	81.1 ± 1.8	10.60 ± 0.51	78.1 ± 1.0	9.63 ± 0.47
3.8 nm Spheres	220.4 ± 3.5	4.74 ± 0.66	104.4 ± 1.4	11.86 ± 0.80	82.6 ± 1.5	10.79 ± 0.60	75.4 ± 1.7	9.31 ± 0.59
Water	196.8 ± 3.7	4.23 ± 0.48	93.0 ± 1.2	10.59 ± 0.98	71.7 ± 0.6	9.36 ± 0.33	70.3 ± 1.4	8.68 ± 0.56

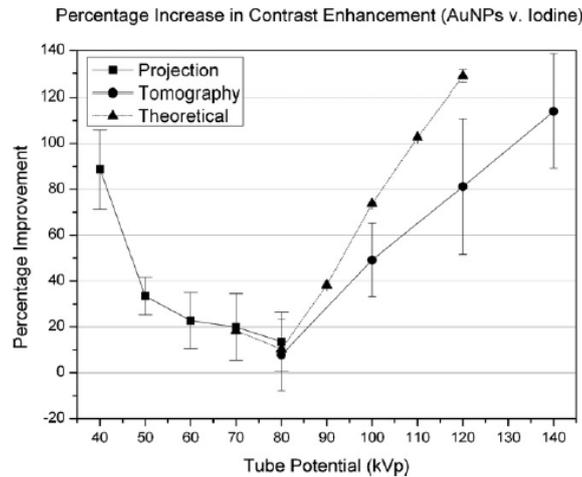


Fig 3-5: Comparaison de la réponse de particules sphériques à celle obtenue avec des nano-rods. A faible voltage, sur un équipement de radiographie, une différence de contraste entre ces formes de nanoparticules n'a pu être établie¹²⁹. Les concentrations en particules sont de 0,025 mol/l pour les deux premières figures (synthèse classique en milieu aqueux), et de 0,5 mol/l pour la dernière figure (utilisation des particules commerciales de la société Nanoprobes de Hainfeld).

SK. Nasiruzzaman *et al.*¹³⁰ en 2010 (figure 3-6) ont évalué l'efficacité de la combinaison entre gadolinium et particules d'or sphériques (12 nm) à 60 keV sur équipement scanner. Notre étude personnelle a donné des résultats similaires, comme nous le verrons par la suite.

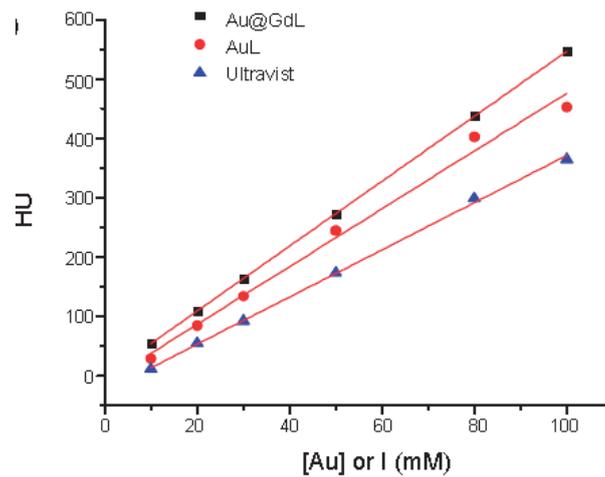


Fig 3-6: Pour un voltage de 60 keV, les nanoparticules d'or entourées de gadolinium présentent un meilleur contraste que les particules seules ou que le composé iodé de référence Ultravist¹³⁰.

L'efficacité des particules d'or a également été considérée¹³¹. L'utilisation de scanners à double source (étude autour des sauts k-edge facilitée)^{132,133,134,135} ou à source monochromatique^{136,137} (synchrotron) est également fréquente.

II) Etude menée

1) Notre démarche

Nos objectifs lors de cette étude sont résumés par la figure 3-7 :

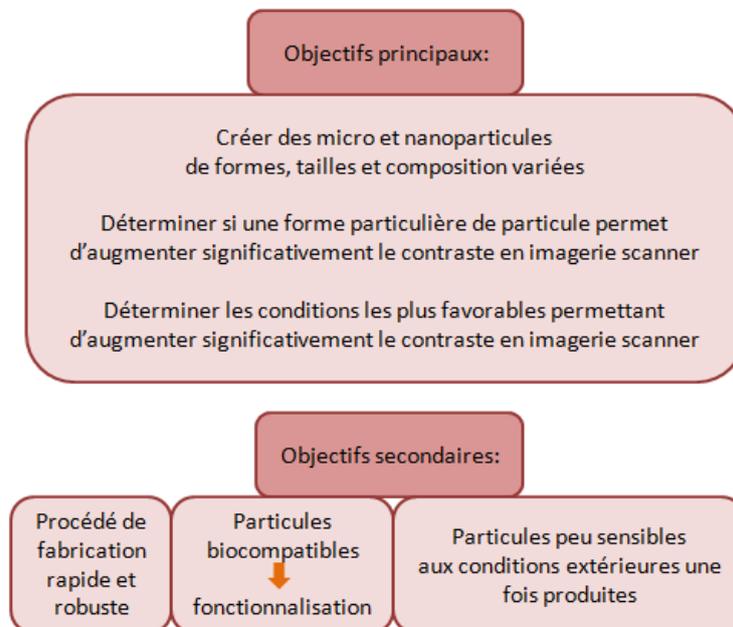


Fig 3-7 : Objectifs de notre étude sur la synthèse de particules d'or.

Afin d'atteindre ces objectifs, notre plan de réflexion a été le suivant (figure 3-8):

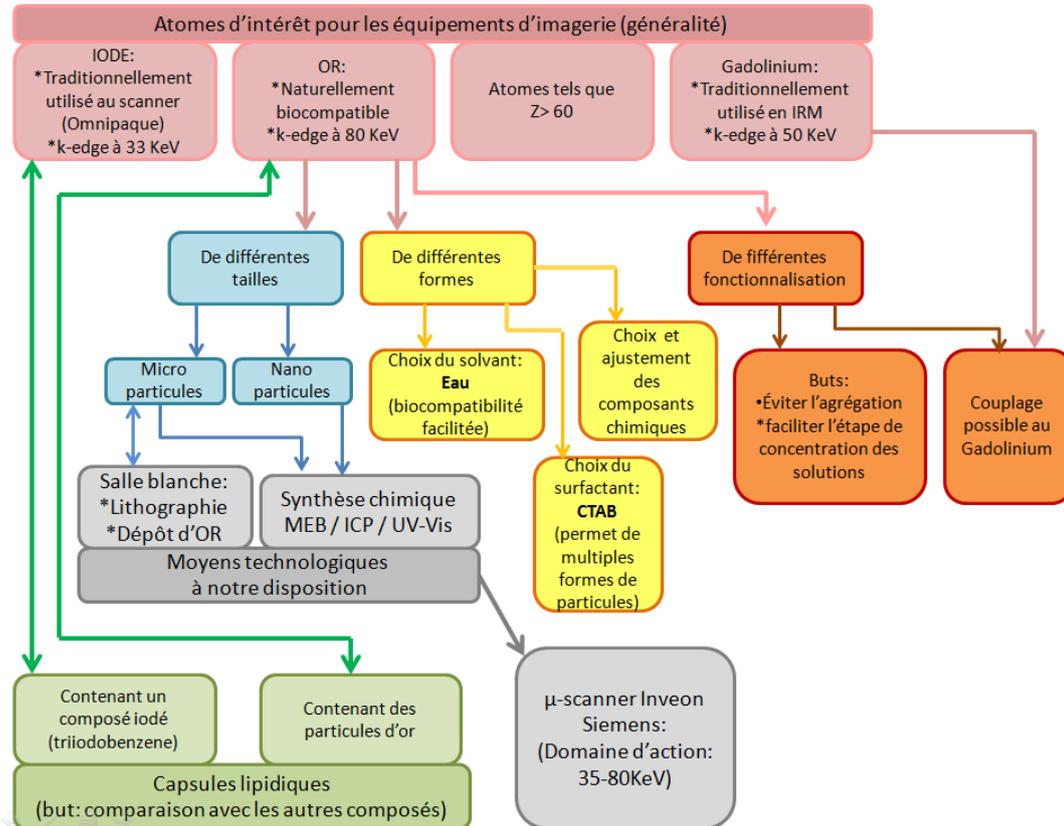


Fig 3-8 : Démarche menée lors de la synthèse de nos particules.

Dans ce troisième chapitre nous avons réalisé nos propres synthèses de particules, et en fonction des résultats obtenus, nous avons cherché à expliquer certains de nos échecs en étudiant de plus près les articles de la littérature qui détaillent les processus chimiques mis en jeu.

Nous avons travaillé sur deux approches : la première utilise les techniques de micro/nano fabrication, la seconde les techniques de synthèse chimique classique.

La fabrication de micro et nanoparticules peut relever de deux stratégies (figure 3-9) :

Top-Down (qui consiste à « découper » un élément volumineux, de manière à produire des structures plus petites), ou **Bottom-Up** (qui consiste à assembler des blocs, ici des atomes, pour produire un élément de taille supérieure) :

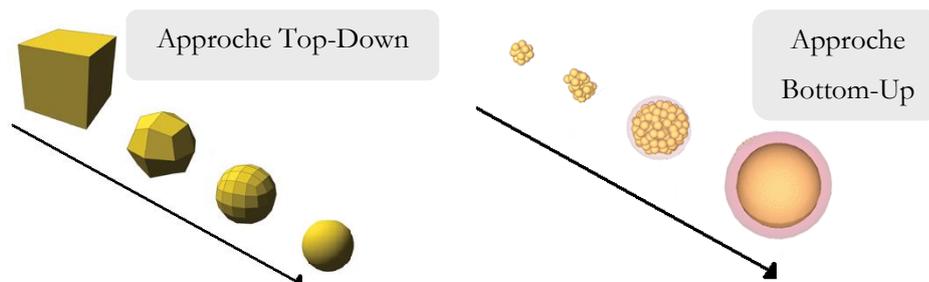


Fig 3-9 : Stratégies de fabrication des nanoparticules .

L'approche Top-Down est envisageable lorsque l'on souhaite produire des particules de taille micrométrique. Dans le cas des structures nanométriques, elle n'est plus très adaptée, ou peut engendrer des coûts élevés, notamment en lithographie électronique. Il faut alors employer l'approche Bottom-Up.

Les particules ont différentes formes, cubiques, pyramidales, aiguilles, qui se différencient de la forme sphérique usuellement utilisée par les biologistes. La taille de nos particules varie entre quelques dizaines de nanomètres et un micromètre suivant la technique de fabrication.

Par la suite, nous avons vérifié l'influence d'une part, des paramètres clés de réglages de l'équipement scanner auquel nous avons accès par notre partenariat avec le CHRU de Lille, et d'autre part, des paramètres physiques (densité des matériaux, valeur des sauts K-edge) inhérents à la théorie en imagerie médicale. Nous avons comparé nos particules d'or à des composés iodés traditionnellement utilisés dans les protocoles cliniques classiques.

Enfin, dans le chapitre 4, nous avons également comparé nos particules d'or seules à des capsules lipidiques chargées par un composé iodé ou par des particules d'or que nous avons synthétisées.

Concernant spécifiquement la synthèse des particules d'or traitée dans ce chapitre 3, le déroulement est le suivant (figure 3-10):

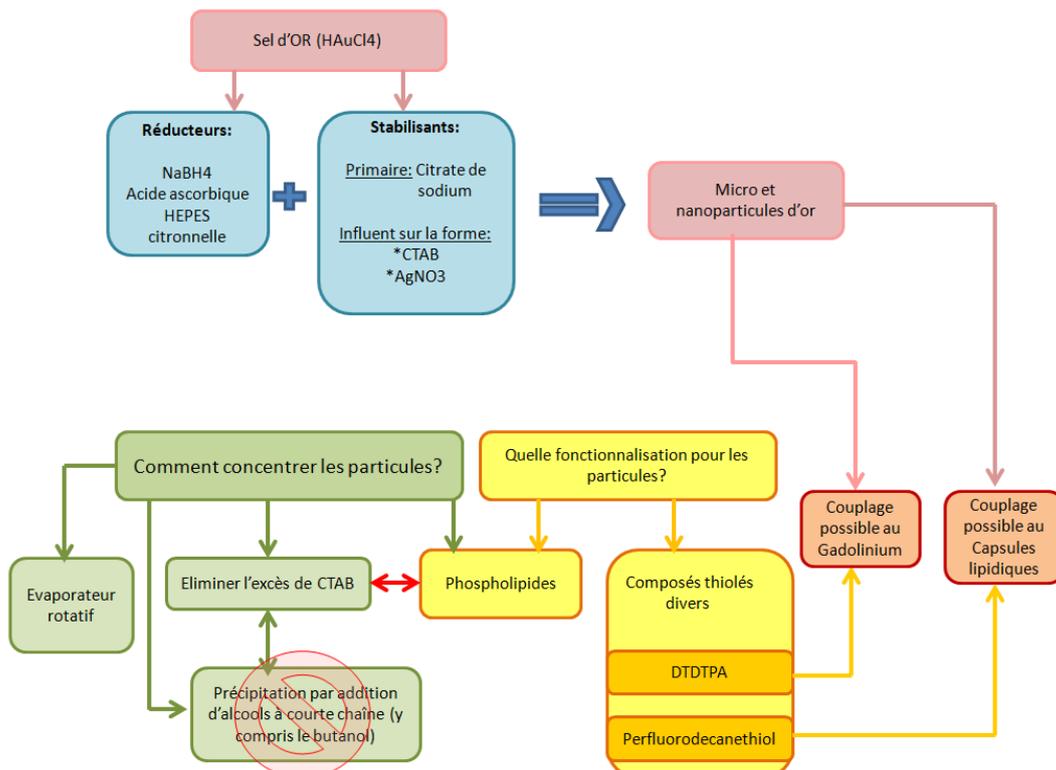


Fig 3-10 : Démarche menée lors de la synthèse de particules d'or.

Chaque partie de ces logigrammes est traitée de façon théorique, puis nos résultats expérimentaux s'y référant sont présentés dans la prochaine section de ce manuscrit.

2) Fabrication de microparticules d'or pour l'imagerie médicale - Etat de l'art

On pourra se référer aux techniques permettant de travailler les wafers de silicium, qui ont été présentées dans le chapitre 1.

Brièvement, le procédé implique une étape de lithographie (cf page 16), impliquant l'utilisation d'un masque quartz/chrome pour insoler localement un dépôt de résine photosensible (celle-ci ayant préalablement été enduite sur une plaquette de silicium par spin-coating). La résine est ensuite développée dans un bain liquide, et l'étape de gravure (cf pages 18 à 21), qui peut être physique (cas de nos microparticules cubiques) ou chimique (cas de nos microparticules pyramidales) peut être réalisée. Enfin, il est nécessaire d'effectuer un dépôt préalable d'un matériau sacrificiel avant d'effectuer le dépôt final du métal qui constituera les microparticules.

L'ensemble du procédé que nous avons personnellement utilisé pour fabriquer nos microparticules est décrit au paragraphe 4) « Fabrication de microparticules d'or par approche Top-Down pour l'imagerie médicale - Résultats » page 121.

3) Synthèses de nanoparticules d'or pour l'imagerie médicale - Etat de l'art

La fabrication de nos solutions de nanoparticules s'est appuyée sur des articles existants, mais nos « recettes » finales sont personnelles. Un ajustement des multiples paramètres (figure 3-11) dont dépendent les synthèses a été obligatoire, afin d'obtenir des résultats satisfaisants. Certains paramètres ont été bloqués (par exemple la température) afin de diminuer le nombre d'inconnues en jeu.

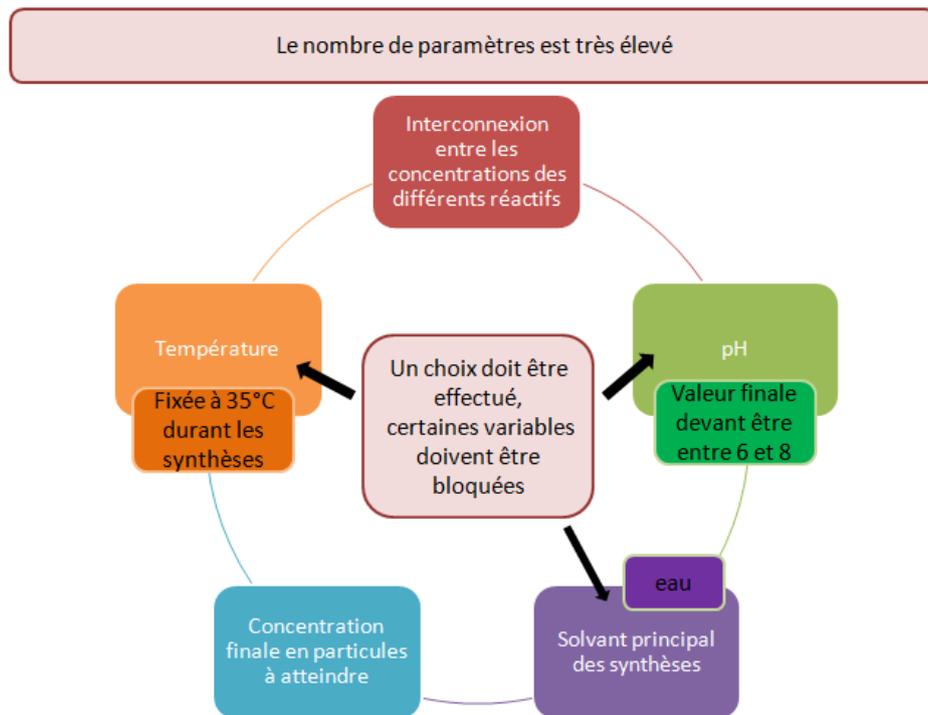


Fig 3-11 : Multiplicité des paramètres en jeu.

Les articles de bibliographie présentés ci-après ont servi de référence afin de contrôler la qualité de nos solutions (essentiellement par comparaison entre les spectres UV-Vis obtenus pour certaines formes de particules et les nôtres). Ils ont également permis de comprendre les raisons pour lesquelles certaines de nos synthèses n'ont pas donné de résultats satisfaisants (discussion concernant la quantité nécessaire et le rôle du surfactant CTAB, rôle et problèmes engendrés par l'utilisation de nitrate d'argent.....etc...).

Nous avons réuni ces informations bibliographiques afin de tester, analyser et assembler les meilleurs paramètres, en nous inspirant des synthèses types les plus populaires dans la communauté scientifique.

a) Exemples de synthèses existantes dans la littérature

Des extraits de ces articles sont présentés en Annexe 9 page 223.

Titre de l'article	Auteur principal
Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods	Jana ¹⁹⁵
An improved synthesis of high aspect ratio gold nanorods	Busbee ¹⁹⁴
Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution	Sau ¹⁶³
Room temperature high yield synthesis of multiple shapes of gold nanoparticles in aqueous solution	Sau ¹⁴⁹
Direct high yield synthesis of high aspect ratio gold nanorods	Wu ¹³⁸
Gold nanorods influence of various parameters as seed solvent surfactant on shape control	Jiang ¹³⁹
Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed mediated growth method	Nikoobakht ²³⁶
Mechanism of silver(I) assisted growth of gold nanorods and bipyramids	Liu ¹⁷⁸
High temperature seedless synthesis of gold nanorods	Zijlstra ¹⁶⁵
Direct monitoring of gold nanorod growth	Seo ¹⁴⁰
Influence of iodide ions on the growth of gold nanorods: tuning tip curvature and surface plasmon resonance	Grzelczak ¹⁴¹
Achieving high purity colloidal gold nanoprisms and their application as biosensing platforms	Guo ¹⁴²
Controlling the morphology of multibranching gold nanoparticles	Ahmed ¹⁴³

b) Caractérisation par spectroscopie UV-VIS

Les particules d'or synthétisées peuvent être étudiées par un moyen rapide : la spectrométrie UV-visible (figure 3-12). Un faisceau lumineux monochromatique d'intensité initiale I_0 passe au travers de l'échantillon d'épaisseur L à analyser. Il en ressort avec une intensité I_s . La procédure est répétée pour une plage de longueur d'onde allant de l'UV (≈ 180 nm) au proche infrarouge (≈ 1200 nm). Un second faisceau effectuée en parallèle le même balayage dans une solution de référence.

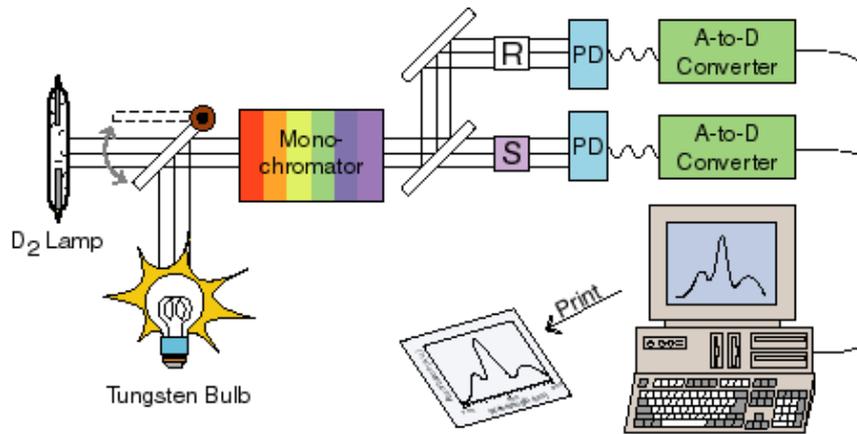


Fig 3-12 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre UV-Vis.

La loi de Beer-Lambert permet de faire le lien entre les intensités des faisceaux, l'absorbance A et concentration C de la solution: $A = \log(I_0 / I_s) = e * L * C$

Le coefficient d'extinction e peut être déterminé de plusieurs manières. Par exemple, en 2006, Jain *et al.* ont calculé les courbes d'extinction pour des sphères et des nanofils d'or (la figure 3-13 est adaptée de la référence 151) ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵, et en 2007 Liu *et al.* ont proposé une relation linéaire entre le coefficient d'extinction, la concentration de nanoparticules d'or sphériques et leur taille (figure 3-14) ¹⁴⁶ :

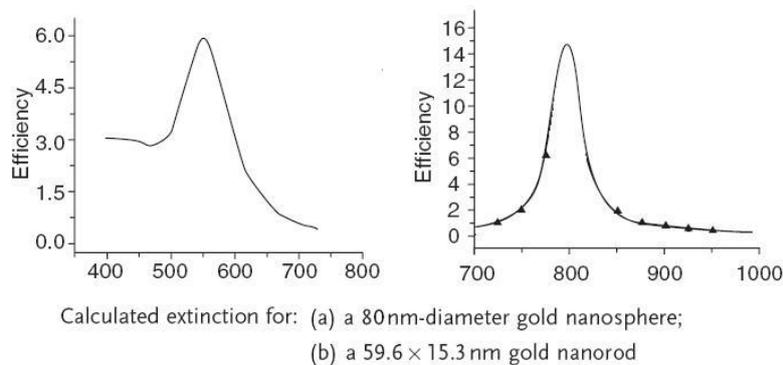


Fig 3-13 : Spectres d'extinction calculés pour des nanosphères d'or de 80 nm de diamètre à gauche, et pour des nanofils d'or de 60 nm de long à droite ¹⁴⁶.

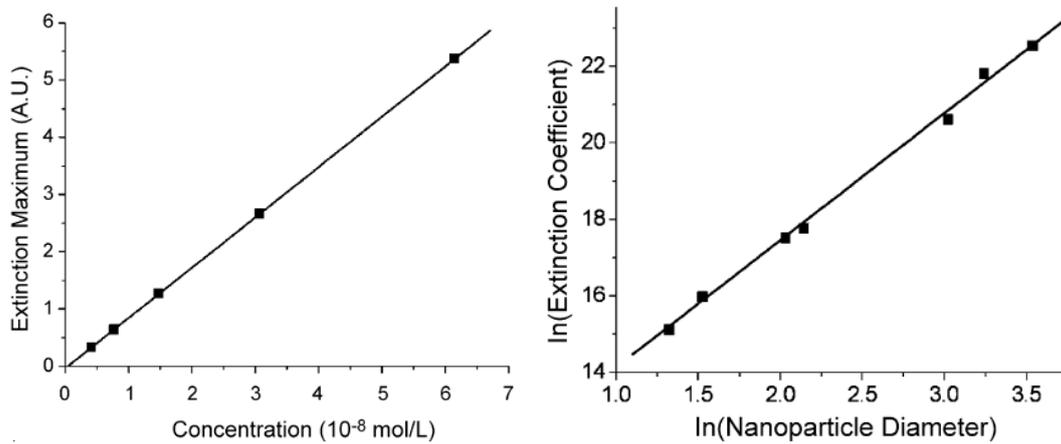


Fig 3-14 : Courbes démontrant les relations de linéarité entre, d'une part, la concentration en nanoparticules d'une solution et le maximum d'extinction du spectre et d'autre part, la taille des nanoparticules et le maximum d'extinction en échelle logarithmique ¹⁴⁶.

L'absorption de la lumière UV-VIS est due à des transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie, au niveau des atomes. Ces transitions extrêmement nombreuses et simultanées donnent naissance à un spectre à bande large plutôt qu'à des pics fins distincts (figure 3-15):

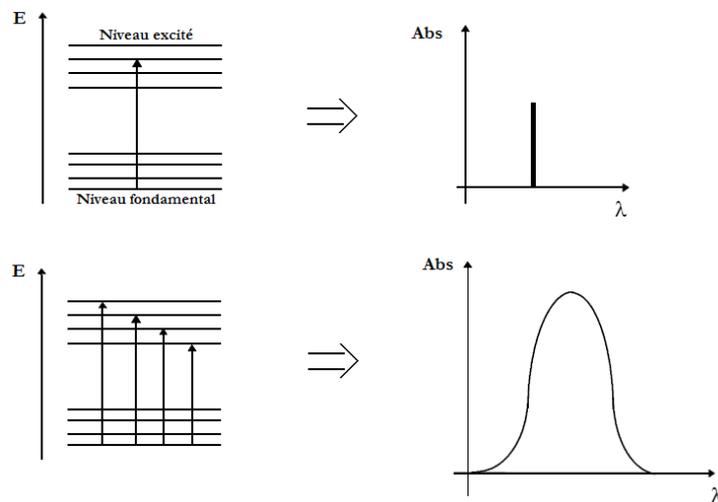


Fig 3-15 : Les transitions électroniques sont à l'origine des spectres UV-Vis.

L'autre conséquence est l'inversion de couleur (figure 3-16) qui résulte de l'absorption de la lumière incidente. Par exemple, une solution qui absorbe entre le cyan et le vert (≈ 510 nm) apparaîtra rougeâtre à l'œil. C'est le cas des solutions de nucléation.

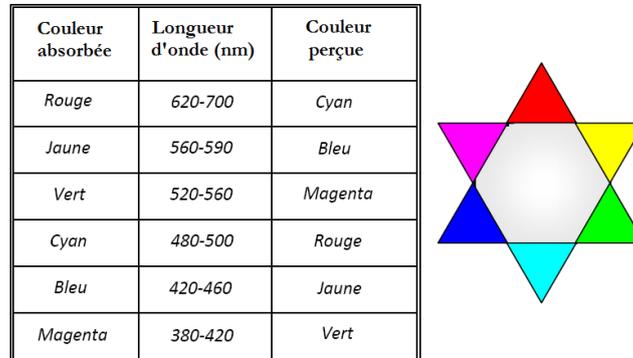


Fig 3-16 : Relation entre couleur absorbée et couleur perçue.

Enfin, lors de son absorption, la lumière interagit avec les particules métalliques, en créant des dipôles, qui oscillent en phase avec le champ électrique de la lumière incidente.

Pour une sphère, le phénomène est homogène dans toutes les directions, tandis que pour une particule de forme plus spécifique cela crée des oscillations dont les directions sont plus marquées. Les nanofils d'or possèdent ainsi deux modes d'oscillation, un mode transverse et un mode longitudinal, qui sont caractérisés par deux bandes distinctes en spectrophotométrie UV/Visible.

Le pic longitudinal peut être prédit par l'équation $\lambda_{\max} = 445.4 + 90,6 \cdot R$, où R est le rapport d'aspect de la particule. $R = L/l$, L étant la longueur et l la largeur ¹⁵¹.

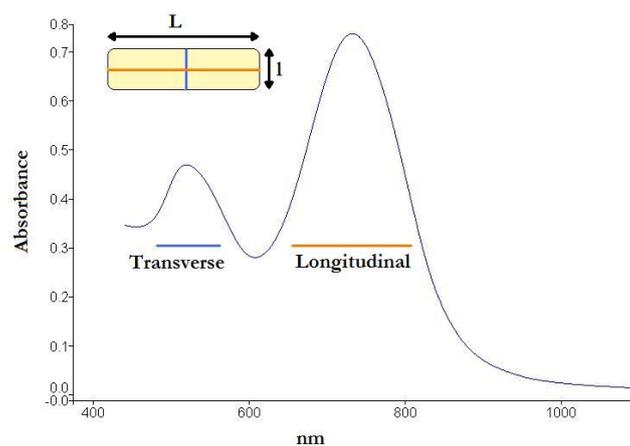


Fig 3-17 : Double bande caractéristique du spectre UV-Vis d'une solution de nanofils d'or et emplacement des modes transverse et longitudinaux.

Les autres types de particules ont des spectres beaucoup plus variables¹⁴⁷, et parfois difficiles à différencier car il existe un recouvrement des zones de localisation des spectres selon les longueurs d'onde (figure 3-18)¹⁴⁸.

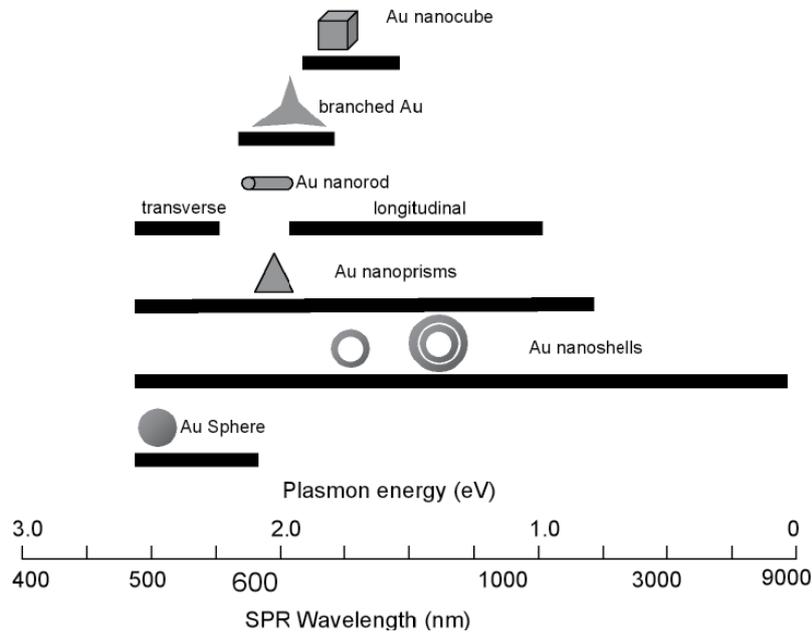


Fig 3-18 : Localisation des bandes caractéristiques des spectres UV-Vis en fonction de la forme des nanoparticules¹⁴⁸.

On pourra retenir les exemples suivants dans la littérature comme modèles de spectres à obtenir pour certaines formes spécifiques (figures 3-19 à 3-27) :

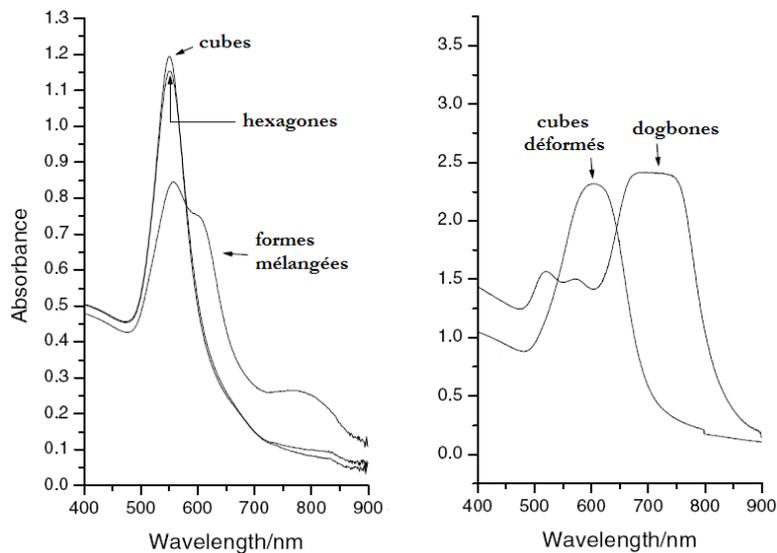


Fig 3-19 : Spectres UV-Vis caractéristiques de nanoparticules d'or, synthétisées en milieu aqueux contenant du bromure de cetyltriméthylammonium, et de formes variées¹⁴⁹.

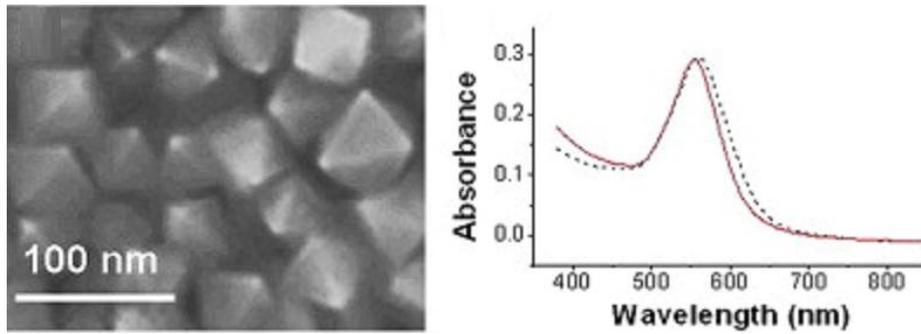


Fig 3-20 : Image MEB et spectre UV-Vis caractéristique de nanoparticules d'or synthétisées en milieu aqueux, et de forme bipyramidale régulière à base carrée ¹⁵⁰.

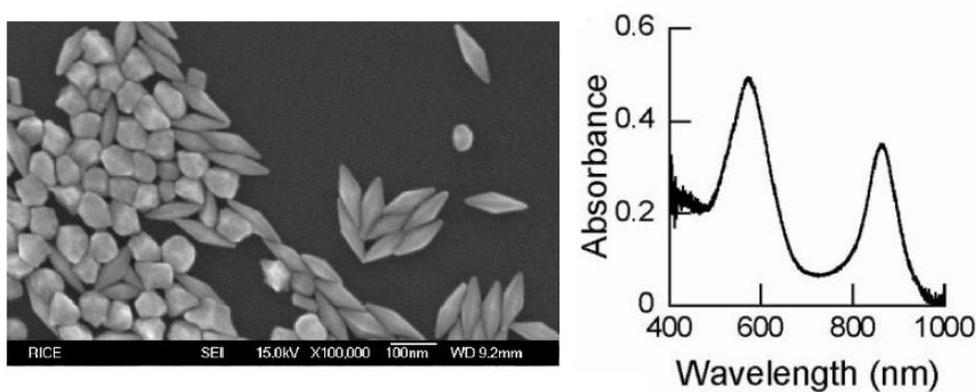


Fig 3-21 : Image MEB et spectre UV-Vis caractéristique de nanoparticules d'or, synthétisées en milieu aqueux contenant du bromure de cetyltriméthylammonium et du nitrate d'argent, présentant une forme bipointe allongée ¹⁵¹.

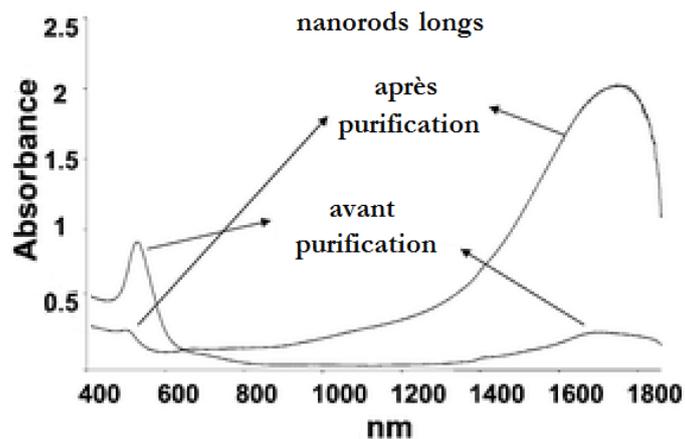


Fig 3-22 : Spectres UV-Vis caractéristiques de nanofils d'or longs, synthétisés en milieu aqueux contenant du bromure de cetyltriméthylammonium, avant et après purification ¹⁵².

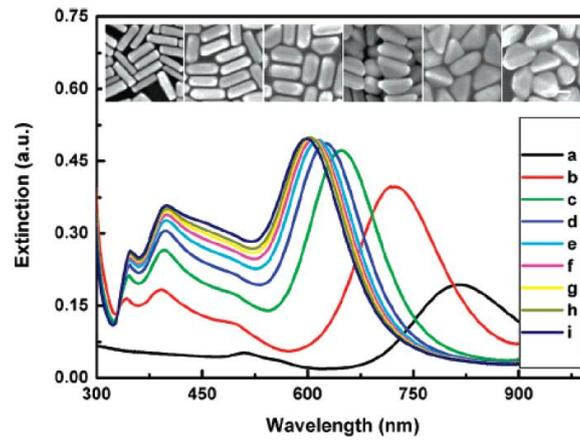


Fig 3-23 : Images MEB et évolution des spectres UV-Vis caractéristiques de nanofils d'or, synthétisés en milieu aqueux contenant du bromure de cetyltriméthylammonium, en fonction de leur accroissement de taille en largeur ¹⁵³.

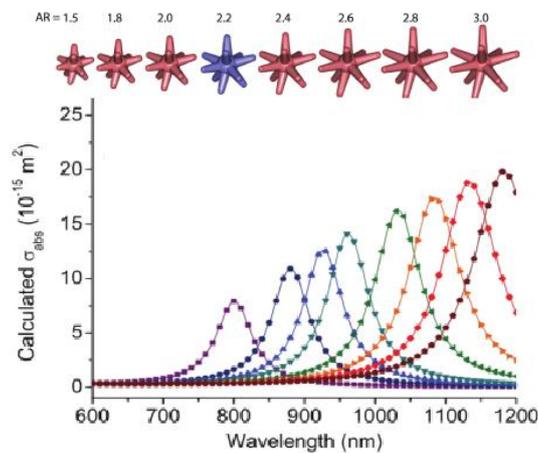


Fig 3-24 : Spectres UV-Vis caractéristiques de nanodendrites d'or, synthétisées en milieu aqueux contenant du buffer HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), en fonction de leur taille ¹⁵⁴.

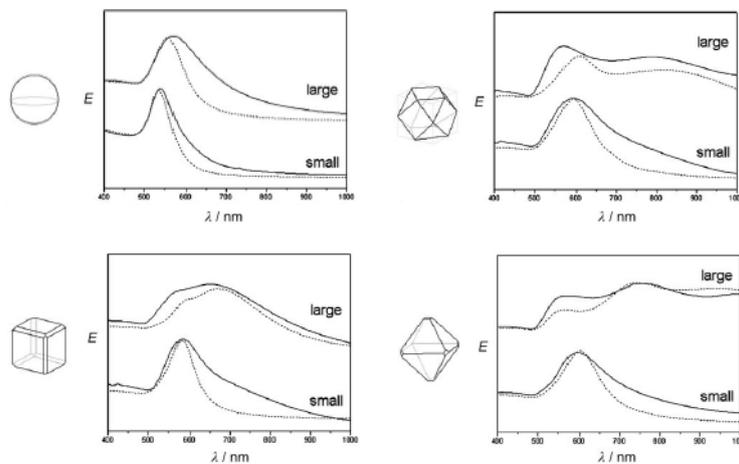


Fig 3-25 : Spectres d'extinction caractéristiques calculés pour diverses formes et tailles de particules d'or ¹⁵⁵.

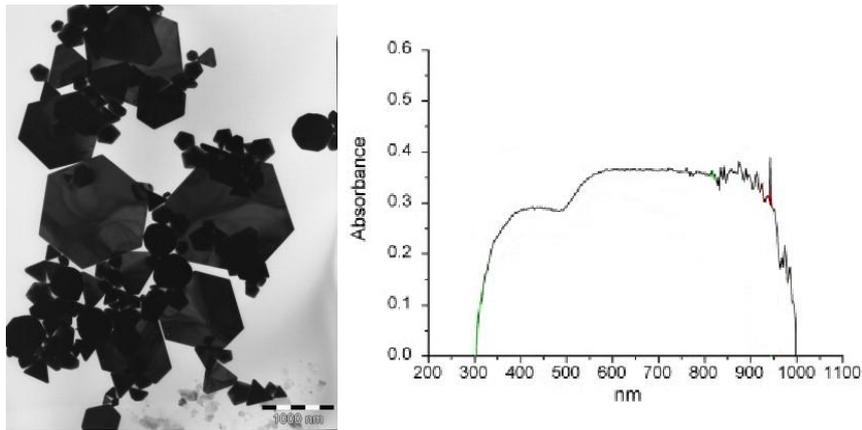


Fig 3-26 : Image TEM et spectre UV-Vis caractéristique de microparticules d'or, synthétisées en milieu polymère (1,2-propanediol et Poly(vinylpyrrolidone)), et présentant une forme de feuillets polyédriques¹⁵⁶.

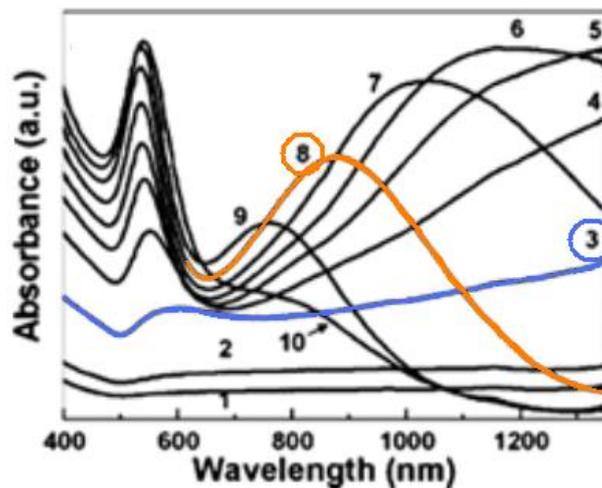


Fig 3-27 : Evolution typique (courbes 1 à 10) d'un spectre UV-Vis en fonction de la quantité de solution de nucléation ajoutée, les particules d'or sont des feuillets polyédriques, comme pour l'illustration précédente, mais ont été synthétisées en milieu aqueux contenant de l'extrait de citronnelle¹⁵⁷.

Enfin, on notera que le spectre d'absorption des nanoparticules se dégrade au cours du temps, selon un schéma d'évolution similaire à la dégradation due à une rampe en température (figure 3-28)¹⁵⁸. Cela est dû à la réversibilité de la réaction d'oxydo-réduction de l'or en solution, et démontre l'utilité d'une étape de purification des échantillons en fin de synthèse, afin de ne conserver que les particules métalliques dans un milieu « neutre ».

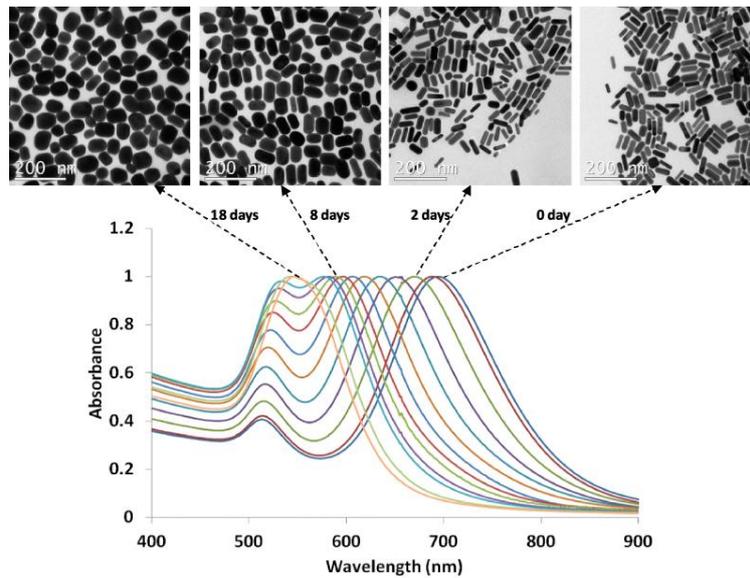


Fig 3-28 : Evolution au cours du temps de la forme des particules d'or et de leur spectre UV-Vis, lorsqu'elles sont conservées dans leur milieu de synthèse originel¹⁵⁸.

La méthode de contrôle de la qualité des solutions étant connue, nous pouvons nous intéresser aux particularités et aux interactions des divers composés chimiques en jeu lors d'une synthèse de nanoparticules d'or.

Les synthèses de nanoparticules d'or requièrent un dosage minutieux des ions en présence lorsqu'on souhaite obtenir une distribution homogène en taille pour une forme prédéfinie¹⁵⁹. Elle ne peut aboutir à des particules de forme bien définie que si les ratios entre composants sont strictement respectés¹⁶⁰. Le pH des solutions est également un paramètre important¹⁶¹⁻¹⁶².

Les articles référencés ci-après nous ont éclairés sur les relations entremêlées qui existent entre les différents composés chimiques, et nous ont permis de déduire un ordre à respecter dans leur ajout au milieu réactionnel, et d'appréhender les conditions les plus favorables pour nos synthèses (température, concentrations...).

c) Rôle du composé chimique HAuCl_4

Le sel d'or (HAuCl_4) employé pour synthétiser les particules d'or est un composé fragile, hygrométrique, qui doit être manipulé en utilisant des spatules plastiques antistatiques. L'emploi de spatules métalliques conventionnelles noircit de manière macroscopique le composé, et le rend inactif dans les synthèses (ce fut le premier problème que nous avons identifié, après avoir obtenu plusieurs synthèses décevantes).

Trois principales techniques de gravure de l'or métallique permettent d'aboutir à ce composé :

- ✓ Le mélange d'acides HCl/HNO₃, a un effet très oxydant puisqu'il mène à la formation d'oxychlorure d'azote NOCl, et les radicaux chlorés formés permettent la dissolution de l'or métallique en complexe chloré HAuCl₄. Cette gravure a une vitesse approximative de 10µm/min à température ambiante.

$$\text{HNO}_3 + 3 \text{HCl} \rightarrow \text{NOCl} + \text{Cl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$$

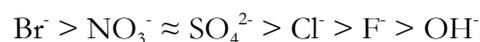
$$\text{Au}_{(s)} + 3\text{NO}_3^-_{(aq)} + 6\text{H}^+_{(aq)} + 4\text{Cl}^-_{(aq)} \rightleftharpoons \text{AuCl}_4^-_{(aq)} + 3\text{NO}_{2(aq)} + 3\text{H}_2\text{O}_{(l)}$$
- ✓ Les composés cyanurés (NaCN, KCN...) permettent aussi la dissolution de l'or, par formation de cyano-complexes Au(CN)₂
- ✓ L'iode (I₂) a une action sur l'or métallique selon l'équation : $2 \text{Au} + \text{I}_2 \rightarrow 2 \text{AuI}$, tandis que l'ajout en excès d'iodure de potassium (KI) renforce cette action. En effet, un mélange aux proportions telles que (KI : I₂ : H₂O) = (4 g : 1 g : 40 ml) donne une vitesse de gravure de l'ordre de 1µm/min à température ambiante.

d) Rôle des agents stabilisants

i. Cas du nitrate d'argent :

Le nitrate d'argent (AgNO₃) est utilisé pour synthétiser des nanofils courts. En effet, il a été observé qu'une petite quantité de ce composé permettait d'augmenter significativement le rendement de production des nanofils¹⁶³, en évitant la formation conjointe de particules sphériques. Afin de comprendre le mécanisme d'action de ce sel sur la formation des particules d'or, diverses études ont été menées, portant soit sur l'ion NO₃⁻, soit sur l'ion Ag⁺¹⁶⁴⁻¹⁶⁵.

Concernant l'ion NO₃⁻, des études ont utilisé divers acides (HCl, H₂SO₄, HNO₃...), ou encore du nitrate de sodium NaNO₃ (Wu *et al.*¹⁶⁶, Altansukh *et al.*¹⁶⁷, Kim *et al.*¹⁶⁸). Il en ressort que le paramètre pH reste prédominant, comparativement aux ions existant en solution. Cependant, le choix des ions impliqués reste important. Ainsi, en 2006, Kawasaki *et al.*¹⁶⁹ ont conclu que l'ordre d'affinité des ions avec la surface des particules d'or est le suivant :



On voit donc que l'ion NO₃⁻ occupe la seconde place, juste derrière Br⁻. Par ailleurs, en milieu acide cet ion peut venir perturber l'action de l'acide ascorbique lors des synthèses¹⁷⁰.

Enfin, l'influence du nitrate d'argent sur la synthèse des nanoparticules est étroitement liée à la température et au pH du milieu réactionnel^{171,172}.

ii. Cas du bromure de cetyltriméthylammonium :

Ce surfactant (CTAB, dont la formule $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$ est donnée en figure 3-29) est très prisé. Il fait partie de la catégorie des surfactants cationiques:

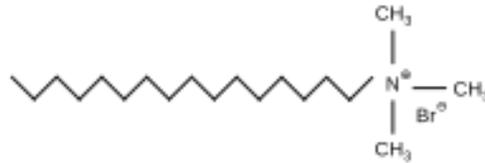


Fig 3-29 : Molécule de CTAB.

Les solutions de nucléation produites avec du CTAB sont beaucoup moins réactives que celles issues d'une synthèse en présence de réducteurs forts (ex : borohydrure de sodium) et de stabilisants faibles (ex : citrate de sodium)

Le CTAB est très fréquemment utilisé lors des synthèses de particules d'or car il permet d'obtenir des particules de formes diverses.

Cependant, une polémique le concernant existe. Elle concerne la potentielle « contamination » des lots de CTAB des fournisseurs par des impuretés, et notamment de l'iode¹⁷¹⁻¹⁷²⁻¹⁷³⁻¹⁷⁴.

Les mécanismes d'action du CTAB dans les synthèses sont liés à plusieurs données de base :

✓ Paramètre d'empilement p :

Le paramètre d'empilement p permet de prédire la forme des micelles en solution. Il est fortement influencé par les sels ajoutés en cours de synthèse. Comme ce paramètre a pour valeur 0,42 dans l'eau déionisée pour le CTAB, on en déduit que les micelles formées seront de forme cylindrique allongée, en forme de nanofils, conformément au tableau ci-après (figure 3-30).

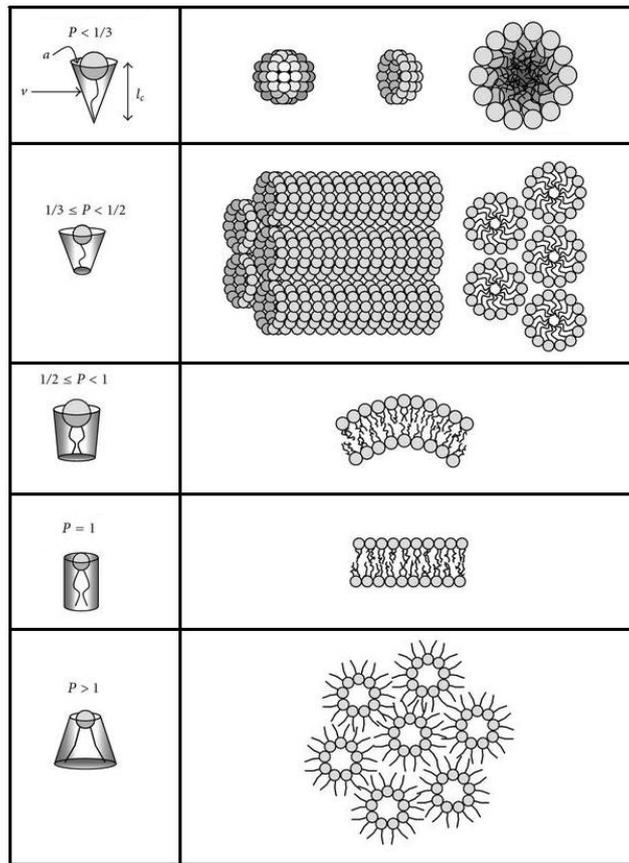


Fig 3-30 : Influence de la valeur du paramètre p sur la forme des micelles en solution ¹⁷⁵.

Le CTAB possède également le diagramme suivant (donné à la figure 3-31)^{175,176} (comme tout autre composant pouvant former des phases reliées à la théorie des cristaux liquides) :

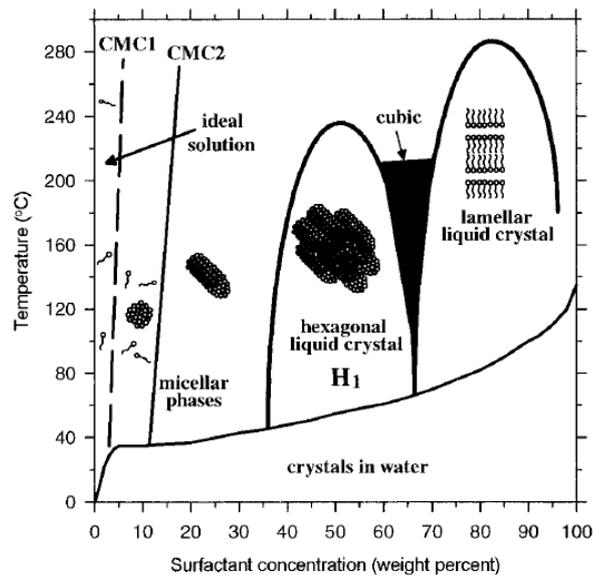


Fig 3-31 : Forme des micelles et de leur assemblage en solution en fonction de la température et de concentration de CTAB en solution dans l'eau ¹⁷⁶.

En 1994, Choudhury *et al.*¹⁷⁷ ont reporté les valeurs de transition suivantes :

Monomères	Micelles sphériques	Micelles sphériques	Micelles cylindriques « dures »	Micelles cylindriques « dures »	Micelles cylindriques « flexibles »	Micelles cylindriques « flexibles »	Micelles hexagonales
	0,95 mM	125 mM		400 mM			1 M

✓ Interaction avec le nitrate d'argent $AgNO_3$:

- Dépôt d'argent métallique à la surface des particules d'or¹⁷⁸ :

Normalement, la réduction d'ions Ag^+ en Ag^0 par de l'acide ascorbique en milieu aqueux contenant du CTAB ne peut se produire, de manière macroscopique, que si le pH est basique¹⁷⁹.

Cependant, il est connu qu'à l'échelle nanométrique (voire atomique), le dépôt d'une fine couche de métal sur un autre métal est possible à un potentiel plus haut que pour l'échelle macroscopique. Ce mécanisme est appelé « dépôt sous potentiel » ou encore « dépôt sous-nernstien » (ce qui signifie que le dépôt a lieu à des potentiels plus positifs que le potentiel à courant nul de l'électrode métal massif/ion métal).

Bien sûr, les nanofils, les « ϕ -shaped » qui sont des bipointes (\neq bypyramides), les « dumbbells » (forme de haltères) et les « dogbones » (os de chien) sont les particules pour lesquelles ce phénomène est le plus intéressant, puisqu'il permet et entrave à la fois leur croissance en solution.

Les nanofils ont eux un aspect cristallographique qui dépend du type de solution de nucléation employée. Le mécanisme de dépôt de l'argent a également été imagé par Orendorff *et al.* (figure 3-32)¹⁸⁰ :

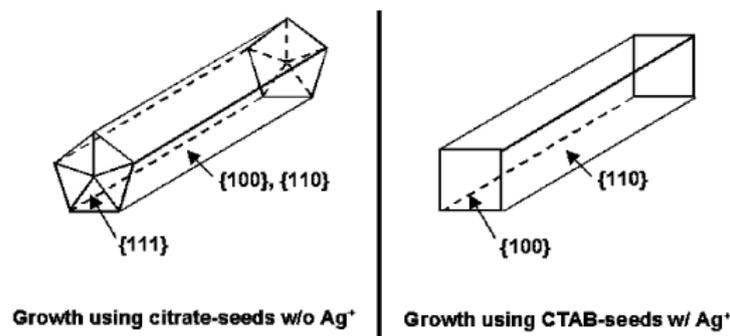


Fig 3-32 : Influence des ions argent sur la croissance et la cristallographie des nanofils d'or¹⁸⁰.

- Dépôt de bromure d'argent à la surface des particules d'or :

L'ajout du nitrate d'argent lors des synthèses doit impérativement se faire après celui du réducteur choisi (souvent, l'acide ascorbique). En effet, son ajout prématuré empêche le développement de particules de forme anisotrope, et crée des complexes de type $[AgBr-CTA^+]$, qui noircissent en solution¹⁸¹⁻¹⁸²⁻¹⁸³.

e) purification et fonctionnalisation des échantillons:

i. Démarche

Le coefficient de partage P (LogP) est l'un des critères permettant de planifier les étapes de solubilisation, concentration et purification des nanoparticules.

Le choix d'une molécule fonctionnalisante se fait en considérant son LogP. Cette fonctionnalisation peut également permettre aux nanoparticules de passer d'une concentration naturellement faible en milieu aqueux à une concentration beaucoup plus élevée en milieu organique.

En effet, les synthèses en phase aqueuse que nous avons privilégiées mènent à des concentrations finales en particules peu élevées (de l'ordre de 10^{-4} mol/l). Néanmoins, les analyses par CT-scanner nécessitent des concentrations 100 fois plus élevées. En conséquence, nous avons dû mettre au point une étape de concentration de nos solutions.

ii. Cas du CTAB, en amont de la fonctionnalisation

Il est à noter qu'un phénomène d'agrégation ou d'aspect « ondulé » peut survenir lorsque la concentration en CTAB est insuffisante. Jain *et al.*¹⁸⁴ illustrent ainsi le phénomène (figure 3-33):

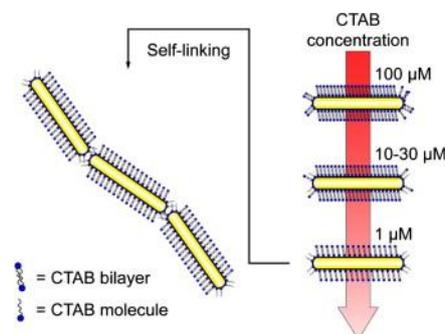


Fig 3-33 : Apparition du phénomène d'agrégation en fonction de la concentration en CTAB lors de la synthèse¹⁸⁴.

Le CTAB est un composé qui, sans être extrêmement nocif à l'échelle macroscopique, reste nuisible aux cellules^{185,186,187}. Il faut donc **purifier** les échantillons, qui en contiennent une importante quantité.

Deux méthodes ont été tentées sans succès :

- ✓ Précipitation par addition d'alcools à courte chaîne (page 160)
- ✓ Concentration par utilisation des propriétés du système CTAB / butanol / eau (page 160)

Une méthode a permis d'atteindre nos objectifs :

- ✓ Concentration et fonctionnalisation par phospholipides (page 162)

Cette voie de purification des échantillons consiste à utiliser un mélange chloroforme/phosphatidylcholine, afin d'effectuer un échange de ligands à la surface des particules d'or (figure 3-34)^{188,189}.

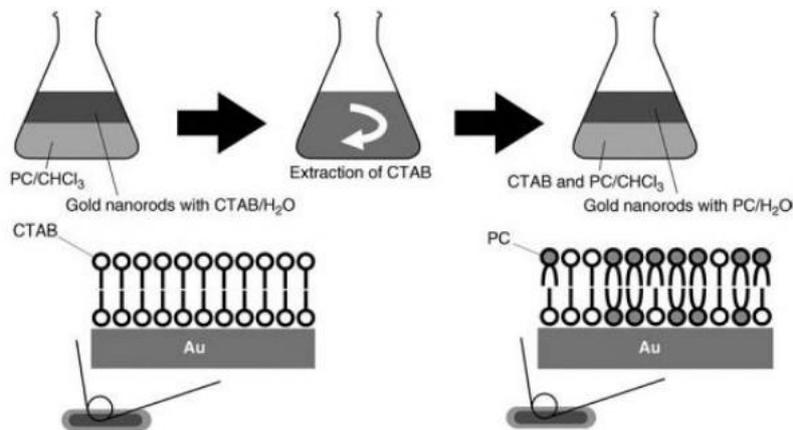


Fig 3-34 : Procédé de séparation des nanofils d'or du CTAB par échange de ligand au profit de la phosphatidylcholine¹⁸⁸.

L'action combinée du mélange chloroforme/phosphatidylcholine est la suivante : la phosphatidylcholine se substitue au CTAB pour recouvrir les particules d'or, tandis que le CTAB migre dans la phase organique.

Lorsque l'on choisit les ratios (solvant/soluté/eau) de façon à ce que l'on ait deux phases distinctes, les particules peuvent se regrouper à l'interface eau/chloroforme (cas 2Φ dans le diagramme de la figure 3-35 ci-après):

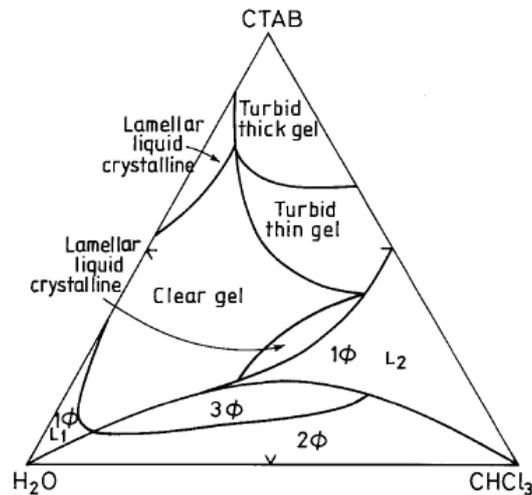


Fig 3-35 : Diagramme ternaire CTAB/eau/chloroforme.

Les particules peuvent être récupérées et ainsi concentrées à l'aide d'une ampoule à décanter.

iii. Fonctionnalisation des échantillons

L'enjeu de la fonctionnalisation est de taille. Les particules devront en effet supporter des conditions extrêmes lors d'essais *in vitro* ou *in vivo*.

➤ Phospholipides :

Cette fonctionnalisation (qui découle de l'étape de purification des particules) possède un autre avantage pour les particules d'or: il est possible d'utiliser ce type de molécules afin de fabriquer des capsules lipidiques de vectorisation.

➤ Composés thiolés :

L'emploi de composés thiolés permet aussi un échange de ligands à la surface des particules. En effet, les groupements soufrés possèdent une grande affinité pour les atomes d'or. Il est possible d'exploiter cette propriété par deux approches :

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une unique fonction thiol :

On s'inspire ici des méthodes de synthèse en milieu biphasique de Brust *et al.*¹⁹⁰, Thierry *et al.*¹⁹¹ et Wijaya *et al.*¹⁹². La dissolution de thiols dans un solvant organique est suivie de l'ajout de la solution aqueuse de particules. Cette méthode permet d'assurer une bonne solubilité dans les solvants apolaires.

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une fonction thiol à une extrémité, et une fonction amine ou acide carboxylique à l'autre extrémité :

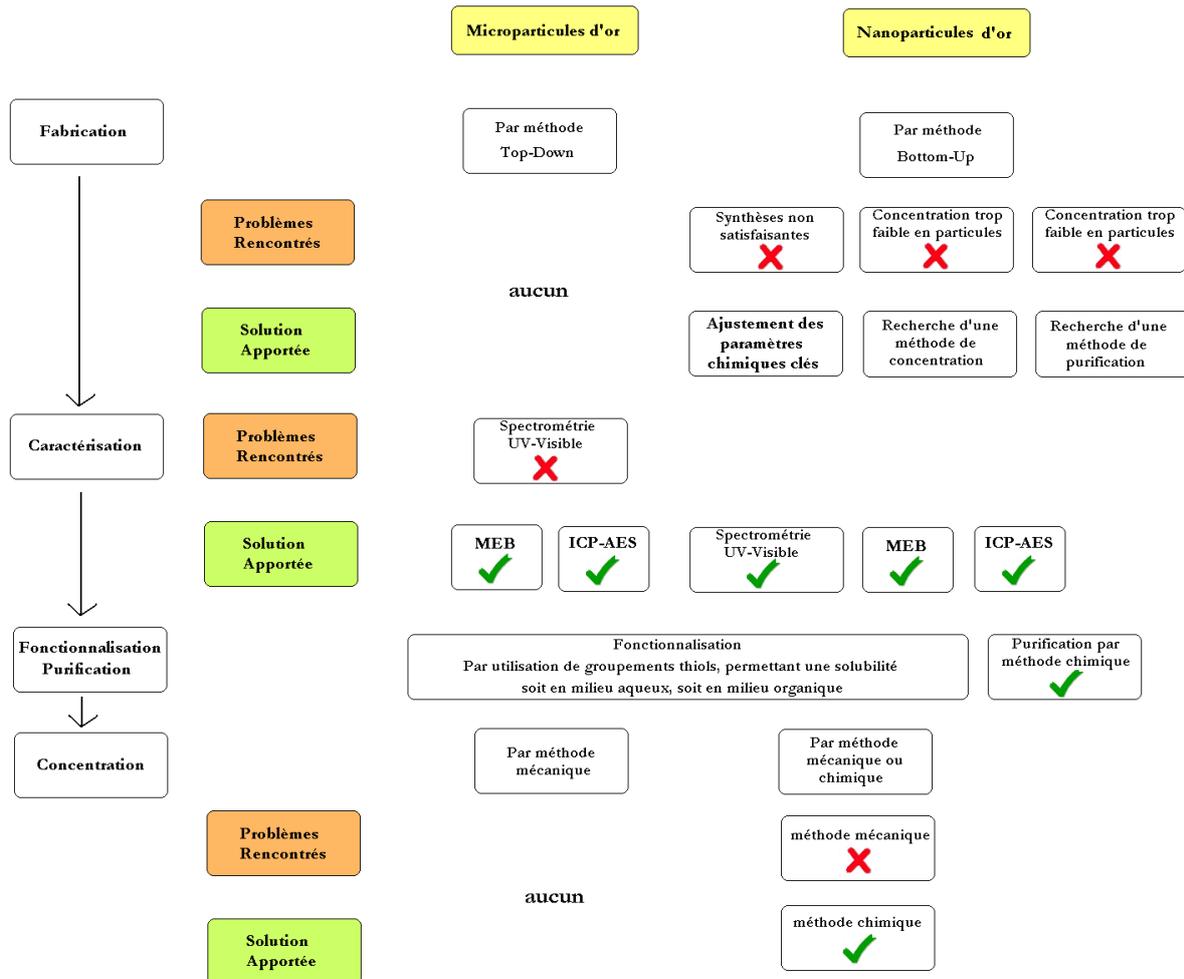
Nous avons utilisé cette méthode. L'emploi de ces thiols permet de conserver la solubilité en milieu aqueux des particules.

La mise en pratique de ces **deux** différentes approches a été effectuée par l'utilisation des produits suivants (figure 3-36):

Composé	Formule	Log P
<i>O</i> -(2-Carboxyethyl)- <i>O'</i> -(2-mercaptoethyl) heptaethylene glycol	$\text{SHCH}_2\text{CH}_2 \left[\text{OCH}_2\text{CH}_2 \right]_7 \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	—
11-Mercaptoundecanoic acid	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	—
Cysteamine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$	—
1-Dodecanethiol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SH}$	5,67
Perfluorodecanethiol	Voir détails dans la section « capsules fluorées » (page 182)	—
Perfluorodecaline		8,33
D'TDTPA	Voir page 163	—

Fig 3-36 : Molécules que nous avons utilisées en tant que fonctionnalisation lors de nos synthèses.

Suite à cet état de l'art qui nous donne les éléments clés nécessaires à la compréhension des phénomènes en jeu, nous donnons ci-après les résultats de nos expérimentations. La succession des étapes que nous avons suivies est résumée dans le schéma ci-dessous.



Les détails spécifiques sont donnés dans les paragraphes ci-après.

4) Fabrication de microparticules d'or par approche Top-Down pour l'imagerie médicale - Résultats

Les microparticules d'or utilisées dans ce travail de thèse ont été fabriquées par approche Top-Down, en salle blanche. Les techniques décrites dans le premier chapitre de cette étude sont appliquées : enduction de résine par spin-coating, lithographie avec masque verre-chrome, développement, gravure humide.....

L'emploi de wafers de silicium comme substrat limite les types de formes de particules obtenues par cette méthode (cubiques, pyramidales ou en forme de disques). En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, ce matériau ne peut être gravé que de façon spécifique, selon ses plans cristallins (cf chapitre 1 page 21).

Le procédé de fabrication est décrit dans le tableau suivant (figure 3-37).

	Particules pyramidales	Particules cubiques
Enduction de résine et Lithographie	<ul style="list-style-type: none"> Déshydratation des wafers (orientés <100>) sur plaque chauffante à 200°C durant 5 min Dépôt de HMDS (hexaméthylsilazane) (v : 3000/a : 2000/t : 10) – capot fermé Dépôt de résine S1805 (résine positive de faible viscosité pour épaisseur de moins de 1 µm) (v : 3000/a : 2000/t : 10) – capot ouvert + détournage Recuit 3 min à 110°C Exposition UV (lithographie optique) en mode « vacuum contact » (8mW/cm² durant 3.9s) Développement avec révélateur MIF 319 entre 15s et 20s 	
Gravure de l'oxyde (SiO ₂)	<ul style="list-style-type: none"> Gravure RIE CHF₃/CF₄ – 180W – 50mT – 8min 	
Gravure mécanique du silicium	X	<ul style="list-style-type: none"> Plasma SF₆/O₂/N₂ (15/10/10) – 100W 15 mTorr – 5min
Gravure chimique du silicium	<ul style="list-style-type: none"> Retrait de la résine à l'acétone Bain de TMAH (TetraMethylAmmonium Hydroxyde) à 90°C durant 2 min 	X
Dépôt d'or	<ul style="list-style-type: none"> Dépôt par évaporation d'une combinaison 50nm Mo / 500nm Au 	
Libération des particules	<p>Au choix :</p> <ul style="list-style-type: none"> Quelques secondes dans une solution de HF à 50% Gravure au TMAH 	

Fig 3-37 : Procédé de fabrication de nos microparticules.

Ci-dessous, quelques images MEB (figure 3-38) des particules avant leur extraction du substrat :

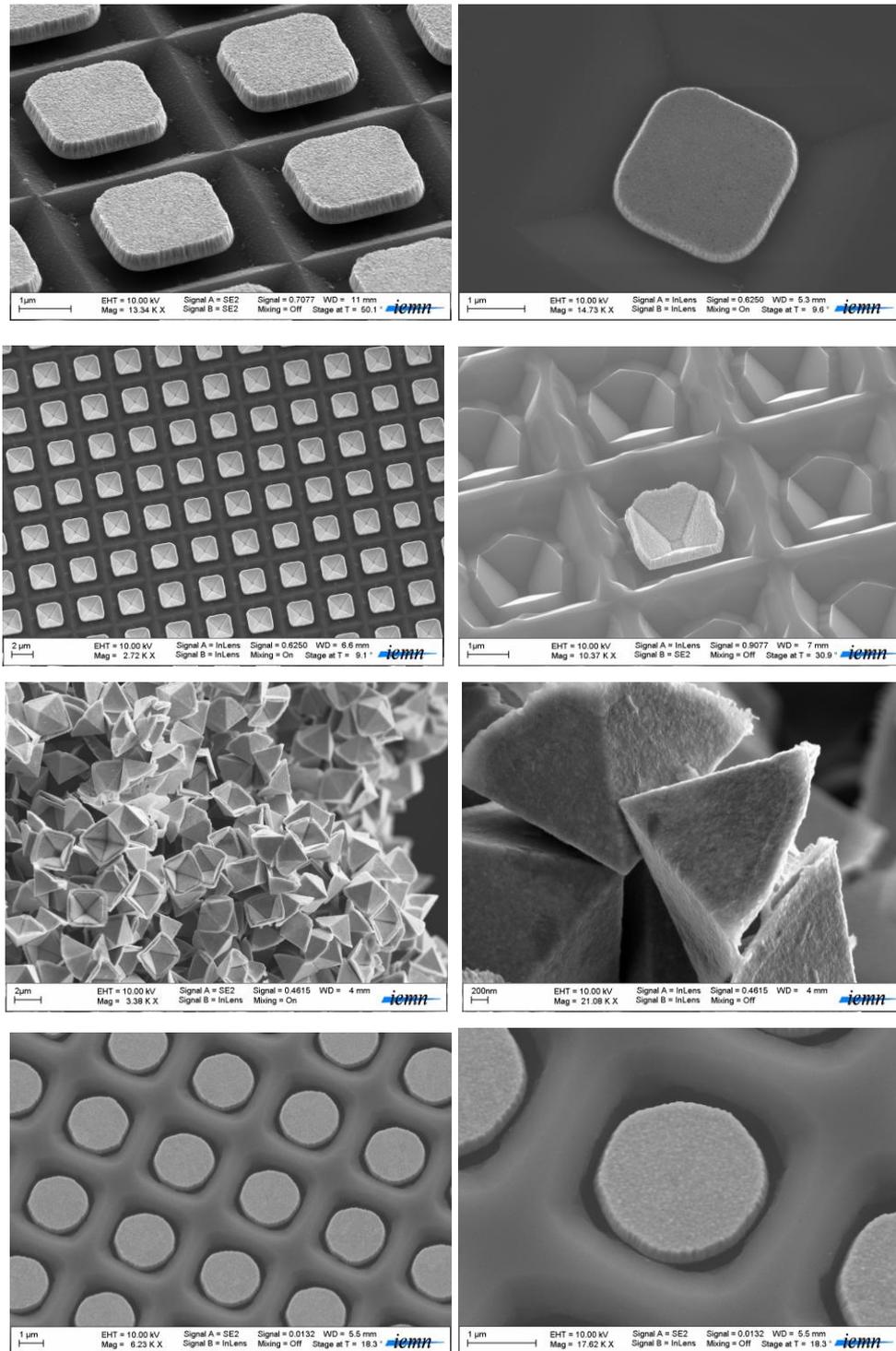


Fig 3-38 : Microparticules d'or sur substrat de silicium.

L'extraction peut se faire soit par gravure sélective de la couche de molybdène insérée entre le silicium et l'or, soit par gravure directe du silicium au TMAH (TetraMethylAmmonium Hydroxyde). Ces deux types de gravure extrêmement rapides ne nécessitent que quelques minutes au maximum.

Le molybdène se révèle sensible à l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 très concentré, 30%). Par ailleurs, il est possible de réaliser la fonctionnalisation des particules durant cette étape, en ajoutant à la solution de gravure un composé thiolé (en large excès), soluble dans l'eau, au choix parmi les composés listés en page 119. L'ajout d'acétate d'ammonium permet de faciliter la gravure et la fonctionnalisation par les fonctions thiols, puisque le milieu est rendu basique. Le TMAH a également un pH basique. Il grave simultanément le molybdène et le silicium (gravure anisotropique), mais doit être utilisé à chaud (70-90°C).

On peut approximer le nombre de particules d'or sur les wafers à forte densité (particules de $1\mu m$ de côté espacées de $1\mu m$ environ) à 250 millions d'unités, ce qui représente un poids d'or avoisinant 2,5.mg. Il nous faut produire au minimum 5 wafers pour réaliser une échelle de test sur l'équipement μ scanner.

Indications complémentaires :

- Purification : non nécessaire
- Concentration : par méthode mécanique
- Fonctionnalisation : par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (D'TDTPA) page 179 ci-après

5) Synthèses de nanoparticules d'or pour l'imagerie médicale - Résultats

a) Synthèses initiales de particules d'or, problèmes rencontrés

Partant des données bibliographiques recueillies, nous avons dans un premier temps effectué la reproduction à l'identique de diverses synthèses décrites dans des articles de la littérature.

[Les articles proposés dans l'annexe 9 page 223 en font partie.](#)

Ces premiers résultats ont été plutôt décevants. Les solutions d'ensemencement (« seed ») étaient peu homogènes (fig 3-39 ci-dessous), les particules de petite taille facettées étaient prédominantes (figs 3-40 à 3-42 ci-dessous), le rendement était mauvais (figs 3-40 à 3-42 ci-dessous), et parfois la croissance des nanofils était très visible, avec un aspect « ondulé » (fig 3-

43), que nous avons par la suite imputé à une concentration insuffisante en CTAB (voir page 116), qui est indispensable pour stabiliser les facettes $\langle 110 \rangle$ des particules¹⁹³. Enfin, un phénomène d'agrégation irréversible se produisait très souvent (figs 3-44 à 3-45 ci-dessous)

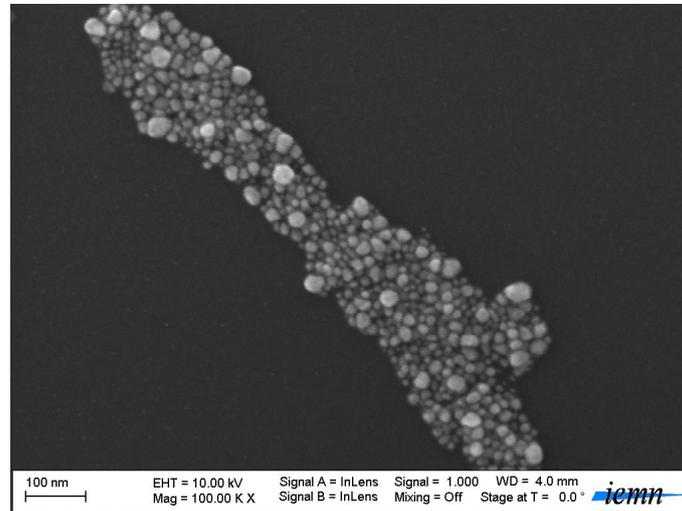


Fig 3-39 : Solution de nucléation peu homogène, réalisée par synthèse en présence de CTAB, conformément à l'article de Nikoobakht et al.²³⁶. On remarque que les particules sont de taille et de forme très inégales, avec de gros amas.

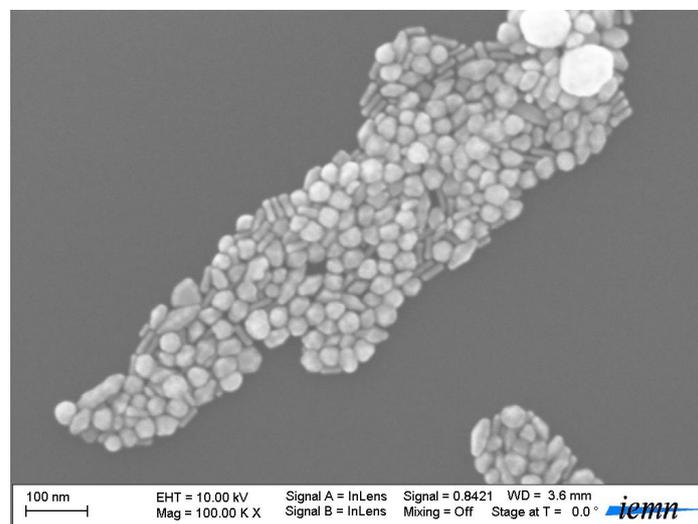


Fig 3-40 : Synthèse de nanofils courts ayant échoué, présence presque exclusive d'amas. La synthèse a été effectuée à partir de l'article de Jana et al.¹⁹⁵.

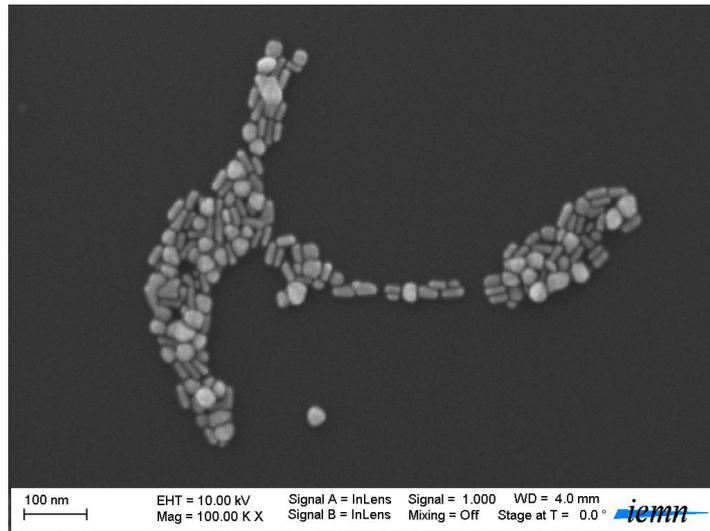


Fig 3-41 : Sur cette figure, la quantité de nanofils est plus importante, mais ceux-ci sont de même taille que les amas, on ne peut considérer la synthèse réussie. La synthèse a été effectuée à partir de l'article de Sau et al.^{149,163}.

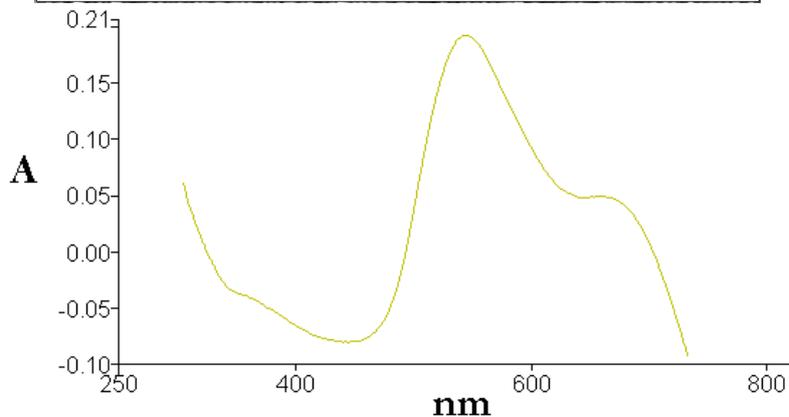
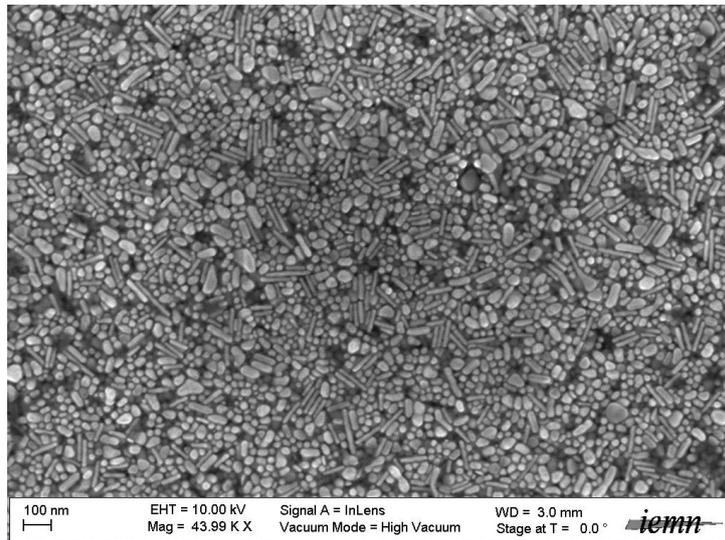


Fig 3-41a : Synthèse de nanofils courts et spectre UV-Visible associé, mettant en évidence le mélange de plusieurs formes, conformément au spectre « type » issu de la bibliographie (présenté figure 3-19 page 107). Le cas est similaire, bien qu'un peu moins prononcé que pour la courbe orange de la figure 3-41d. La synthèse a été effectuée à partir de l'article de Jiang et al.¹³⁹.

En considérant ces synthèses non abouties, nous avons choisi de réaliser notre propre étude sur le modèle de celles réalisées par Sau et Murphy^{149,163}. Nous avons ainsi constaté l'évolution des spectres UV-Vis de nos solutions en fonction notamment du volume de solution de nucléation, de solution de croissance et de solution de nitrate d'argent :

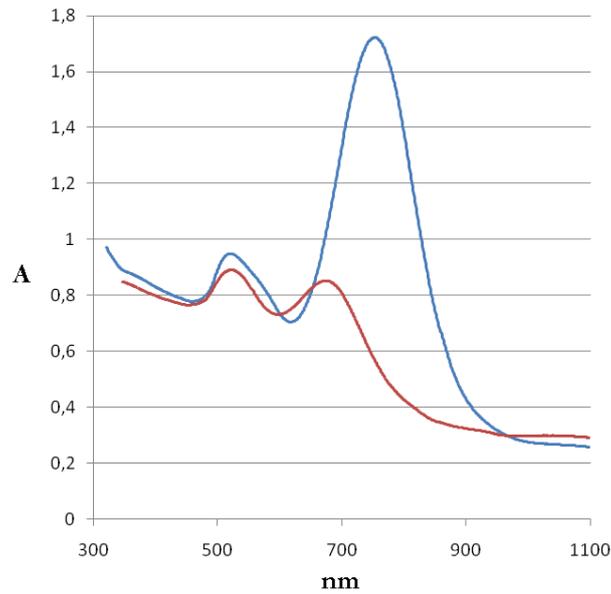


Fig 3-41b : Evolution des synthèses de nanofils courts, influence du volume de solution de nucléation : La courbe bleue correspond à un volume de solution de nucléation $V=80 \mu\text{l}$, tandis que la courbe rouge correspond à un volume de solution de nucléation $V=250 \mu\text{l}$.

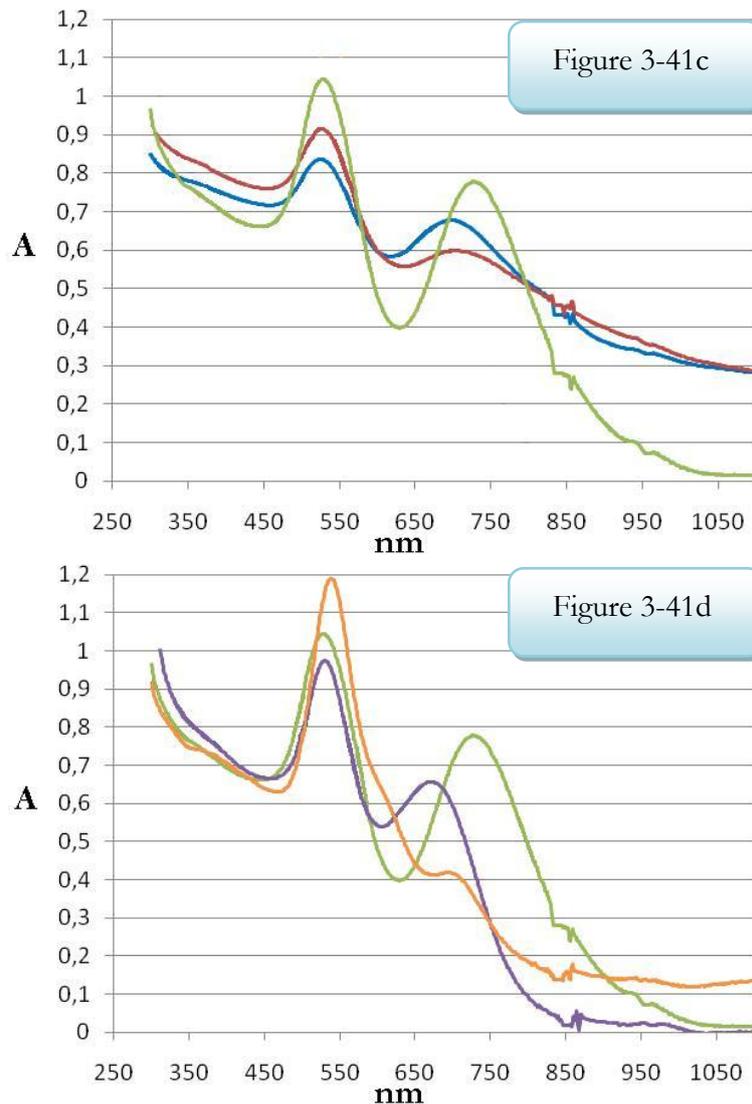


Fig 3-41c et 3-41d: Evolution des synthèses de nanofils courts.

Cette figure complète le graphique précédent. Elle permet de constater deux faits :

D'une part (figure 3-41c), l'influence du volume V de nitrate d'argent ($V=65 \mu\text{l}$ pour la courbe bleue, $V'=195 \mu\text{l}$ pour la courbe verte, $V''=390 \mu\text{l}$ pour la courbe rouge) : on peut conclure que la quantité de nitrate d'argent doit être calibrée (ni trop faible ni trop importante) pour pouvoir obtenir un pic longitudinal satisfaisant (c'est-à-dire, un pic plus prononcé en amplitude aux alentours de 750 nm).

D'autre part (figure 3-41d), l'influence du volume V de solution de nucléation préparée avec du CTAB ($V=330 \mu\text{l}$ pour la courbe verte, $V'=415 \mu\text{l}$ pour la courbe violette, $V''=500 \mu\text{l}$ pour la courbe orange) : on peut conclure que la quantité de solution de nucléation doit être la plus faible possible pour pouvoir obtenir un pic longitudinal satisfaisant (c'est-à-dire, un pic plus prononcé en amplitude aux alentours de 750 nm).

Néanmoins, ces synthèses ne sont pas encore optimales, car l'amplitude du pic longitudinal ne dépasse pas encore celui du pic transverse (aux alentours de 500 nm).

Deux critères importants à prendre en compte sont donc l'influence de la solution de croissance, et l'influence du volume de solution de nucléation lors d'une synthèse:

Sur la figure 3-41d ci-dessus, nous constatons que la courbe orange correspond à une synthèse qui devient satisfaite (amplitude du pic longitudinal supérieure à celle du pic transverse), bien que non encore optimale (volume de solution de nucléation $V=150 \mu\text{l}$). Le ratio optimal entre solution de croissance et solution de nucléation est de 0.25%, tel qu'il sera donné par la suite dans les récapitulatifs des synthèses réussies (page 141).

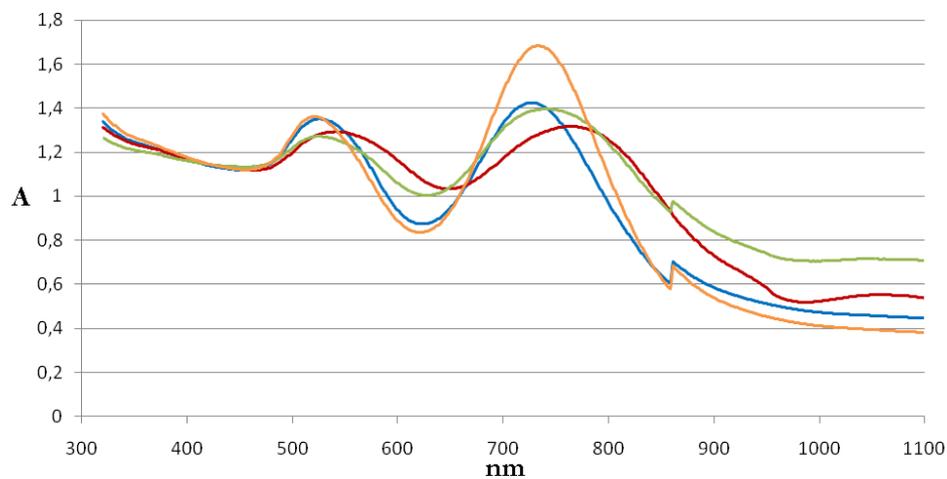
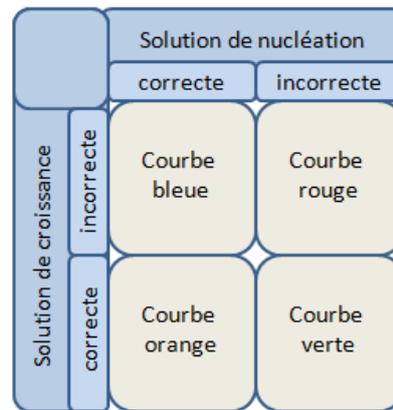


Fig 3-41e: Evolution des synthèses de nanofils courts

Nous avons également vérifié l'influence de l'ion nitrate et de la concentration en CTAB sur nos synthèses:

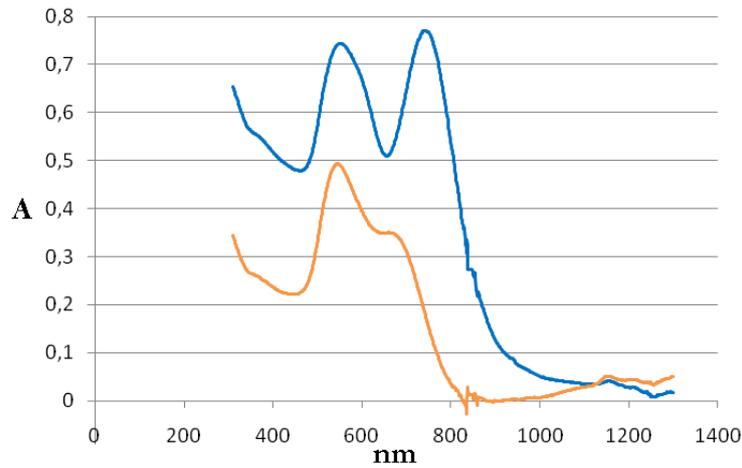


Fig 3-41f : Synthèses de nanofils avec nitrate d'argent (bleu), ou nitrate de sodium (orange) : Conformément aux remarques précédentes (pages 112 et 115), l'ion argent est plus efficace que l'ion nitrate pour produire des nanofils (pic longitudinal réellement existant sur la courbe bleue tandis qu'il n'est qu'esquissé par une petite bosse secondaire sur la courbe orange).

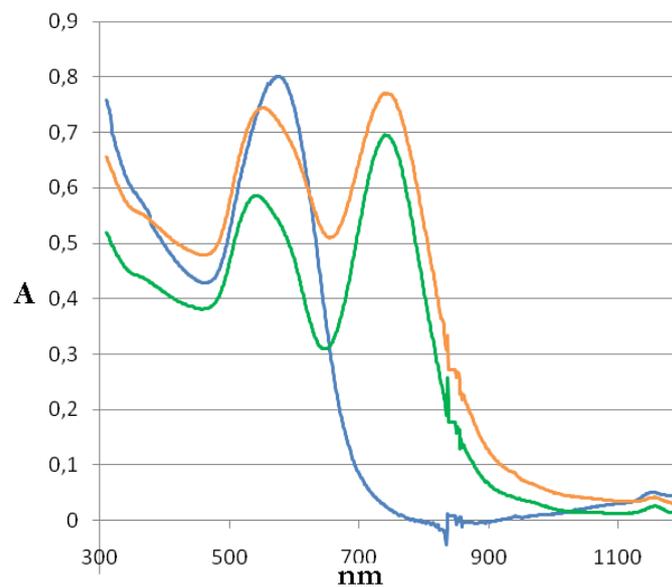


Fig 3-41g : Evolution des synthèses de nanofils courts, influence de la concentration en CTAB. La concentration en CTAB est de 250mg/100ml pour la courbe bleue, 350mg/100ml pour la courbe orange, et 450 mg/100ml pour la courbe verte.

Synthèses de nanofils longs :

Par la suite, les premières synthèses de nanofils longs ont donnés de très faibles rendements, comme on peut le constater sur les figures suivantes :

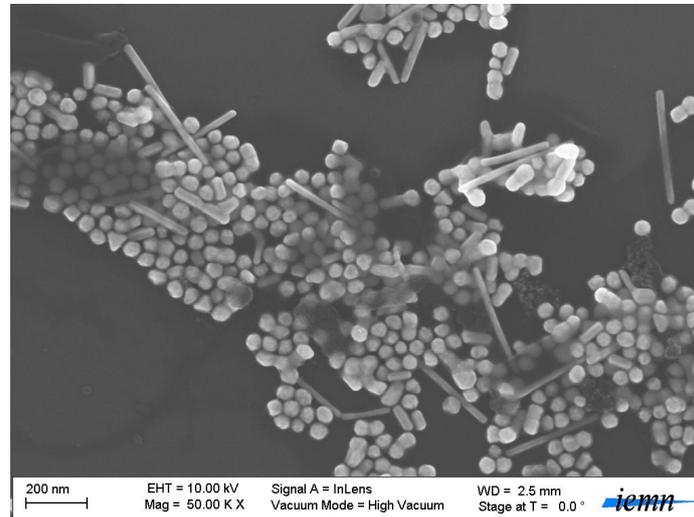


Fig 3-42 : Cette synthèse de nanofils longs ne peut pas être considérée comme satisfaisante, puisqu'il y a une majorité de particules sphérique. La quantité de CTAB employée est de 365 mg.

La synthèse a été effectuée à partir de l'article de Jana et al.¹⁹⁵.

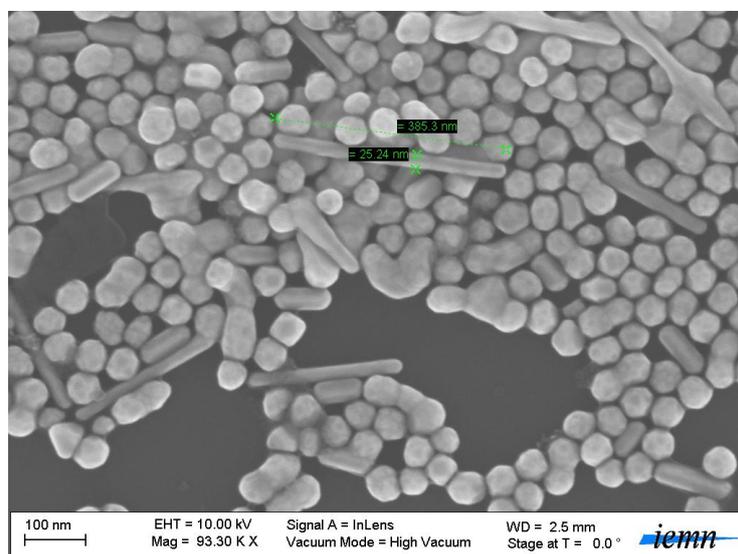


Fig 3-42a : Autre image issue de la même synthèse de nanofils longs que pour la figure 3-42.

Lorsque la concentration en CTAB est trop faible, la surface des nanofils devient irrégulière, telle qu'il l'a été expliqué par Jain et al.¹⁸⁴:

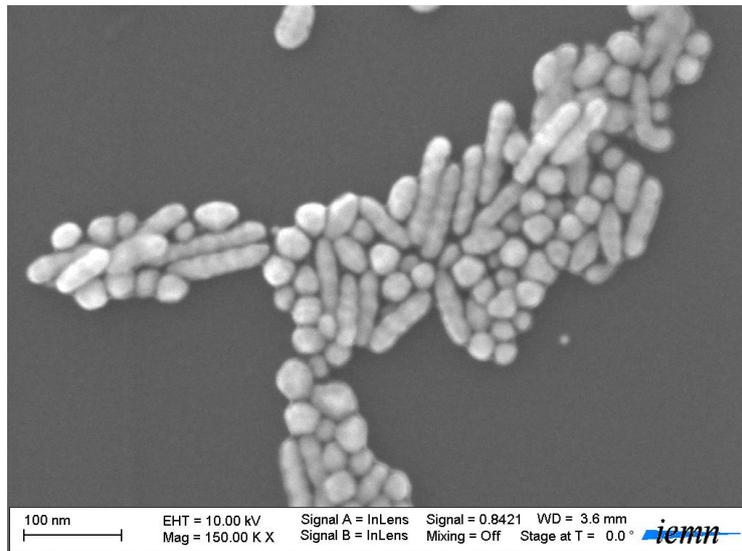


Fig 3-43 : Nanofils pour lesquels le processus de croissance est nettement visible, avec un effet « ondulé » tel qu'il l'a été mentionné et expliqué en page 116. La quantité de CTAB employée est de 300 mg.

Ci-après, nous donnons quelques images montrant l'aggrégation en solution dont peuvent être victimes les particules durant leur croissance. Deux paramètres peuvent être responsables de cet état : une concentration en CTAB trop élevée (figures 3-44, 3-44a, 3-44b) ou la température de la solution lors de la synthèse (figures 3-45, 3-45a) :

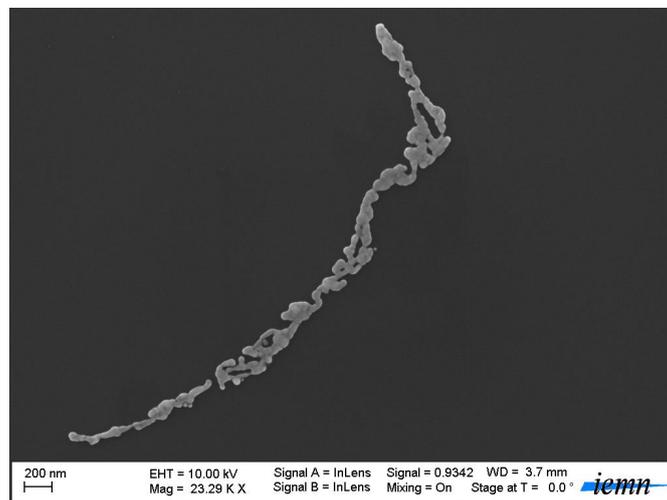


Fig 3-44 : Agglomération au cours d'une synthèse de nanofils longs. La quantité de CTAB employée est de 600 mg.

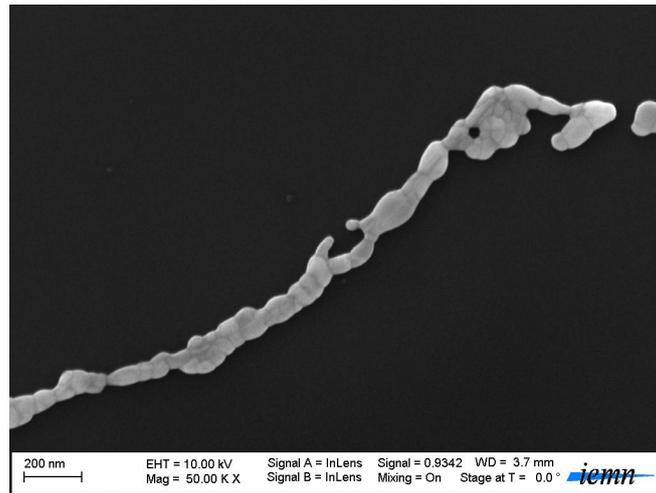


Fig 3-44a : Autre image issue de la même synthèse de nanofils longs que pour la figure 3-44 (agglomération).

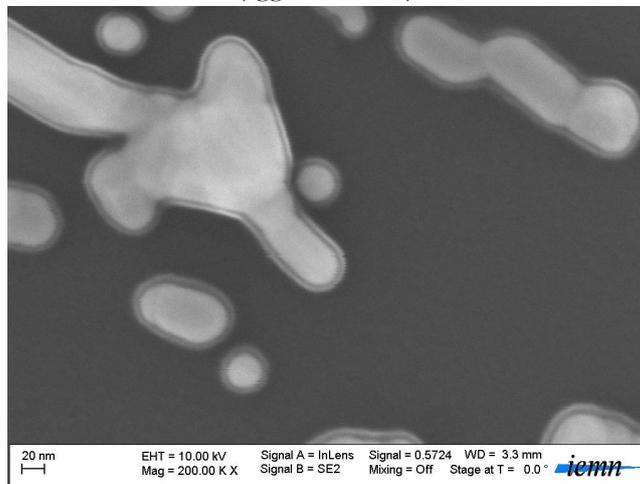


Fig 3-44b : Autre image issue de la même synthèse de nanofils longs que pour la figure 3-44, la couche carbonée due au CTAB est bien visible.

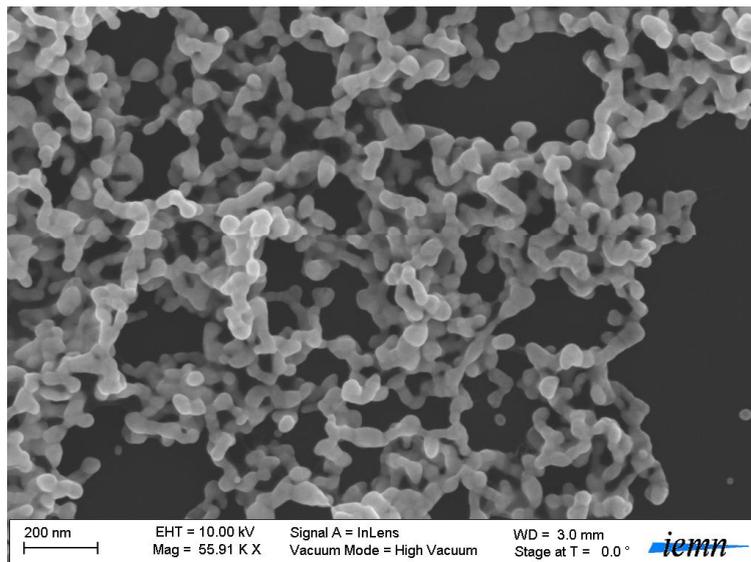


Fig 3-45 : Agglomération au cours d'une synthèse de nanofils longs. La température de la solution a été mal contrôlée sur plaque chauffante, et est montée au-delà de 50°C.

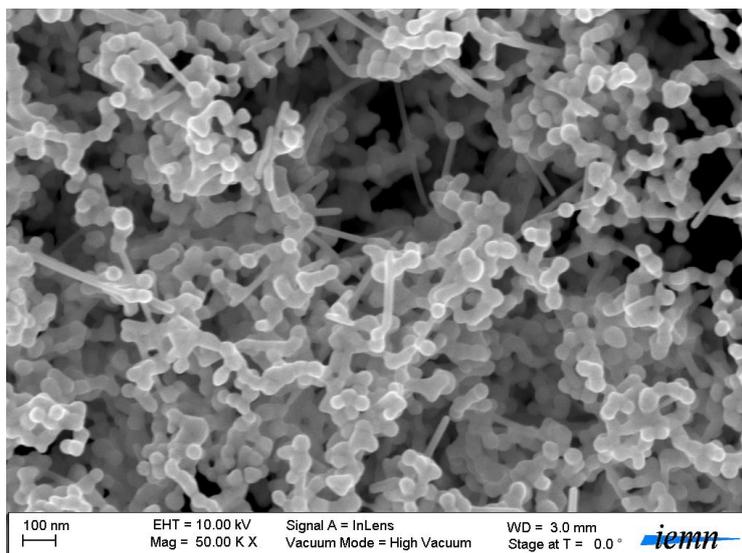


Fig 3-45a : Autre image issue de la même synthèse de nanofils longs que pour la figure 3-45.

Bien que reproduites de la manière la plus fidèle possible, les synthèses proposées dans de nombreux articles de la bibliographie n'ont pas donné les résultats attendus. Ces synthèses ont donc été modifiées, en réévaluant les paramètres principaux (notamment la concentration et les ratios des composés entre eux), comme nous l'avons exposé ci-dessus.

Après de nombreux essais, en faisant varier plusieurs paramètres (ou couples de paramètres), nous sommes parvenus à obtenir des procédures fiables, que nous présenterons dans la section d) ci-après.

Néanmoins, cette première phase d'expérimentation nous a permis de poser les règles suivantes pour nos synthèses:

- La couleur finale de la solution (après 4h de repos) donne une première bonne indication quant à la réussite ou à l'échec de la synthèse (voir section b) ci-après),
- La caractérisation des échantillons par spectrométrie UV-Vis donne une indication sur la forme des particules et leur rendement de façon très fiable (dans plus de 8 cas sur 10, un bon spectre UV-Vis est confirmé par une image MEB satisfaisante),
- La caractérisation par imagerie MEB est la technique ultime pour pouvoir donner un diagnostic fiable à 100% concernant le succès ou l'échec d'une synthèse,
- Un procédé ne peut être considéré comme étant au point que s'il a pu être réitéré au moins 5 fois,
- Une fois un procédé mis au point, il est possible de se contenter de l'analyse par UV-Vis pour garantir un contrôle qualité de la solution.

b) La couleur, premier indicateur de réussite d'une synthèse

Lors de la synthèse des nanoparticules d'or, la couleur des solutions est un premier indicateur du bon déroulement du processus de croissance. Ci-dessous sont présentées quelques photos de solutions fabriquées (figure 3-46), ainsi que le détail de leur couleur et composition (figure 3-47).

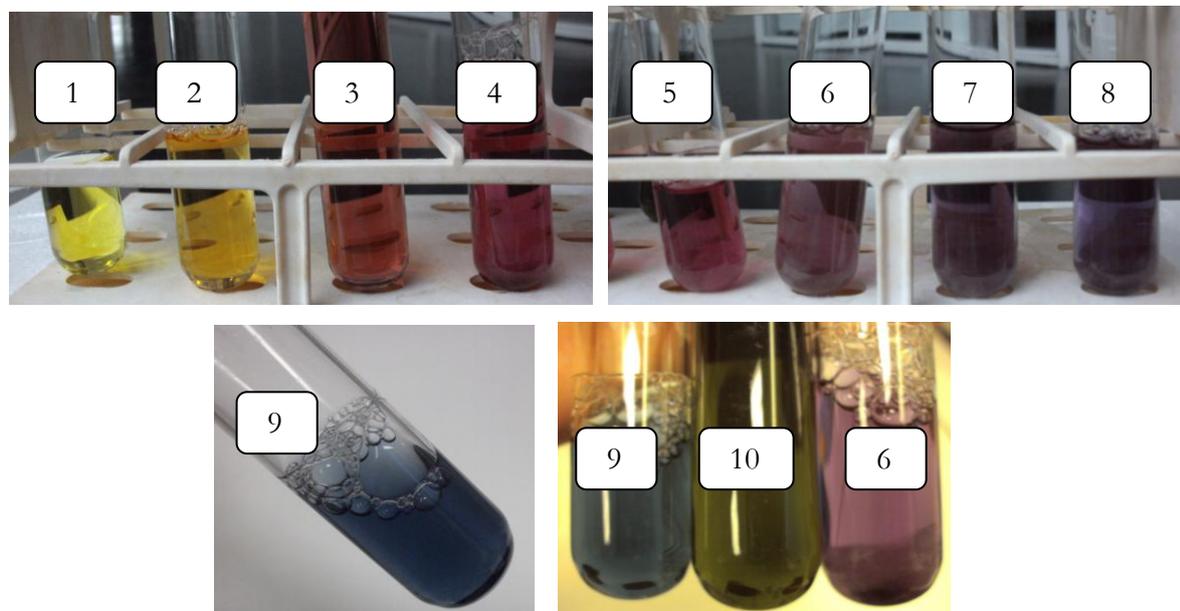


Fig 3-46 : Solutions référencées dans le tableau ci-dessous.

N° de la solution	Couleur	Type de solution
1	Jaune	Sel d'or HAuCl_4 dans l'eau
2	Orangée	HAuCl_4 et CTAB
3	Rougeâtre/Saumon	Solution de nucléation en présence de NaBH_4
4	Rose foncé	Particules sphériques (≈ 20 nm)
5	Rose clair	Particules sphériques (≈ 50 nm)
6	Violet clair	Nanodogbones
7	Violet foncé	Synthèse de Nanofils en présence de CTAB totalement satisfaisante
8	Indigo	Synthèse de Nanofils en présence de CTAB contenant quelques autres particules (environ 50 à 60% de nanofils dans la solution)
9	Bleue	Synthèse de Nanofils en présence de CTAB contenant beaucoup d'autres particules (environ 30% de nanofils dans la solution)
10	Verte	Nanodendrites synthétisées en présence d'HEPES
	Marron dorée	Microparticules ($1 \mu\text{m}$ et plus)

Fig 3-47 : Couleurs typiques des solutions de nanoparticules synthétisées.

Comme on le sait, la couleur des solutions est liée à leur spectre UV-Visible, et de ce fait, elle est indépendante des composés chimiques qui ont donné naissance aux formes particulières des particules. Ainsi, toute solution de nucléation, qu'elle soit à base de NaBH_4 /citrate ou de NaBH_4 /CTAB sera rougeâtre. De même, des nanofils de taille 20 nm avec un rendement élevé donneront toujours une couleur violette à une solution, tandis que des microparticules, qu'elles soient produites en présence d'extrait de citronnelle ou de BSA donneront toujours une couleur marron dorée à la solution finale.

c) Caractérisation morphologique par Microscopie Electronique à Balayage

Lorsque des particules de formes diverses ont des spectres très proches (ex : sphères et nanodendrites), la caractérisation des particules par spectrophotométrie UV-Vis n'est pas suffisante, et l'observation au microscope à balayage électronique devient essentielle.

La résolution des microscopes à balayage est moins bonne que celle des microscopes électroniques à transmission, et les résidus carbonés perturbent souvent l'acquisition des images (les résidus sont dus essentiellement à la présence de CTAB en dépit des étapes de purification menées ou dus aux décoctions de citronnelle). Les images sont moins claires. L'identification des formes reste toutefois faisable sans ambiguïté.

d) Synthèses de particules d'or réaménagées et optimisées selon nos paramètres personnels

Les synthèses proposées ci-après sont fiables, complètement reproductibles selon nos conditions expérimentales et avec nos produits chimiques.

Rappel : Toutes les synthèses en présence de CTAB ont été réalisées à la température de 35°C

Les solutions mères utilisées pour les synthèses en présence de CTAB sont les suivantes :

- Solution d' $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 63,5 mg dans 20 ml d'eau déionisée ($M = 393,83 \text{ g/mol}$, $C = 8,06 \text{ mM}$)
- Solution d'acide ascorbique : 25mg dans 10 ml d'eau déionisée ($M = 176,12 \text{ g/mol}$, $C = 14,2 \text{ mM}$), fraîchement préparée avant chaque synthèse de particules d'or

- Solution de nitrate d'argent : 50 mg dans 20 ml d'eau déionisée ($M=169,87\text{g/mol}$, $C=14,7\text{mM}$), fraîchement préparée avant chaque synthèse de particules d'or et protégée de la lumière par du papier aluminium.
- Solution d'hydroxyde de sodium : 40 mg pour 20 ml d'eau déionisée ($M=40\text{g/mol}$, $C=50\text{mM}$)
- Solution de citrate de sodium : 5 mg dans 20 ml d'eau ($M=258,06\text{g/mol}$, $C=0,97\text{mM}$), fraîchement préparée avant chaque synthèse de particules d'or
- Solution de borohydrure de sodium : 37,88 mg dans 10 ml d'eau déionisée glacée ($M=37,83\text{g/mol}$, $C=100\text{mM}$), fraîchement préparée dans un bain de glace juste avant son ajout à la solution principale

Les solutions finales sont composées comme suit. On utilise uniquement de l'eau déionisée pour toutes les manipulations. Les composés doivent être impérativement ajoutés dans l'ordre prescrit.

Pour toutes les solutions (solutions mères ou solution de particules en cours de synthèse) la verrerie doit être dédiée à son usage spécifique, être neuve si possible ou être exclusivement dédiée à la synthèse de particules d'or par la suite.

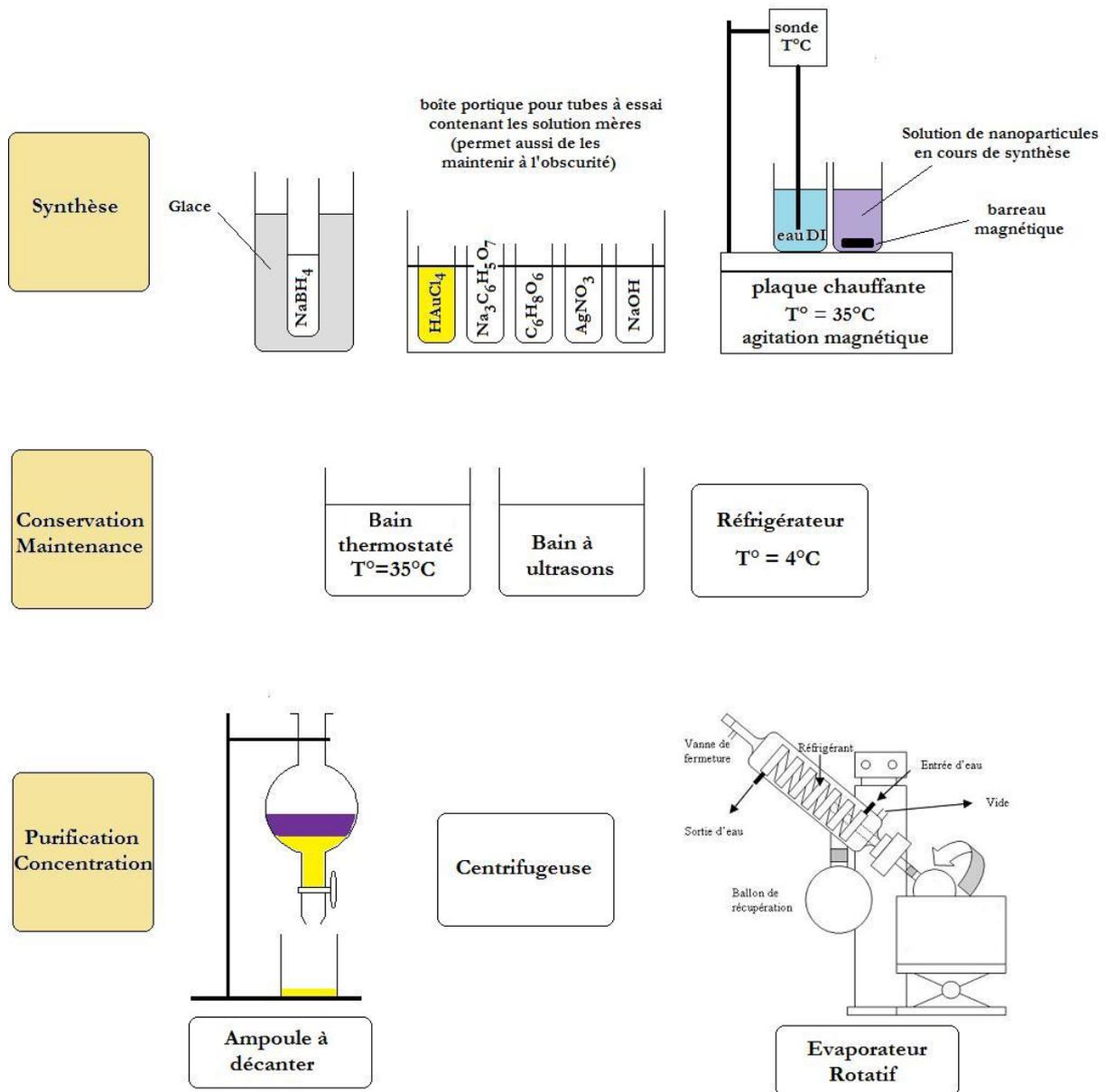
On n'utilisera que des récipients en verre. On peut de surcroît rincer au préalable les éléments avec une solution peu concentrée de HAuCl_4 , puis les rincer deux fois à l'eau déionisée.

Equipements requis pour la fabrication des nanoparticules:

L'équipement utilisé est illustré ci-dessous, et classé selon l'étape à laquelle il est le plus susceptible d'être utilisé (synthèse, conservation, purification ou encore concentration des particules...).

Il est important de faire plonger la sonde de température ou le thermomètre dans un bécher annexe, rempli avec une quantité d'eau équivalente à celle de la solution synthétisée. En effet, il faut éviter le contact de la solution de particules d'or en cours de synthétisation avec tout élément métallique étranger.

Le bain thermostaté sert à maintenir les particules à température constante ($T^\circ=35^\circ\text{C}$) durant la période de repos post-synthèse si celle-ci est nécessaire.



Synthèses de solutions de nanoparticules sphériques de 15 nm environ (solution de nucléation):

Cette synthèse est effectuée à température ambiante. Elle requiert la préparation en amont des solutions mères de HAuCl₄, Citrate de sodium et NaBH₄, comme décrites en pages 136-137.

Puis, dans un tube à essai, mettre 16,76 ml d'eau DI, et y ajouter successivement (agiter 5 sec entre chaque ajout):

- 500 µl de la solution mère de HAuCl₄ ($C_f = 0,195$ mM),
- 2,94 ml de la solution mère de Citrate de sodium ($C_f = 0,138$ mM),
- 500 µl de la solution mère de NaBH₄ ($C_f = 2,41$ mM),

La solution doit reposer 2 h au réfrigérateur après fabrication avant toute autre utilisation.

Le stockage des solutions de nucléation peut être réalisé en les laissant au réfrigérateur, sans dégradation pendant deux à trois semaines (néanmoins, une vérification par UV-Vis peut être faite par mesure de précaution). Néanmoins, si l'on souhaite s'en servir en tant que solution de nucléation pour faire croître des nanofils, il faut **impérativement** synthétiser une solution fraîche.

Dans le cas de cette synthèse, l'ensemble des volumes de solutions (et de ce fait les ratios entre composés) ont été réajusté comparativement aux synthèses les plus fréquemment présentées dans la littérature. Les particules que nous avons obtenues sont de taille homogène. Le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art.

Indications complémentaires :

- Purification : non nécessaire
- Concentration : par méthode chimique ou par méthode mécanique
- Fonctionnalisation : par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (D'TDTPA) page 179 ci-après

Les illustrations ci-dessous (figures 3-48, 3-49, 3-50) correspondent à trois de nos essais avec ce procédé de fabrication, et démontrent la reproductibilité de nos expériences.

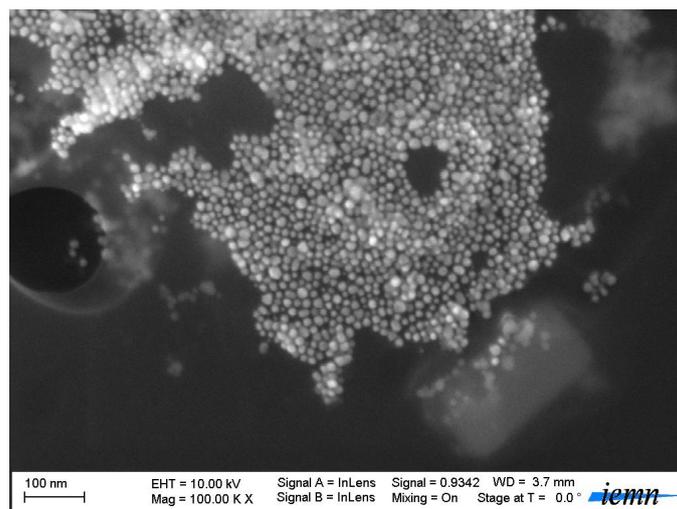


Fig 3-48 : Synthèse d'une solution de nanoparticules sphériques de 15 nm environ (solution de nucléation) : nucléation satisfaisante, en utilisant du NaBH_4 comme réducteur à la place du CTAB. Les particules sont de taille et de forme beaucoup plus homogène.

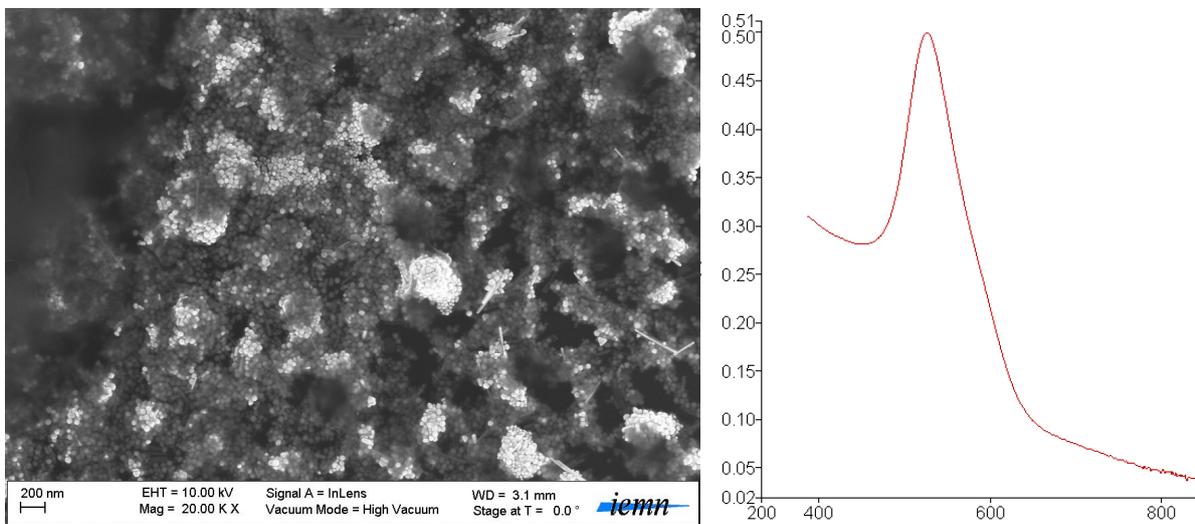


Fig 3-49 : Seconde synthèse d'une solution de nucléation, toujours en présence de NaBH_4 . Cette solution est perçue comme rougeâtre à l'œil, et présente un pic à 520 nm pour son spectre UV-Visible associé. Les particules ont toujours une taille moyenne de 15 nm.

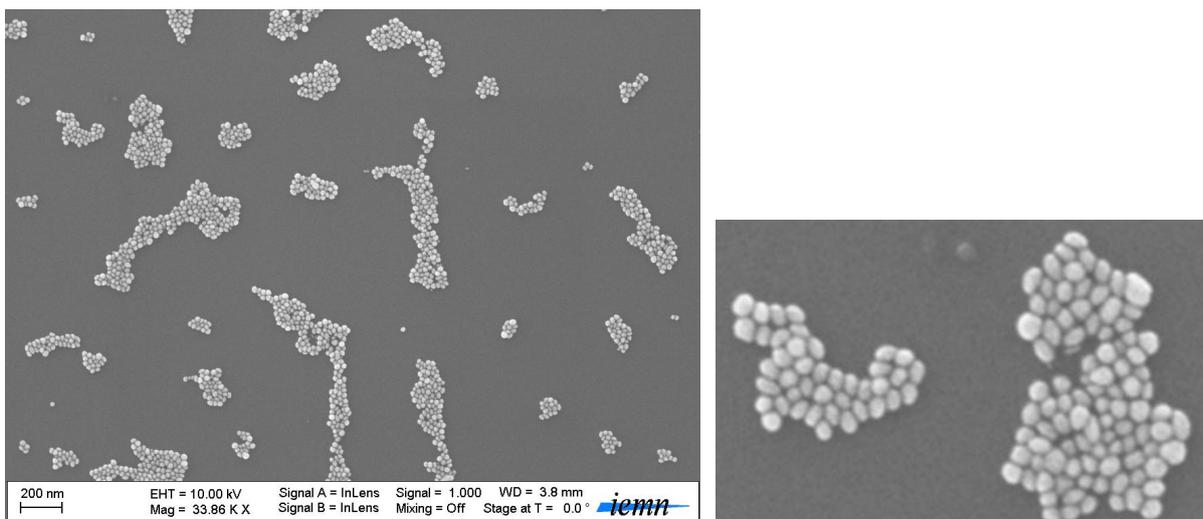


Fig 3-50 : Troisième synthèse d'une solution de nucléation. Les particules ont toujours une taille moyenne de 15 nm.

Synthèses de nanofils courts à base de CTAB:

Cette synthèse est effectuée sur plaque chauffante, à 35°C, sous agitation magnétique.

Elle requiert la préparation en amont :

- des solutions mères de H_{Au}Cl₄, acide ascorbique, nitrate d'argent comme décrites en pages 136-137,
- de synthétiser un tube de solution de nucléation 2h à 3h auparavant, comme décrit ci-dessus page 138,

Puis, dans un bécher, mettre 96 ml d'eau DI, et y ajouter :

- 4,5 g de CTAB. Laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente ($C_f = 121$ mM),
- 2,5 ml de la solution mère de H_{Au}Cl₄ ($C_f = 0,197$ mM),
- 2,8 ml de la solution mère d'acide ascorbique ($C_f = 0,39$ mM),
- 250 µl de la solution mère de nitrate d'argent ($C_f = 0,036$ mM),
- 250 µl de la solution de nucléation ($C_f = 0,0005$ mM),

La solution doit alors être retirée de la plaque chauffante et être laissée au repos à température ambiante, durant 2 h minimum avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans le cas de cette synthèse, il nous a fallu adapter la quantité de CTAB à ajouter en solution, ainsi que les volumes d'acide ascorbique et de solution de nucléation comparativement aux synthèses les plus fréquemment présentées dans la littérature. Les particules que nous avons obtenues sont de taille homogène. Quelques amas résiduels apparaissent, mais le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art.

Indications complémentaires :

- Purification : nécessaire, afin d'éliminer l'excédent de CTAB
- Concentration : par phospholipides
- Fonctionnalisation : par phospholipides ou par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA) page 179 ci-après

Les illustrations 3-51 ci-dessous correspondent à plusieurs de nos essais avec ce procédé de fabrication, et démontrent la reproductibilité de nos expériences.

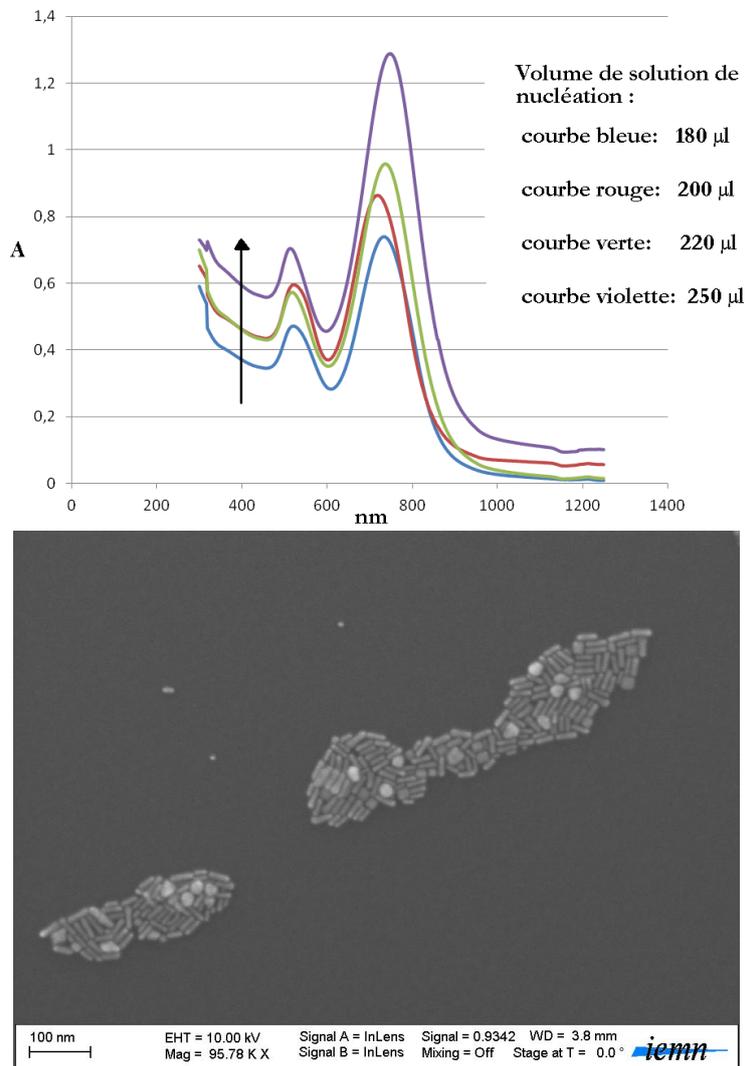


Fig 3-51 : En haut, évolution des spectres d'absorbance des nanofils lorsque l'on ajuste au mieux les quantités de solution de nucléation et de solution de croissance. En bas, photo de la synthèse de nanofils courts la plus satisfaisante correspondant à la courbe violette (les nanofils sont largement majoritaires, seuls quelques amats persistent).

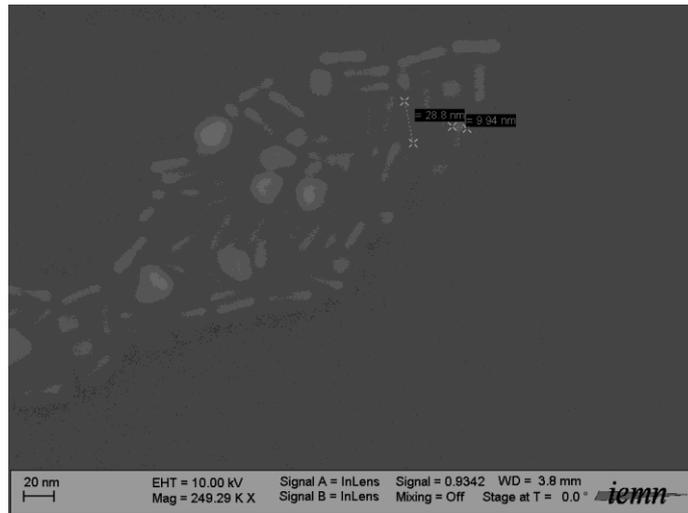


Fig 3-51a : Zoom de la figure 3-51. Les particules ont une longueur de 25 nm et une largeur de 8nm en moyenne.

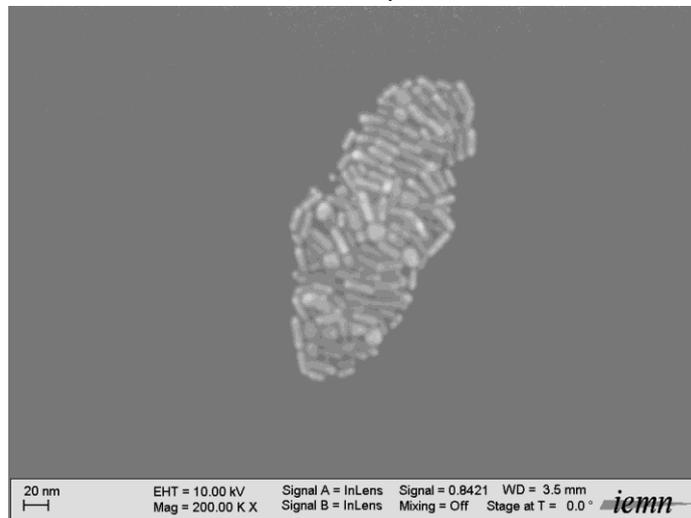


Fig 3-52 : Seconde synthèse de nanofils courts.

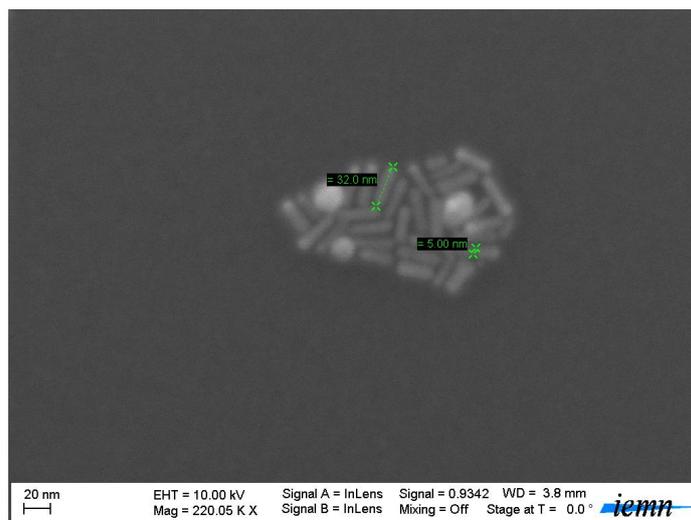


Fig 3-53 : Troisième synthèse de nanofils courts. Les particules ont une longueur de 25 nm et une largeur de 8nm en moyenne.

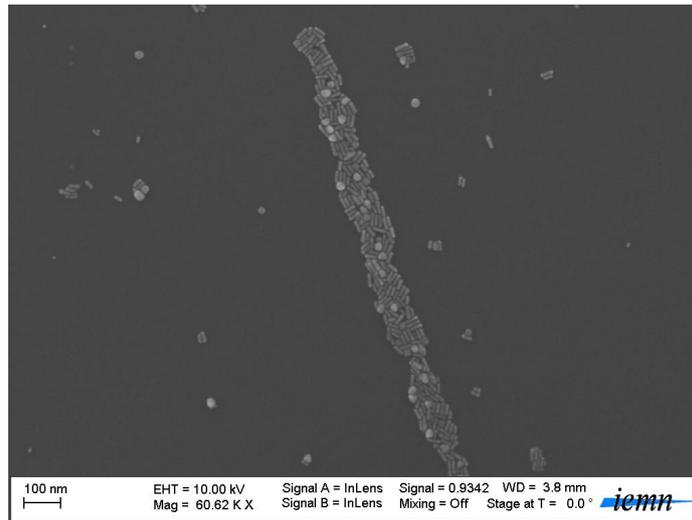


Fig 3-54 : Quatrième synthèse de nanofils courts.

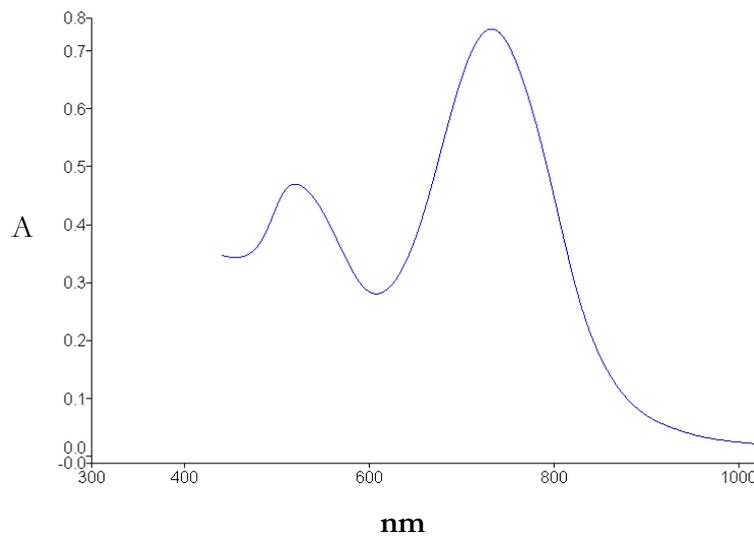
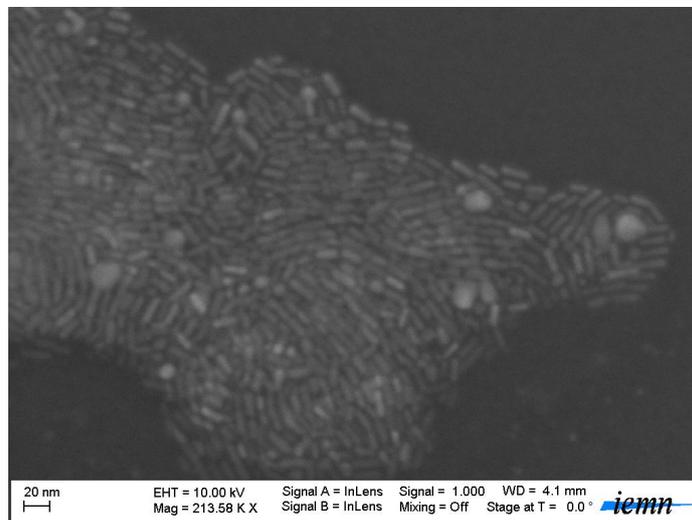


Fig 3-55: Cinquième synthèse de nanofils courts tout à fait satisfaisante et spectre UV-Visible associé.

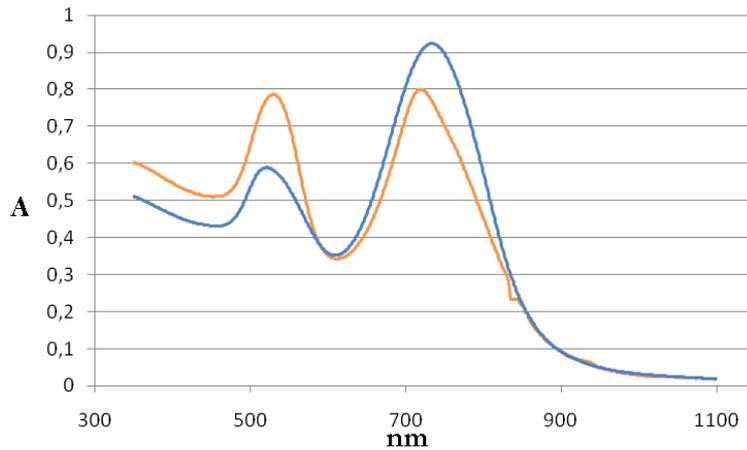


Fig 3-56 : Evolution des nanofils au cours du temps (pour la même solution, courbe bleue : mai 2011, courbe orange : février 2012). On constate que les nanofils se dégradent lentement (augmentation du pic transversal, diminution du pic longitudinal pour la solution vieillie), tant que les solutions sont conservées à l'abri de la lumière, à température ambiante contrôlée (22°).

Exemple de problème rencontré :

Les deux images ci-dessous montrent un dépôt d'argent sur le corps des nanofils (extrémités plus claires => numéro atomique plus élevé => présence de l'élément or, selon le principe de fonctionnement de l'équipement MEB). La quantité de nitrate d'argent à inclure dans la synthèse est délicate à doser, comme nous l'avons déjà évoqué. La température du mélange influence aussi l'apparition ou non de ce phénomène. Une légère surchauffe du mélange (de 35°C à 45°) a eu lieu lors de cette expérimentation. On remarque l'apparition de quelques bipointes. Les problématiques liées à l'utilisation de nitrate d'argent ont été détaillées pages 112 et 115.

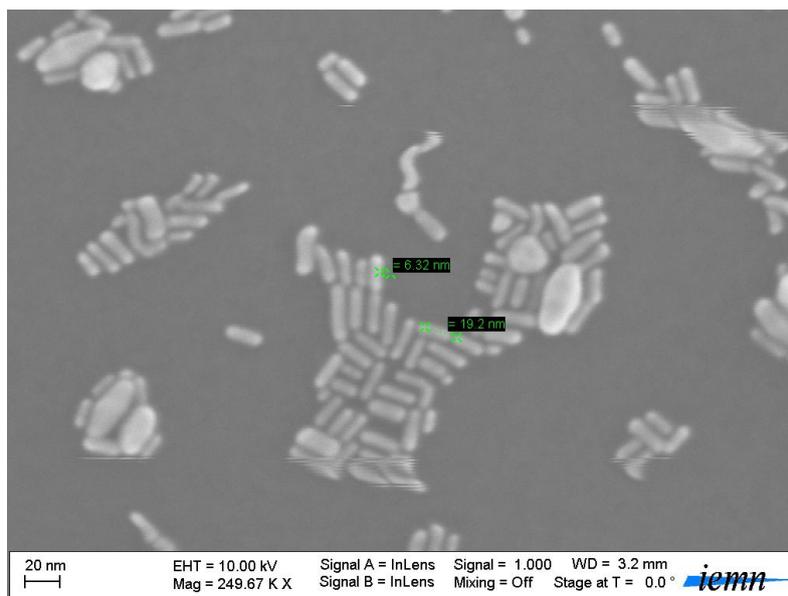


Fig 3-57 : Synthèse de nanofils courts avec extrémités recouverte d'argent (nanodumbbells).

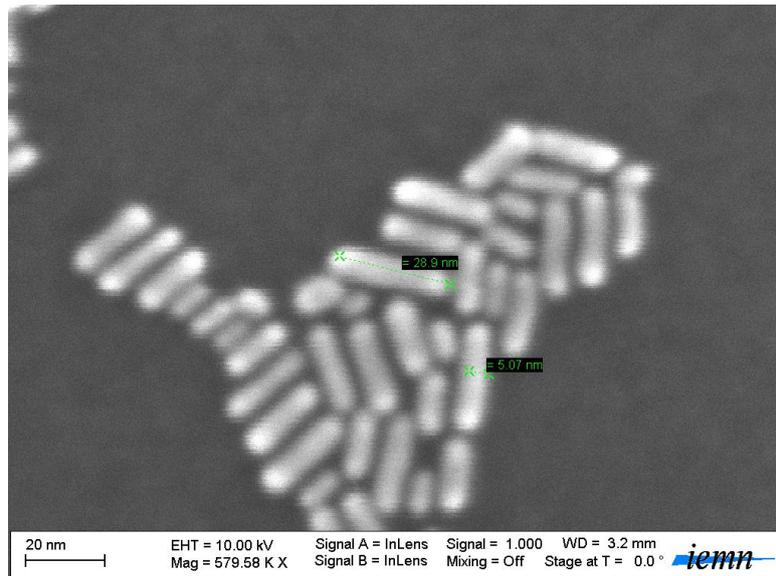


Fig 3-57a : Zoom sur une autre portion du wafer que celui utilisé pour la figure 3-57.

Lorsque l'on souhaite bénéficier de cet effet du nitrate d'argent en solution décrit aux pages 112 et 115, on parvient aux paramètres suivants :

Synthèses de bipointes à base de CTAB:

Cette synthèse est effectuée sur plaque chauffante, à 35°C, sous agitation magnétique.

Elle requiert la préparation en amont :

- des solutions mères de H_{Au}Cl₄, acide ascorbique, nitrate d'argent comme décrites en pages 136-137,
- de synthétiser un tube de solution de nucléation 2h à 3h auparavant, comme décrit ci-dessus page 138,

Puis, dans un bécher, mettre 96 ml d'eau DI, et y ajouter :

- 4,5 g de CTAB. Laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente ($C_f = 121$ mM),
- 2,5 ml de la solution mère de H_{Au}Cl₄ ($C_f = 0,197$ mM),
- 2,8 ml de la solution mère d'acide ascorbique ($C_f = 0,39$ mM),
- 300 µl de la solution mère de nitrate d'argent ($C_f = 0,043$ mM),
- 250 µl de la solution de nucléation ($C_f = 0,0005$ mM),

La solution doit alors être retirée de la plaque chauffante et être laissée au repos à température ambiante, durant 2 h minimum avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans le cas de cette synthèse, comme dans celui des nanofils courts, il nous a fallu adapter la quantité de CTAB à ajouter en solution, ainsi que le volumes d'acide ascorbique. Le volume de solution de nitrate d'argent a été modifié.

Ce résultat (nanoparticules bipointes) est un sous-produit de l'étude que nous avons menée afin de déterminer le volume de nitrate d'argent nécessaire afin d'obtenir une synthèse de nanofils courts satisfaisante. Les particules que nous avons obtenues sont disparâtes, et un mélange de formes difficilement séparables existe.

Indications complémentaires :

- Purification : nécessaire, afin d'éliminer l'excédent de CTAB
- Concentration : par phospholipides
- Fonctionnalisation : par phospholipides ou par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA) page 179 ci-après

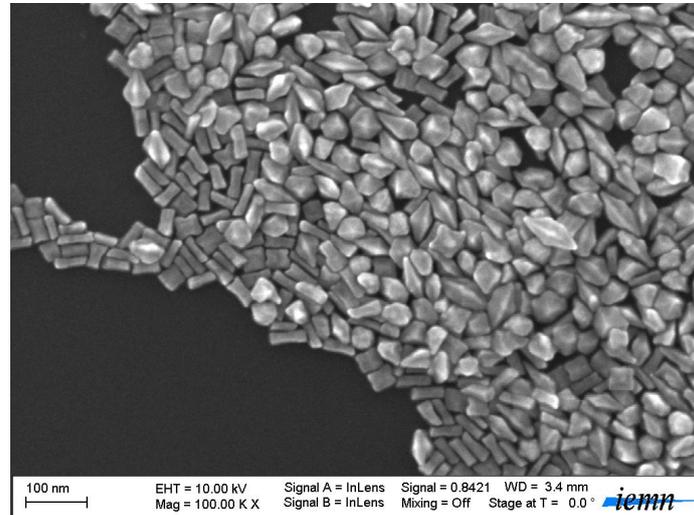


Fig 3-58 : Synthèse de particules bipointes et spectre UV-Vis associé. Le spectre est conforme à ce que l'on attend au vu de la figure 3-21 page 108. La taille moyenne des particules est de 60 nm.

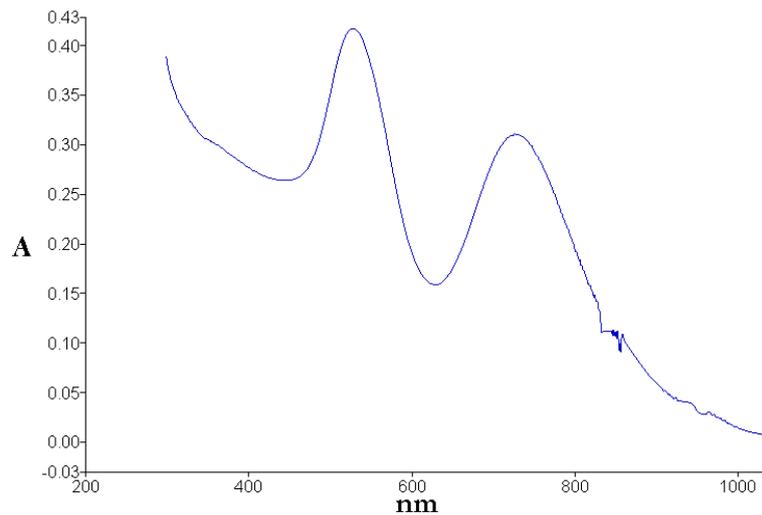


Fig 3-58a : Synthèse de particules bipointes et spectre UV-Vis associé. Le spectre est conforme à ce que l'on attend au vu de la figure 3-21 page 108.

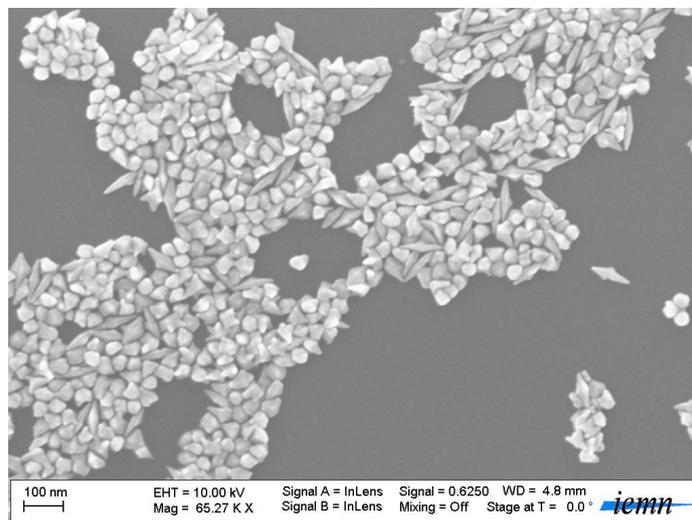


Fig 3-59 : Seconde synthèse de particules bipointes. La taille moyenne des particules est 90 nm.

Synthèses de nanodogbones à base de CTAB:

Cette synthèse est effectuée sur plaque chauffante, à 35°C, sous agitation magnétique.

Elle requiert la préparation en amont :

- des solutions mères de HAuCl_4 , acide ascorbique, nitrate d'argent comme décrites en pages 136-137,
- de synthétiser un tube de solution de nucléation 2h à 3h auparavant, comme décrit ci-dessus page 138,

Puis, dans un bécher, mettre 96 ml d'eau DI, et y ajouter :

- 4,5 g de CTAB, laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente ($C_f = 121 \text{ mM}$),
- 2,5 ml de la solution mère de HAuCl_4 ($C_f = 0,197 \text{ mM}$),
- 2,8 ml de la solution mère d'acide ascorbique ($C_f = 0,39 \text{ mM}$),
- 35 μl de la solution mère de nitrate d'argent ($C_f = 0,005 \text{ mM}$),
- 250 μl de la solution de nucléation ($C_f = 0,0005 \text{ mM}$),

La solution doit alors être retirée de la plaque chauffante et être laissée au repos à température ambiante, durant 2 h minimum avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans le cas de cette synthèse, comme dans celui des nanofils courts, il nous a fallu adapter la quantité de CTAB à ajouter en solution, ainsi que le volumes d'acide ascorbique. Le volume de solution de nitrate d'argent a été modifié.

Ce résultat (« nanodogbones ») est un sous-produit de l'étude que nous avons menée afin de déterminer le volume de nitrate d'argent nécessaire afin d'obtenir une synthèse de nanofils courts satisfaisante. Les particules que nous avons obtenues ont toutes le même type de forme, mais les tailles sont disparâtes.

Indications complémentaires :

- Purification : nécessaire, afin d'éliminer l'excédent de CTAB
- Concentration : par phospholipides
- Fonctionnalisation : par phospholipides ou par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (D'TDTPA) page 179 ci-après

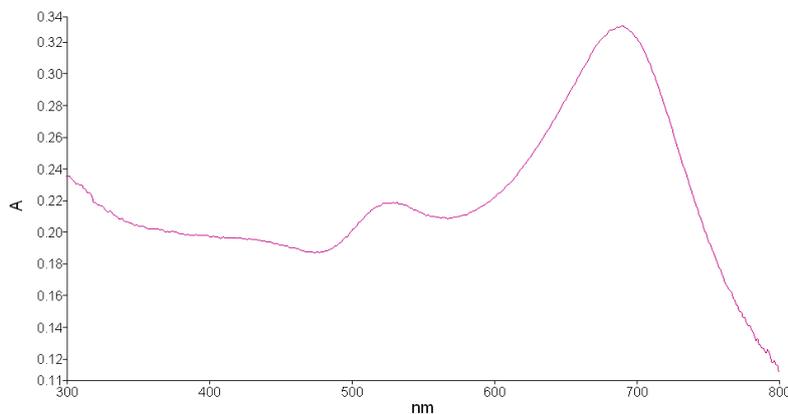
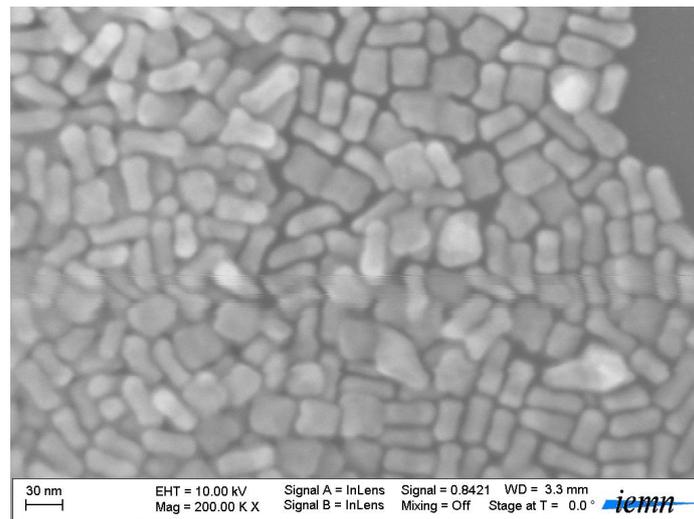


Fig 3-60 : Synthèse de « nanodogbones », spectre UV-Visible associé. Le spectre est conforme à ce que l'on attend au vu de la figure 3-19 page 107. La taille moyenne des particules est de 45 nm.

Synthèses de nanofils longs à base de CTAB:

Pour obtenir des nanofils plus longs, la synthèse en 3 étapes^{194,195} est la méthode qui reste la plus efficace, même si le rendement reste moins élevé que pour les nanofils courts (40% au mieux), et que la longueur finale est un peu moins bien contrôlée (de 300 à 500 nm environ).

Cette synthèse requiert la préparation en amont :

- des solutions mères de H₂AuCl₄, acide ascorbique, NaOH comme décrites en pages 136-137,
- de synthétiser un tube de solution de nucléation 2h à 3h auparavant, comme décrit ci-dessus page 138,

Puis, préparer en parallèle deux tubes à essai et un bécher.

Etape 1 : dissolution du CTAB

Dans le tube à essai A, ajouter :

- 9,5 ml d'eau DI à 35°C,
- 450 mg de CTAB, laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente,
- Laisser refroidir le tube

Dans le tube à essai B :

- 9,5 ml d'eau DI à 35°C,
- 450 mg de CTAB, laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente,
- Laisser refroidir le tube

Dans le bécher (sur plaque chauffante, à 35°C, sous agitation magnétique) :

- 95 ml d'eau DI,
- 4,5 g de CTAB, laisser à la poudre le temps de bien se dissoudre : la solution passe d'une couleur laiteuse à transparente ($C_f = 110,1$ mM),

Etape 2 : synthèse en cascade

Ajouter au tube A (agiter 5 secondes entre chaque ajout):

- 250 μ l de la solution mère de H_{Au}Cl₄,
- 280 μ l de la solution mère d'acide ascorbique,
- 25 μ l de la solution de nucléation,

Ajouter au tube B (agiter 5 secondes entre chaque ajout):

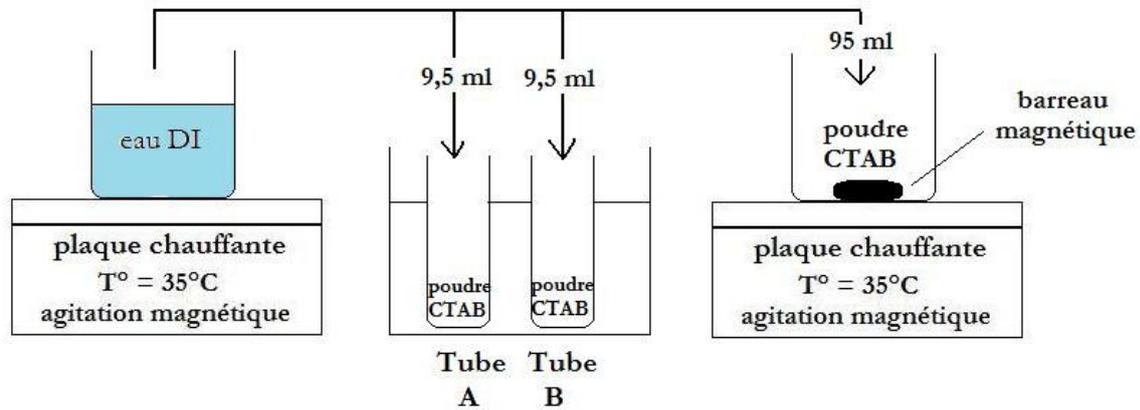
- 250 μ l de la solution mère de H_{Au}Cl₄,
- 280 μ l de la solution mère d'acide ascorbique,
- 1 ml de la solution du tube A,

Ajouter dans le bécher, mettre 96 ml d'eau DI, et y ajouter :

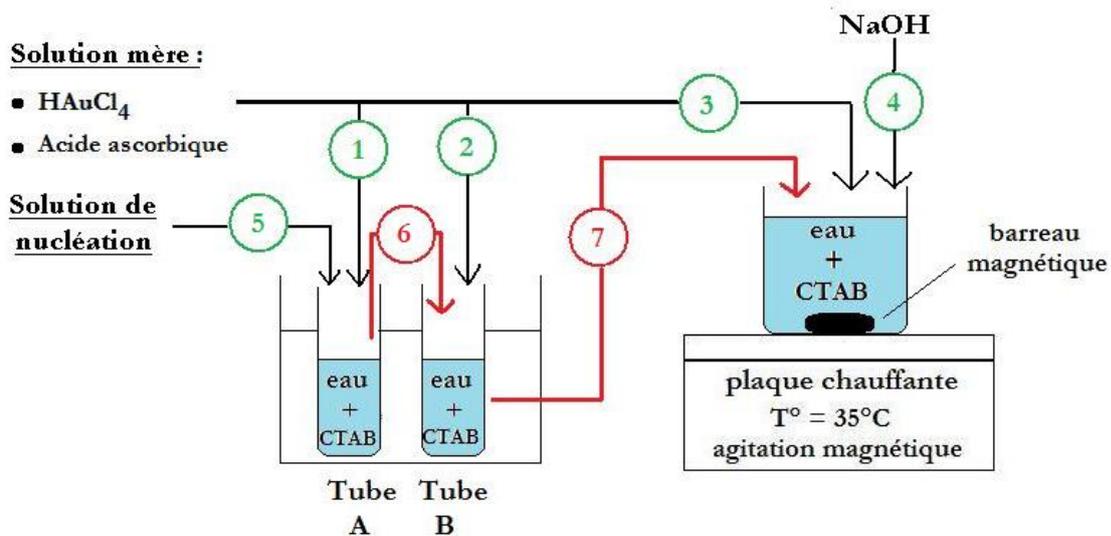
- 2,5 ml de la solution mère de H_{Au}Cl₄ ($C_f = 0,18$ mM),
- 2,8 ml de la solution mère d'acide ascorbique ($C_f = 0,355$ mM),
- 800 μ l de la solution mère de NaOH,
- La totalité du tube B

Ce protocole est illustré ci-dessous :

Etape 1: dissolution du CTAB



Etape 2: synthèse en cascade



La solution finale (bécher) doit alors être retirée de la plaque chauffante et être laissée au repos à température ambiante, durant 2 h minimum avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans le cas de cette synthèse, il nous a fallu adapter la quantité de CTAB à ajouter en solution, ainsi que les volumes d'acide ascorbique, et de solution de nucléation comparativement aux synthèses les plus fréquemment présentées dans la littérature. Nous avons adapté le volume et le

moment d'ajout (uniquement dans le bécher C) de solution d'hydroxyde de sodium (les articles de la littérature en ajoutent soit à chacun des contenants A-B-C, soit n'en ajoutent pas).

Les particules que nous avons obtenues sont de taille homogène, en deux populations (nanofils longs et nanosphères). Le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art, d'autant que les étapes de purification, de séparation de forme (voir ci dessous) et de concentration que nous avons mises en œuvre donnent au final un bon rendement en nanofils longs.

Indications complémentaires :

- Purification : nécessaire, afin d'éliminer l'excédent de CTAB
- Concentration : par phospholipides
- Fonctionnalisation : par phospholipides ou par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (D'TDTPA) page 179 ci-après

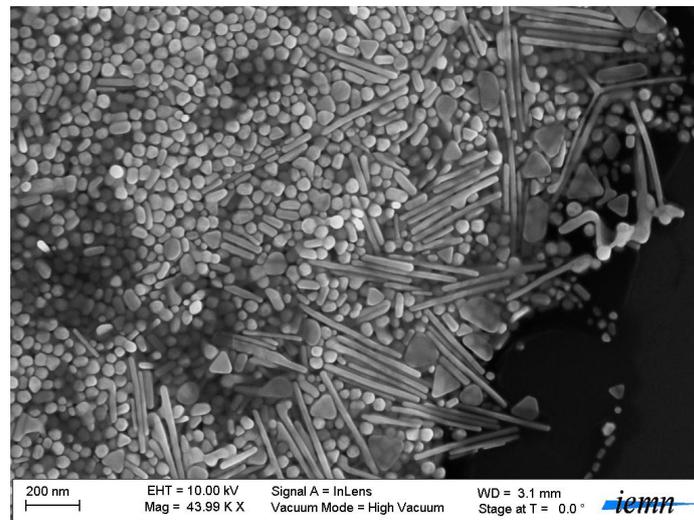


Fig 3-61 : Synthèse de nanofils longs (300 à 500 nm) assez satisfaisante, puisqu'elle subira plusieurs étapes de purification qui permettront la séparation des nanofils des autres nanoparticules sphériques.

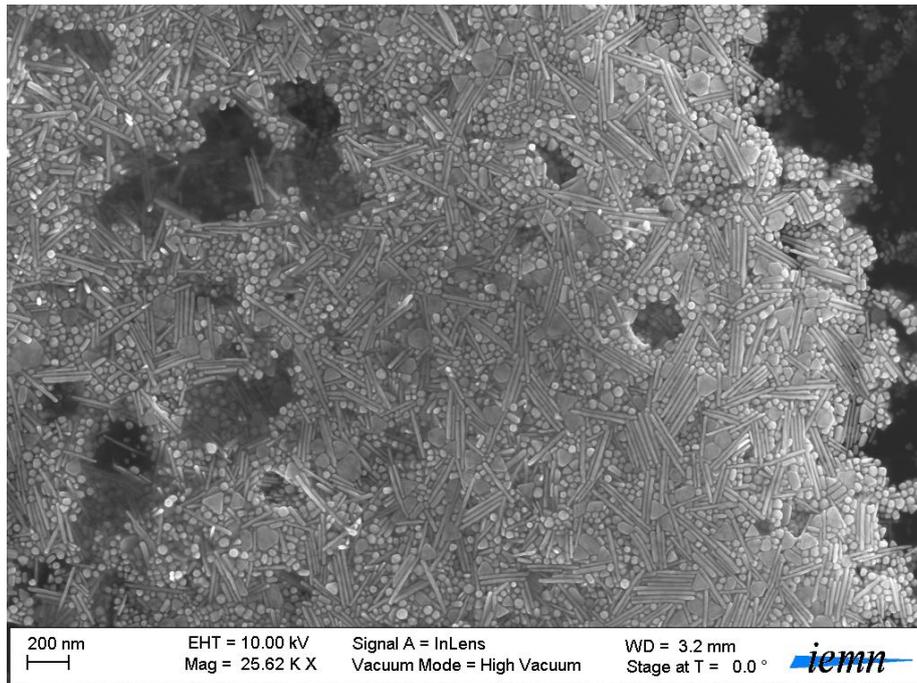


Fig 3-62 : Seconde synthèse de nanofils longs.

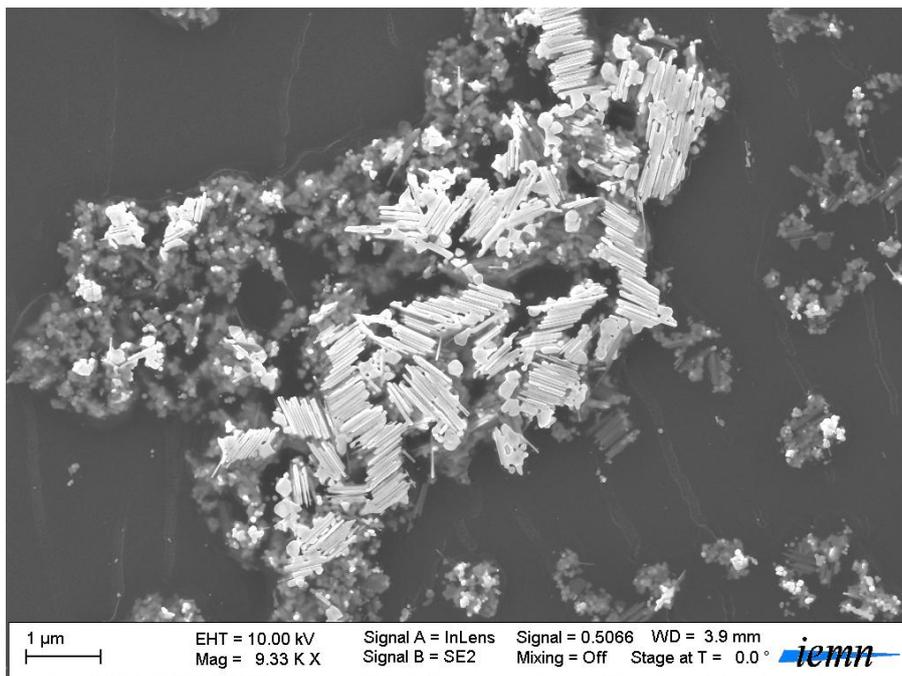


Fig 3-63 : Troisième synthèse de nanofils longs (450 nm environ).

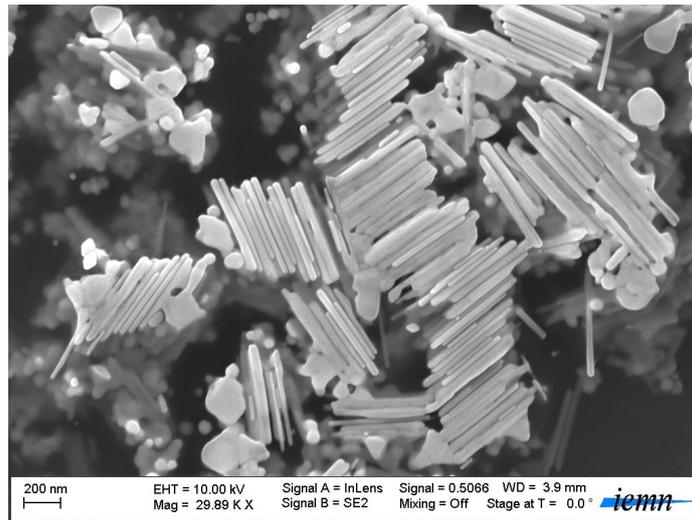


Fig 3-63a : Zoom de la figure E2.

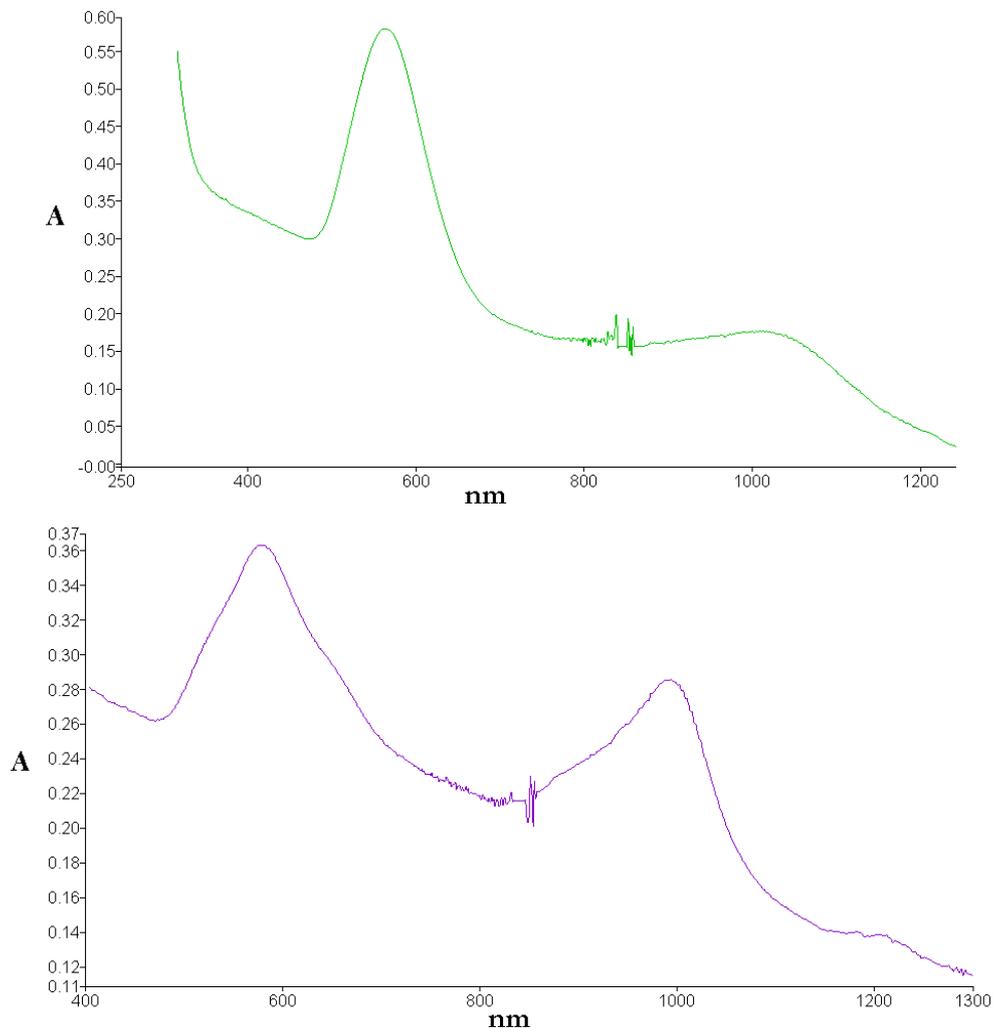


Fig 3-64 : Deux exemples de spectres UV-Visible obtenus avant purification des solutions de nanofils longs. On constate que le pic longitudinal est plus faible que le pic transverse (absorbance de 0.3 au mieux !), ce qui dénote la faible concentration en nanofils longs dans la solution et l'existence de particules de forme non souhaitée en quantité importante.

Dans le cas spécifique de la synthèse de nanofils longs, et afin de remédier au problème de mélange de formes constaté sur les figures 3-61 à 3-63 et les spectres figure 3-64 auparavant, il est possible d'adopter une **stratégie simple de séparation de formes des particules**.

La séparation des formes se fait en deux temps : une première étape consiste à laisser décanter naturellement la solution après sa fabrication. Au repos, à température ambiante, le CTAB cristallise peu à peu en repassant de 35°C à 20°C. Il entraîne dans sa précipitation les particules les plus volumineuses (figure 3-65 ci-dessous).

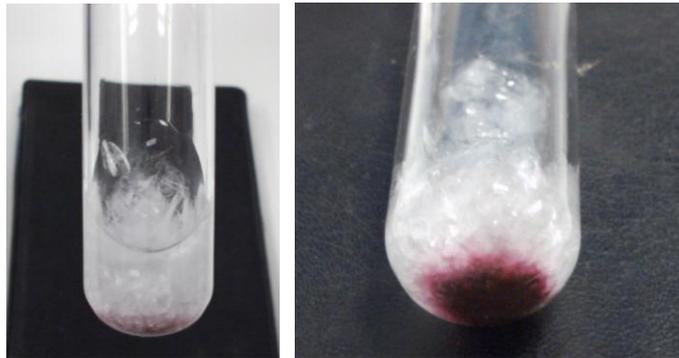


Fig 3-65 : Cristallisation du CTAB à température ambiante et précipitation des nanoparticules d'or.

Deux cas se présentent alors :

- Soit la synthèse a parfaitement fonctionné (comme le montre notre solution en figure 3-66), il suffit alors de retirer délicatement à la pipette le surnageant, puis de réchauffer le CTAB jusqu'à sa température de fusion, puis centrifuger la solution et/ou la purifier à l'aide du mélange chloroforme/phosphatidylcholine présenté précédemment.

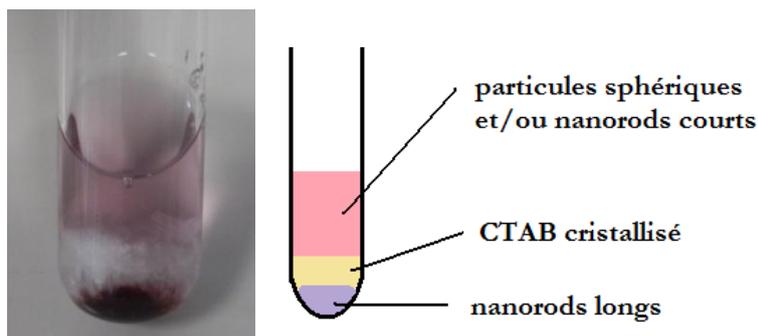


Fig 3-66 : Précipitation des nanoparticules d'or de part et d'autre de la couche de CTAB cristallisé.

- Soit des particules / agrégats de taille volumineuse se sont formés, auquel cas c'est fréquemment le surnageant qui doit être traité par centrifugation et/ou purification à l'aide du mélange chloroforme/phosphatidylcholine.

Les photos ci-après montrent le résultat obtenu après séparation des formes en solution.

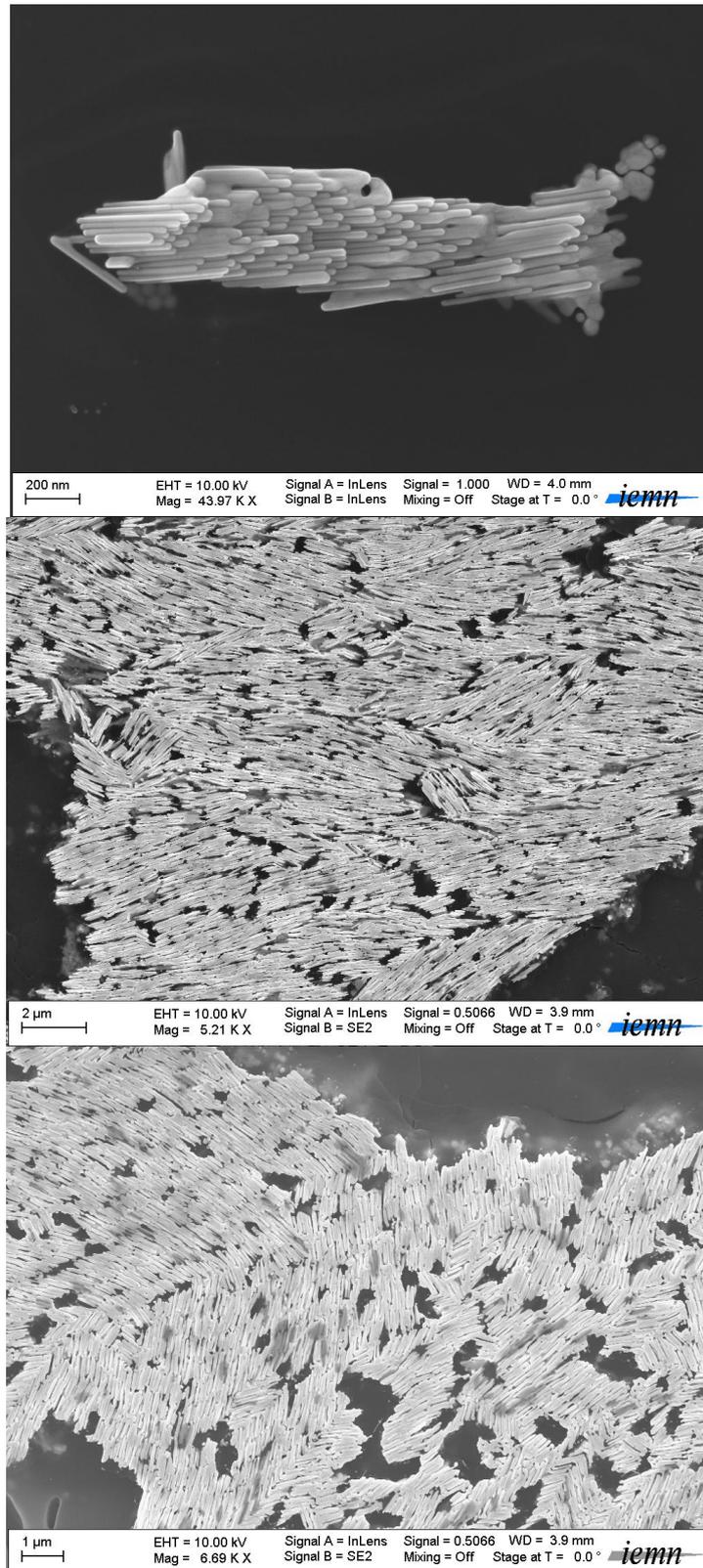


Fig 3-67 : Nanofils longs obtenus après purification. Le séchage sur wafer ainsi que les solvants utilisés lors des étapes de purification ont parfois amené un aspect « soudé » des nanofils entre eux. Néanmoins, lorsqu'ils sont en solution, les nanofils sont bien séparés les uns des autres. La taille moyenne des particules est de 400 nm.

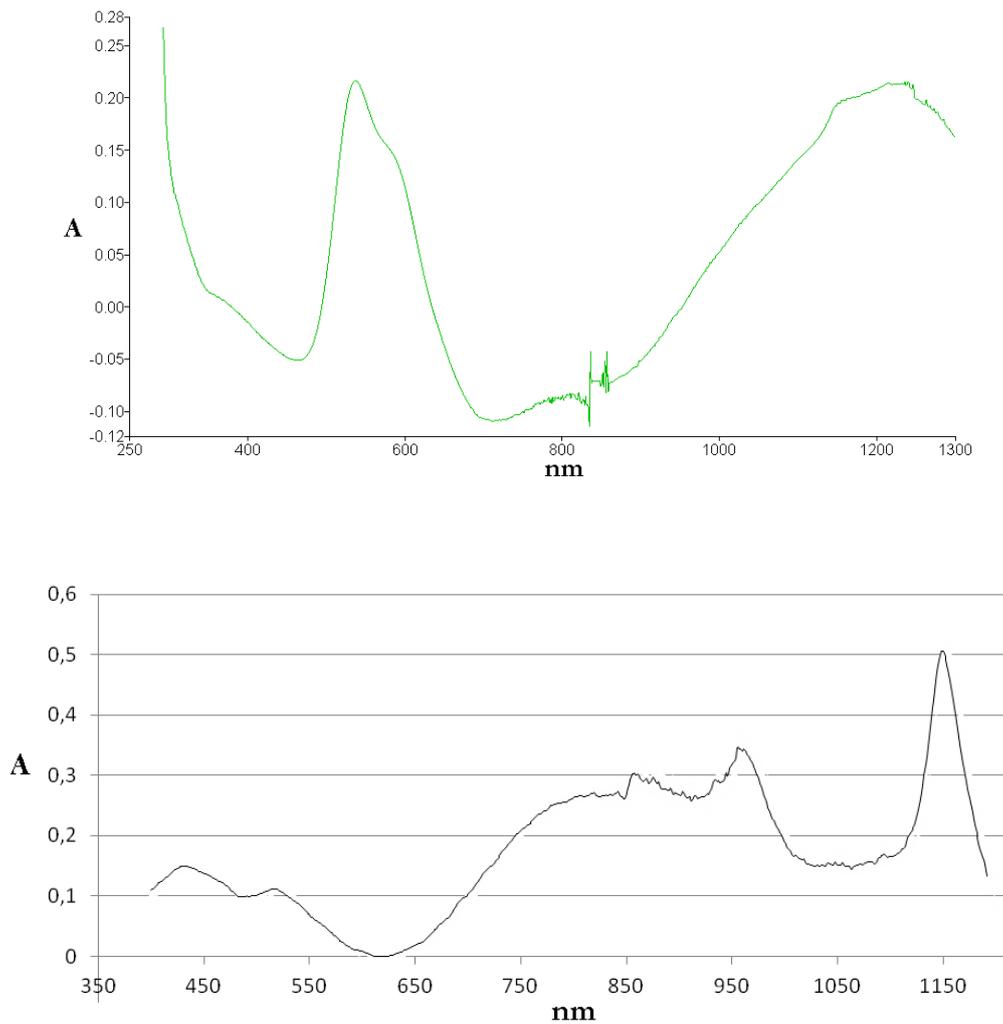


Fig 3-68 : Exemples de spectres UV-Visible obtenus après purification de solutions de nanofils longs, avec bande caractéristique aux alentours de 1000 nm. On constate que le pic longitudinal a été amélioré par rapport à la figure E3 (absorbance de 0.5 au mieux !), ce qui atteste d'une meilleure concentration en nanofils longs dans nos solutions après purification.

Synthèses de nanofils courts à base de solutions de polymère, exemple PVP:

Des nanofils courts peuvent aussi être produits dans des solutions de polymère. Ici la PolyVinylPyrrolidone (PVP) permet à la fois d'obtenir des nanofils courts avec une forme de petits grains aux extrémités arrondies, et des polyèdres. Le seul paramètre utile à faire varier étant la quantité de sel d'or.

Cette synthèse est effectuée sur plaque chauffante, à 100°C, sous agitation magnétique.

Dans un premier bécher, mélanger ajouter :

- 8 ml d'eau DI,
- 12,9 mg de citrate de sodium

Dans un second bécher, mélanger :

- 2 ml d'eau DI,
- 40 mg de sel d'or (HAuCl_4)

Dans un troisième bécher, mélanger :

- 90 ml de propanediol,
- 1,1 g de PVP

Ajouter le bécher 1 puis le bécher 2 au troisième.

Maintenir l'agitation magnétique pendant 5 minutes

La solution doit alors être retirée de la plaque chauffante et laissée à refroidir jusqu'à température ambiante. Elle doit reposer durant 2 jours minimum avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans ce cas, il nous a fallu adapter la quantité de sel d'or à ajouter en solution, la température à laquelle la synthèse a été effectuée, ainsi que la quantité de PVP, comparativement aux synthèses les plus fréquemment présentées dans la littérature.

Les particules que nous avons obtenues sont de taille homogène. Le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art. Cette synthèse est une alternative à la synthèse de nanofils courts en présence de CTAB.

Indications complémentaires :

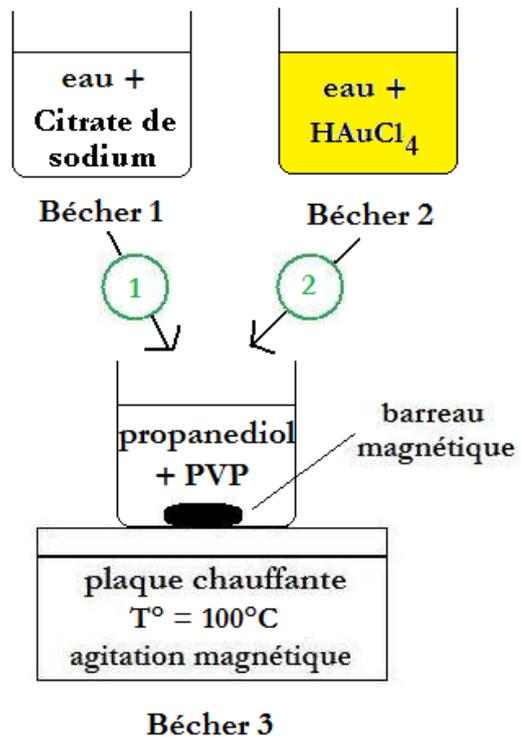
- Purification : nécessaire, afin d'éliminer l'excédent de PVP
- Concentration : par méthode mécanique
- Fonctionnalisation : par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA) page 179 ci-après



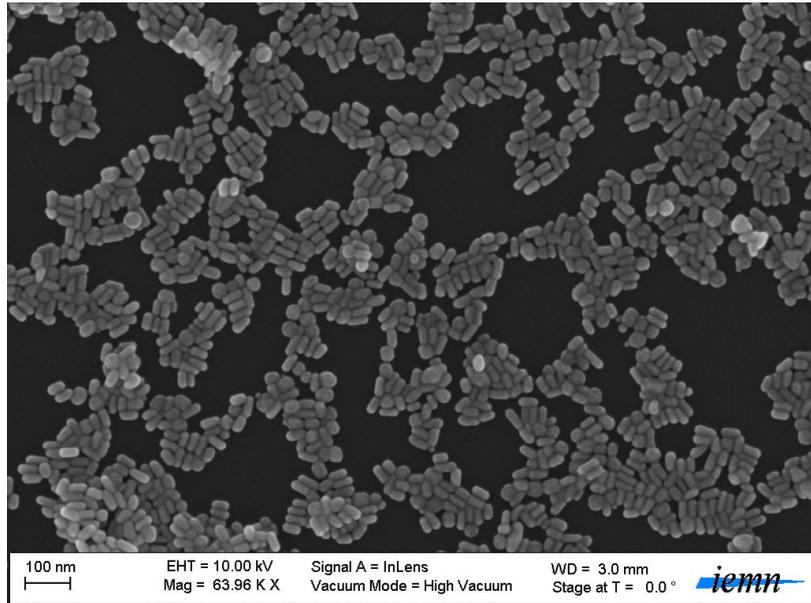


Fig 3-69 : Synthèse de nanofils courts (30 nm environ) en milieu polymère PD/PVP.

Synthèses de polyèdres à base de PVP:

La synthèse est similaire à celle des nanofils courts à base de PVP, seule la quantité de sel d'or du second bécher varie. Il faut en ajouter 3,5 mg (au lieu de 40 mg).

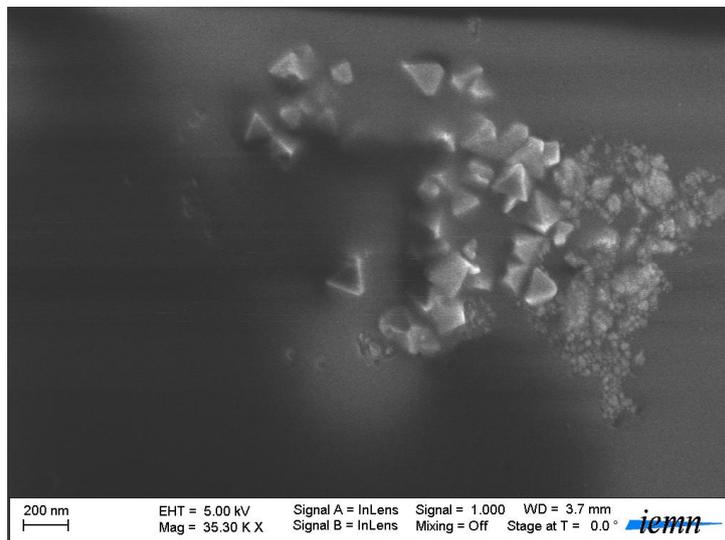


Fig 3-70 : Synthèse de pyramides (140 nm de longueur d'arête) en milieu polymère (PVP)

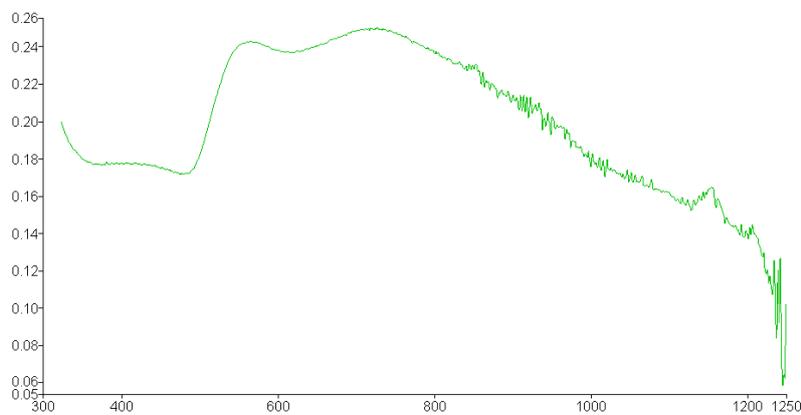
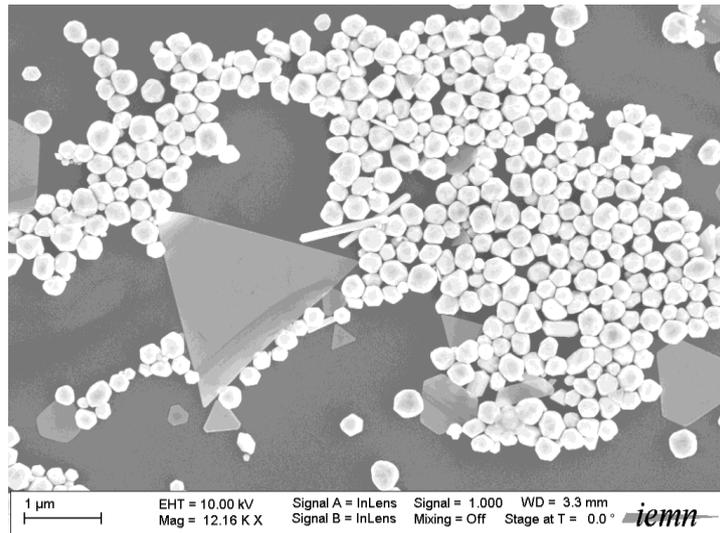


Fig 3-71 : Synthèse de polygones en milieu polymère (PVP) et exemple de spectre UV-Visible associé. Le spectre est bien conforme à celui attendu au vu du spectre « type » présenté dans les figures 3-25 et 3-26 pages 109 et 110.

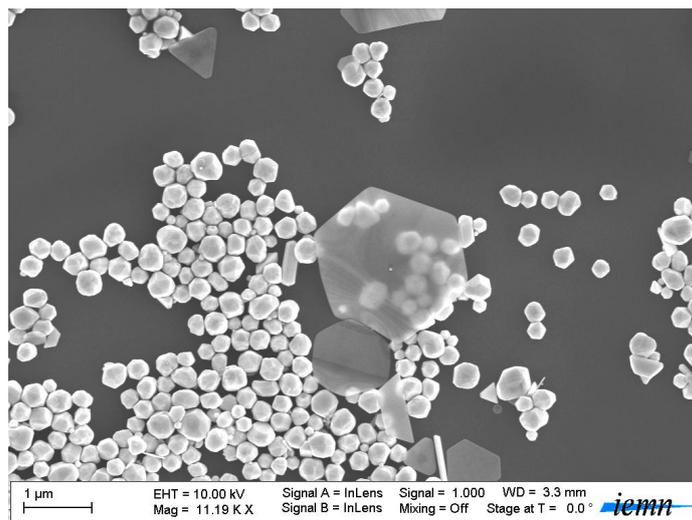


Fig 3-72 : Seconde synthèse de polygones (300 nm de diamètre en moyenne) en milieu polymère (PVP).

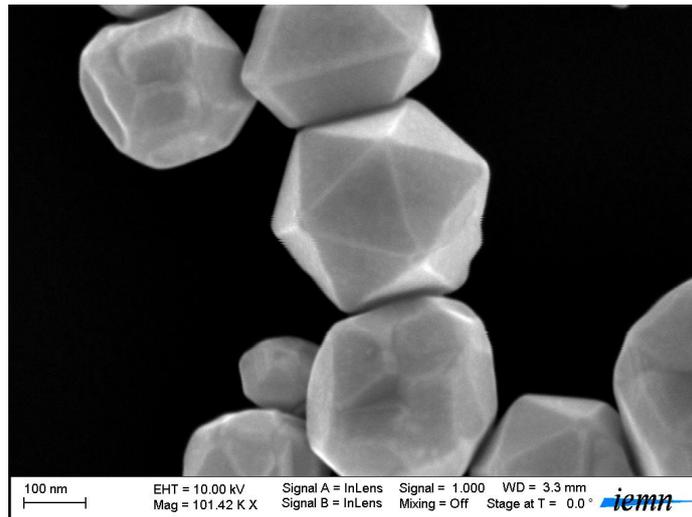


Fig 3-72a : Zoom sur le même wafer que pour la figure 3-72.

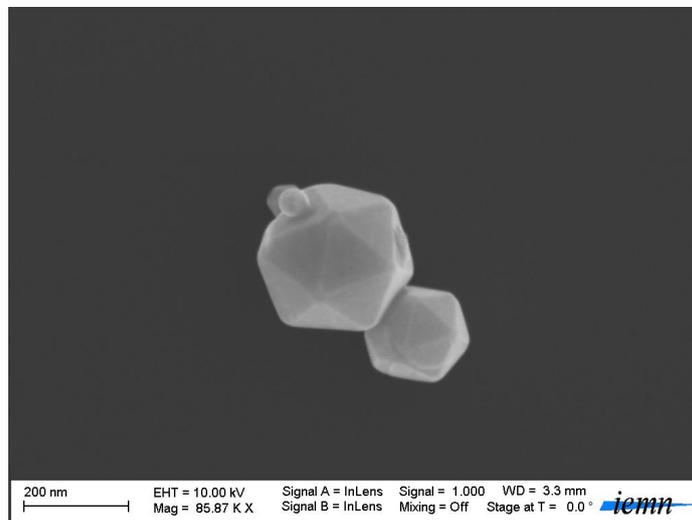


Fig 3-72b : Zoom sur le même wafer que pour les figures 3-72 et 3-72a.

Synthèses de nanotriangles à base de BSA:

Des nanotriangles peuvent également être fabriqués par réduction dans un milieu contenant de l'albumine sérique bovine (BSA).

Cette synthèse est effectuée dans un bain thermostaté, à 37°C.

Elle requiert la préparation en amont :

- d'une solution mère de HAuCl_4 de concentration 10 mM (Attention, cette solution mère est différente de la solution généralement utilisée !)
- d'une solution mère de nitrate d'argent de concentration 8 mM (Attention, cette solution mère est différente de la solution généralement utilisée !)

Dans un premier bécher, mélanger (on pourra s'aider d'un bain à ultrasons pour que la dissolution soit complète):

- 4 ml d'eau DI à 37°C,
- 10 mg de BSA

Dans un second bécher, mélanger dans l'ordre (en agitant le bécher entre chaque ajout):

- 5 ml d'eau DI à 37°C,
- 1 ml de la solution mère de HAuCl_4 ($C = 10\text{mM}$),
- Le contenu du premier bécher,
- 5 μl de la solution mère de nitrate d'argent ($C = 8\text{mM}$)

Le second bécher doit alors rester au repos à 37°C dans le bain thermostaté pendant 7h, puis laissée à refroidir à température ambiante avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 6 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Cette synthèse est adaptée de Xie *et al.*¹⁹⁶

Dans le cas de cette synthèse, la caractérisation morphologique par MEB n'a pas été possible. En effet, même après centrifugation, la BSA résiduelle entravait le bon fonctionnement du microscope. Nos autres tentatives après avoir fonctionnalisé les particules avec des thiols ont connu le même sort. Cette synthèse reste très intéressante pour notre utilisation ultérieure en imagerie scanner, car elle permet d'obtenir dès le départ de bonnes concentrations en particules d'or en solution, que l'on peut encore améliorer par une étape de concentration par centrifugation (méthode mécanique).

Indications complémentaires :

- Purification : non nécessaire pour notre utilisation finale (mais nécessaire si l'on souhaite faire de l'imagerie pour caractériser les particules)
- Concentration : par méthode mécanique
- Fonctionnalisation : non indispensable (ou par composés thiolés)

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (D'TDTPA) page 179 ci-après

Synthèses de microparticules triangulaires et octogonales à base d'extrait de citronnelle:

Des microparticules de formes variées peuvent aussi être obtenues par réduction du sel d'or en présence d'extraits de citronnelle.

Cette synthèse est effectuée à température ambiante et requiert la préparation en amont :

- d'une décoction de citronnelle : celle-ci est obtenue en faisant bouillir 100 g de bulbes frais dans 200 ml d'eau déionisée durant 1h30. Le volume final récupéré après filtration est de 180 ml. La décoction est laissée à refroidir puis mise au frais 24 h. Une décantation naturelle supplémentaire survient. On récupère le surnageant. Cette décoction peut se conserver deux semaines sans altération visible (brunissement de la solution) au réfrigérateur.
- de la solution mère de HAuCl_4 comme décrite en pages 136-137,

Dans un bécher, mélanger :

- 5,5 ml d'eau DI,
- 0,5 ml de la solution mère de HAuCl_4 ,
- 1 ml de décoction de citronnelle

La solution doit être laissée à reposer 12h au réfrigérateur avant tout autre usage. Le stockage peut se faire pendant 2 semaines maximum dans un contenant en verre fermé, au réfrigérateur et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Dans le cas de cette synthèse, il faut calibrer le volume de citronnelle à chaque fois que l'on réalise une nouvelle décoction. Il existe un mélange de formes difficilement séparables, car les particules polygonales sont très fines, et donc légères. Une séparation par centrifugation n'était donc pas envisageable. Il est néanmoins possible de laisser décanter la solution pendant plusieurs jours pour récupérer le surnageant, qui contient plus de particules polygonales que d'amas (le ratio est légèrement amélioré). Le résultat est néanmoins satisfaisant au regard de l'état de l'art.

Indications complémentaires :

- Purification : non nécessaire pour notre usage ultérieur
- Concentration : par méthode mécanique
- Fonctionnalisation : par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA) page 179 ci-après

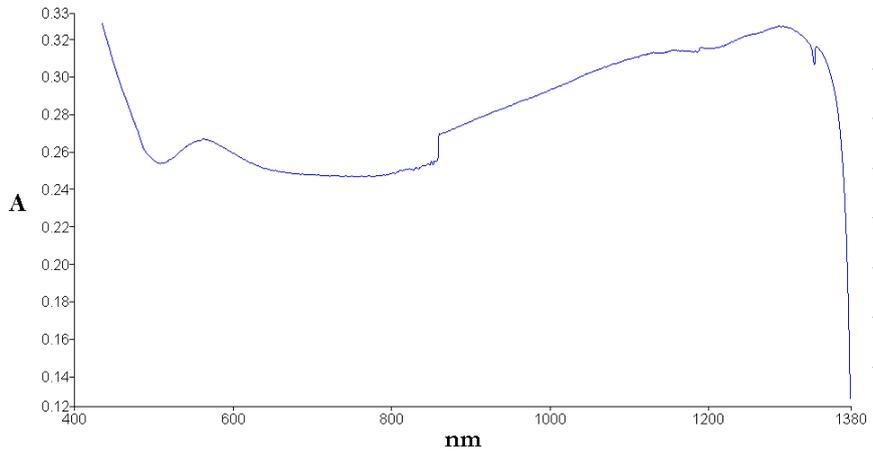
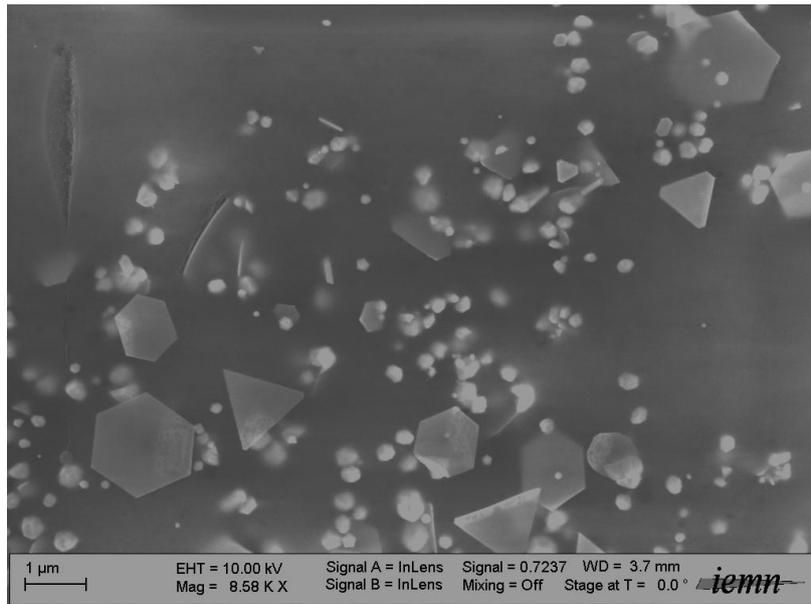


Fig 3-73 : Synthèse de polygones via une décoction de citronnelle et spectre UV-Visible associé.

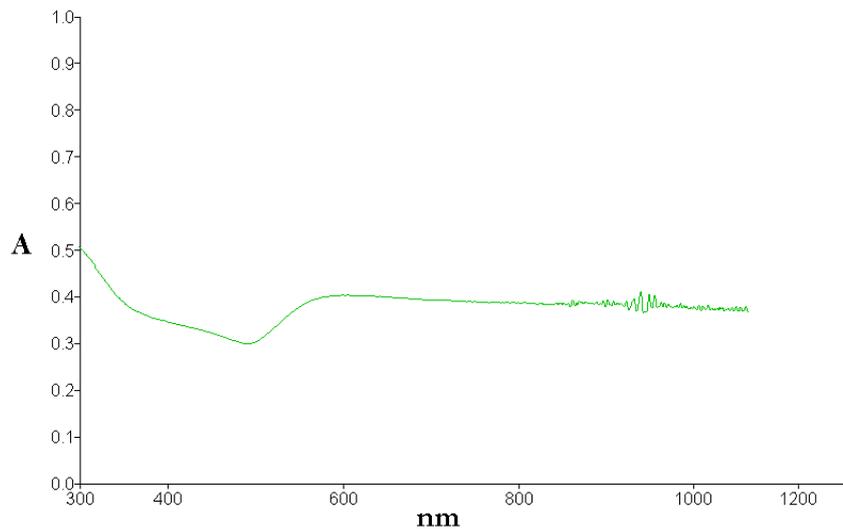
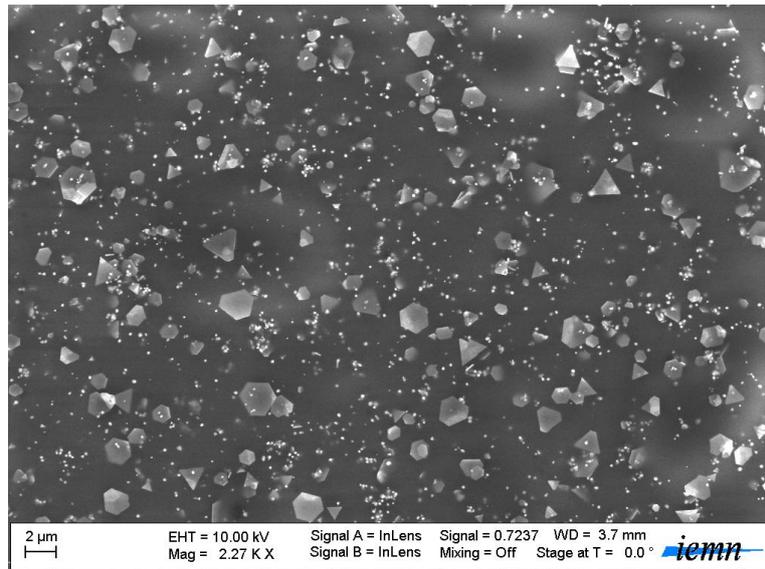


Fig 3-74 : Seconde synthèse de polygones via une décoction de citronnelle et spectre UV-Visible associé. Le spectre est bien conforme à celui attendu au vu du spectre « type » présenté dans la figure 3-27 (courbe 3) page 110.

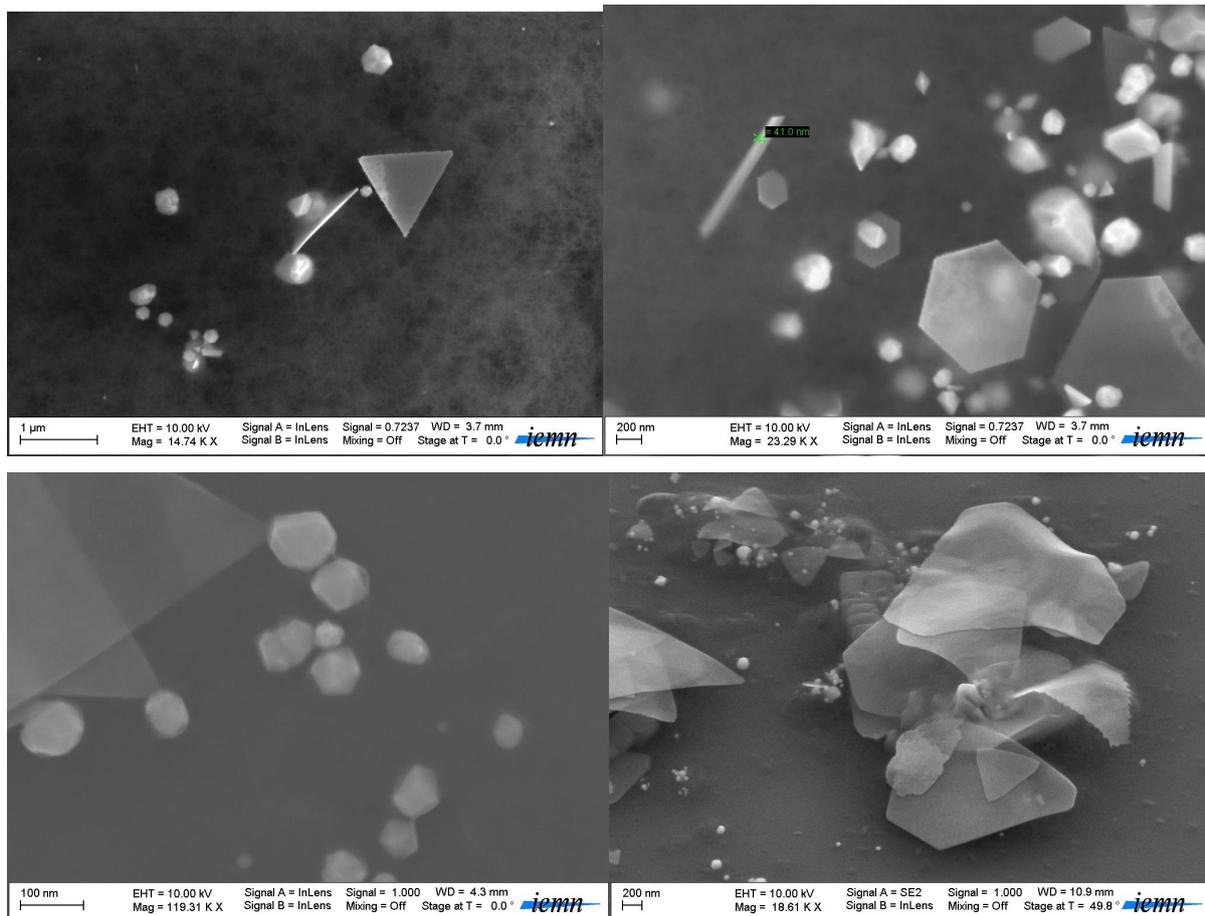


Fig 3-75 : Autres illustrations de nos synthèses de polygones via des décoctions de citronnelle.

Synthèses de microparticules dendritiques à extrémités « carrées » à base d'extrait de citronnelle:

La synthèse est similaire à celle des microparticules triangulaires et octogonales à base d'extrait de citronnelle, seule la quantité d'extrait de citronnelle varie. Il faut en ajouter 6,5 ml (au lieu de 1 ml). Les particules que nous avons obtenues sont de forme homogène. Le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art, bien que la taille des particules que nous avons obtenues soit bien plus importante (2 microns!) que celles que l'on peut trouver dans la littérature.

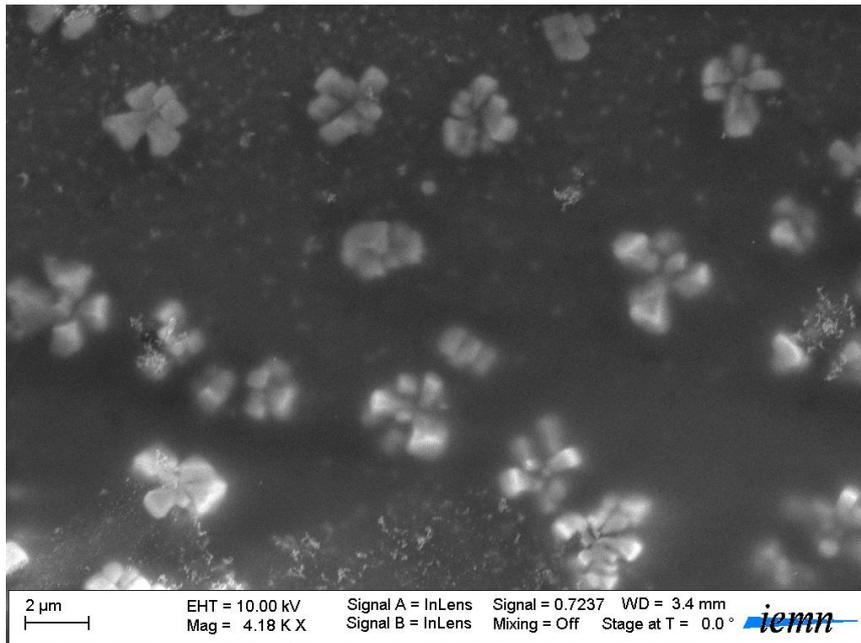


Fig 3-76 : Synthèse de « microdendrites » (2 μm environ) via une décoction de citronnelle. Les extrémités sont de forme « carrée ».

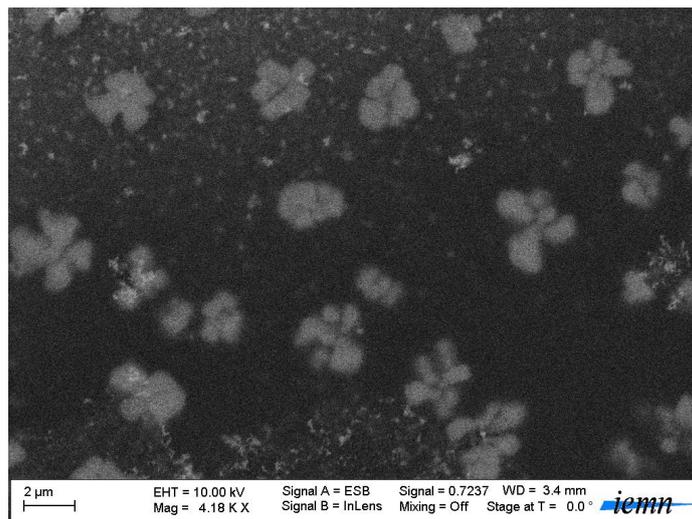


Fig 3-77 : Seconde synthèse de « microdendrites » via une décoction de citronnelle. Les extrémités sont de forme « carrée ».

Synthèses de microdendrites à base de HEPES:

Enfin, des microdendrites à extrémité pointues peuvent être obtenues par réduction par le buffer HEPES.

Cette synthèse est effectuée à température ambiante.

Elle requiert la préparation en amont :

- d'une solution d'HEPES de concentration 100 mM
- d'une solution mère de NaOH de concentration 1 M (Attention, cette solution mère est différente de la solution généralement utilisée !)
- d'une solution mère de H₂AuCl₄ de concentration 10 mM (Attention, cette solution mère est différente de la solution généralement utilisée !)

Dans un bécher, sous agitation magnétique, mélanger dans l'ordre:

- 3 ml d'eau DI,
- 2 ml de solution mère HEPES,
- 550 µl de solution mère de NaOH,
- 50 µl de solution mère de H₂AuCl₄ (l'ajout à la toute fin du sel d'or est capitale)

La solution doit être laissée à reposer 24h à 3 jours à température ambiante, à l'abri de la lumière, avant tout autre usage. C'est l'apparition d'une belle couleur vert émeraude qui signale la fin de la réaction. Le spectre UV-Vis en donne la confirmation.

Le stockage peut se faire pendant 2 mois maximum dans un contenant en verre fermé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sans avoir fait subir d'étape de purification à la solution.

Les particules que nous avons obtenues sont de forme homogène. Le résultat est satisfaisant au regard de l'état de l'art, bien que la taille des particules que nous avons obtenues soit bien plus importante (20 microns!) que celles que l'on peut trouver dans la littérature.

Indications complémentaires :

- Purification : non nécessaire
- Concentration : par méthode mécanique ou chimique
- Fonctionnalisation : par composés thiolés

=>Détails disponibles :

§f) Méthodes employées pour la concentration des particules page 174 ci-après

§g) Fonctionnalisation générale des échantillons page 178 ci-après

§h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA) page 179 ci-après

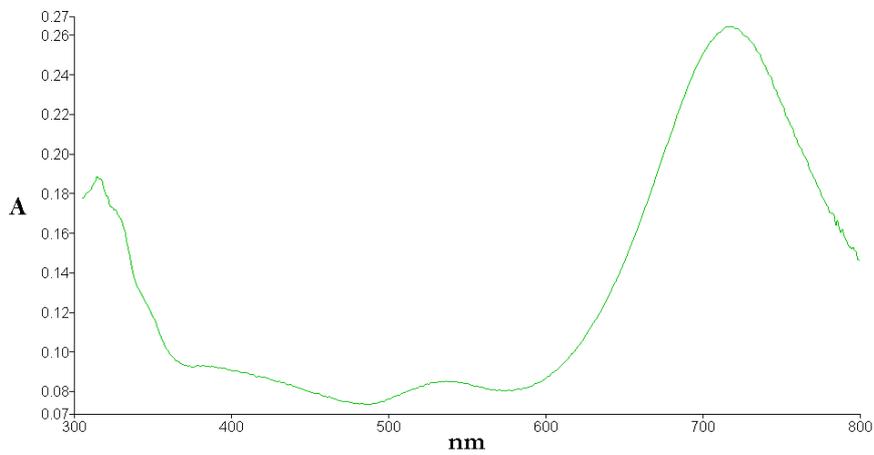
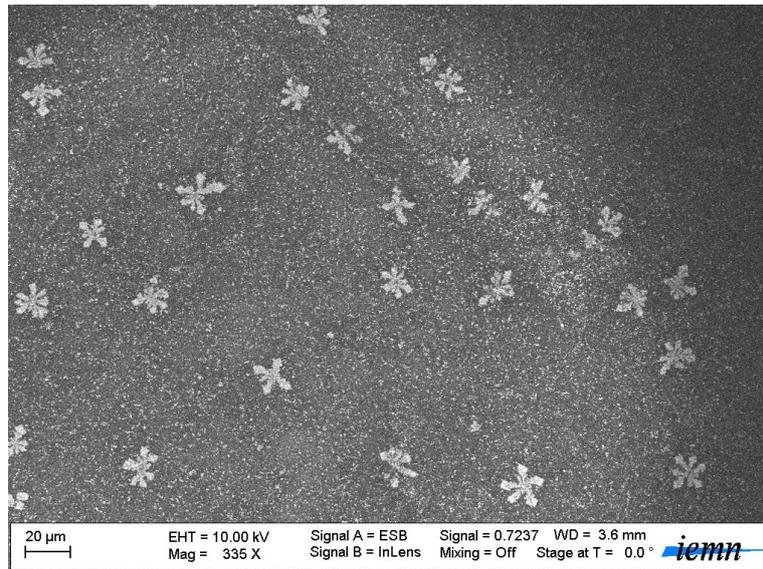


Fig 3-78 : Synthèse de « microdendrites » (15 μm environ) présentant des extrémités pointues et spectre UV-Visible associé. Le spectre est bien conforme à celui attendu au vu du spectre « type » présenté dans la figure 3-24 page 109.

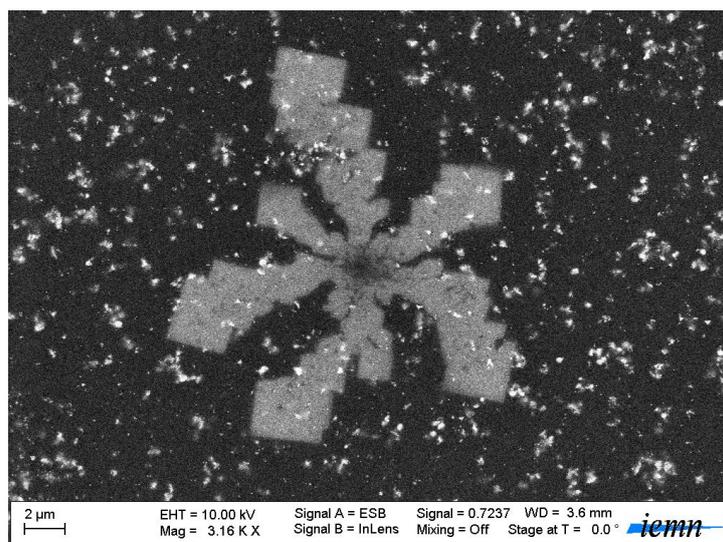


Fig 3-78a : Zoom de la figure 3-78. La particule fait approximativement 18 μm d'envergure.

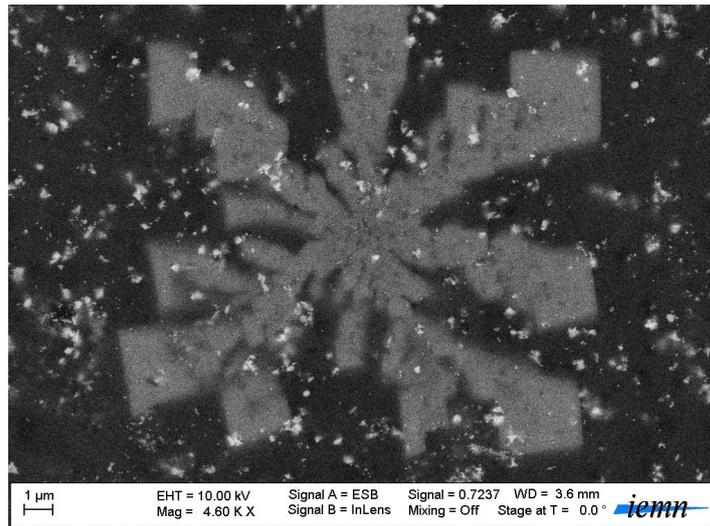


Fig 3-78b : Zoom de la figure 3-78.

e) Détermination de la concentration par Spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES)

Les solutions synthétisées par voie aqueuse sont très peu concentrées, et la méthode de la loi de Beer-Lambert ne fonctionne pas très bien pour déterminer les concentrations de solutions contenant des particules aux formes exotiques. C'est pourquoi une méthode très sensible et fiable, la spectrométrie d'émission atomique avec couplage plasma inductif, a été choisie (figure 3-41).

Pour pouvoir utiliser cet équipement, les particules d'or en solution doivent être dissoutes au préalable, par exemple par un mélange d'acides (HCl / HNO₃), encore appelé « eau régale » (voir page 112).

Cette technique utilise un plasma à haute température (supérieur à 6000°C, tandis que la température de fusion de l'or est de 1063°C) afin d'ioniser, atomiser les solutions, puis exciter les atomes. Lors de leur retour à l'état fondamental, des photons sont émis dans l'UV et le visible. Ces photons sont quantifiés, ce qui permet d'accéder aux concentrations des solutions en fonction des atomes choisis.

Ci-dessous (figures 3-79 et 3-80) sont présentés les spectres UV-Vis que nous avons obtenus pour nos nanofils d'or, puis leur solubilisation par le mélange eau régale, et l'apparition progressive des ions AuCl₄⁻ (à 285 nm):

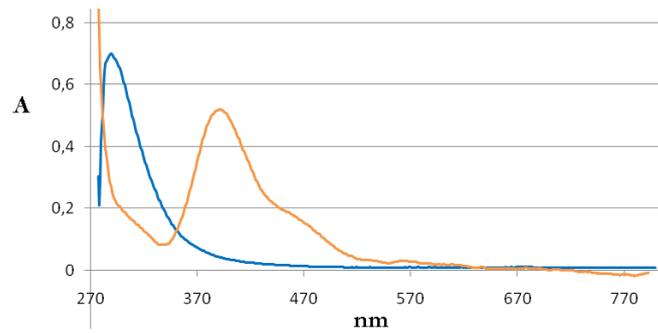


Fig 3-79 : Spectre UV-Vis du sel d'or dans l'eau (en bleu), spectre du mélange $\text{HAuCl}_4\text{-CTAB}$ (en orange).

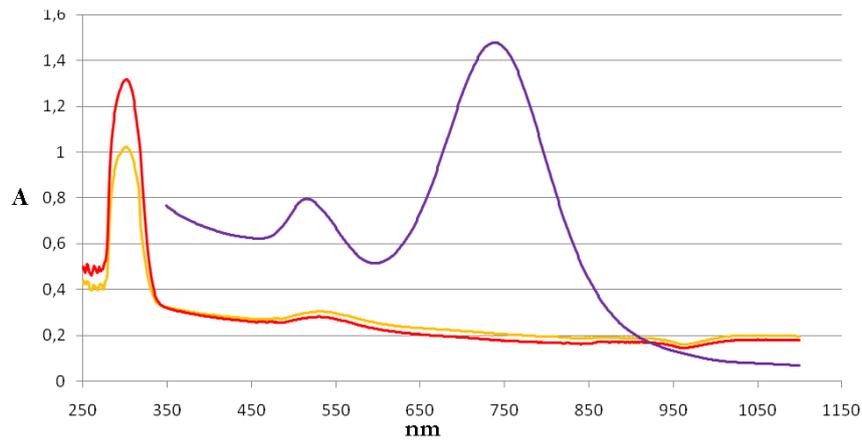


Fig 3-80 : Spectres d'absorption de nanofils d'or avant dissolution par l'eau régale (en violet), après 2 minutes de dissolution (en orange), après 4h de dissolution (en rouge). La dissolution peut être considérée comme totale après 4h de traitement, puisque l'on obtient un spectre similaire à celui du sel d'or directement dissout dans l'eau présenté dans la figure 3-79 précédente.

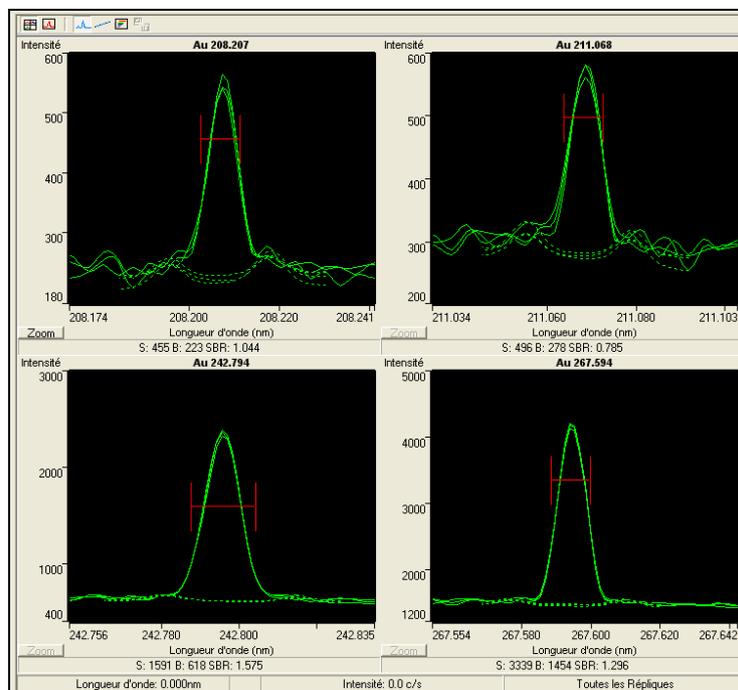


Fig 3-81 : Spectres obtenus à partir de l'ICP-AES de l'université de Lille 1 (CNRS UMR 8217 Géosystèmes - UFR de Chimie) (en pratique on analyse les spectres Au 242.794nm et Au 267.594nm).

Lors des synthèses, les agents réducteurs du sel d'or HAuCl_4 sont toujours présents en excès. Les réactions sont donc en théorie totales, si l'on excepte les problèmes potentiels de redissolution, liés aux autres composés présents en solution.

Dans la pratique, les filtrages, centrifugations et lavages successifs des échantillons tendent à engendrer une perte de 25% par rapport à la quantité initiale de particules présentes en solution.

Le tableau ci-dessous (figure 3-82) présente les **valeurs moyennes** constatées pour nos solutions, avant et après traitement de purification (c'est-à-dire avant toute étape de fonctionnalisation et de re-concentration).

	Concentration Théorique (mg/l)	Concentration déterminée après traitement (mg/l)	Concentration déterminée après traitement (mg/ml)
Solution de nucléation	80	57	$5,7 * 10^{-2}$
Nanofils courts en présence de CTAB	80	66	$6,6 * 10^{-2}$
Nanofils longs en présence de CTAB	80	74	$7,4 * 10^{-2}$
Nanodendrites en présence d'HEPES	64	35	$3,5 * 10^{-2}$
Grands polygones en présence d'extrait de citronnelle	226	200	$20 * 10^{-2}$
Petits polygones en présence de BSA	394	373	$37,3 * 10^{-2}$

Fig 3-82 : Table de valeur des concentrations en or de nos solutions, (théoriques et mesurées par ICP-AES).

Sachant que les analyses par CT-scanner (cf. p97, 98, 99, études de Hanfield, Xu, Jackson et Nasiruzzaman) nécessitent des concentrations de l'ordre de 5 mg/ml (soit $2.5 * 10^{-2}$ mol/L), on s'aperçoit d'autant mieux de la nécessité d'une mise au point d'une étape de concentration de nos solutions. L'objectif est de les concentrer environ 100 fois.

La partie suivante décrit les moyens utilisés afin d'aboutir à cet objectif.

f) Méthodes employées pour la concentration des particules

➤ Concentration des particules par précipitation par addition d'alcools à courte chaîne :

Cette méthode est applicable à toutes les particules ayant été synthétisées.

Cette première tentative s'est soldée par un échec.

En effet, l'ajout immédiat de méthanol, éthanol ou isopropanol aux solutions provoque l'agrégation des particules d'or de manière irréversible, même si l'on sonique immédiatement les échantillons (par bain à ultrasons ou par sonde plongeante à impulsions). Par ailleurs, l'utilisation de ces équipements peut parfois être nuisible pour les particules selon le milieu dans lequel elles sont dispersées¹⁹⁷. En effet la température de fusion de l'or peut être largement dépassée lors des phénomènes de cavitation. L'effet néfaste des alcools sur les particules produites en présence de CTAB s'explique par le changement de forme subi par les micelles en fonction des concentrations d'alcool mises en jeu¹⁹⁸.

➤ Concentration par utilisation des propriétés du système CTAB / butanol / eau :

Cette méthode est applicable aux particules ayant été synthétisées en présence de CTAB.

Cette tentative fut une déception. En effet, l'effet est spectaculaire à l'œil nu. Les particules sont bien séparées du CTAB et sont bien concentrées. Néanmoins, lorsque l'on effectue une vérification de l'état à l'arrivée par UV-Vis, on s'aperçoit que les particules ont également subi une large altération de leur forme, passant de l'état de nanofils à des ovoïdes ou à des sphères. Les détails techniques sont décrits ci-dessous :

Dans cette méthode, le choix se porte sur le butanol car c'est le premier des alcools à ne pas être complètement miscible dans l'eau.

La solubilité du CTAB dans l'eau est de 3 g/L tandis qu'elle est de 30 g/L dans le butanol¹⁹⁹. Le butanol a une solubilité de 7,7g/100g d'eau, et un LogP = 0,9. Ainsi, il est possible de faire migrer les particules d'une phase dans l'autre, avec une perte assez minime. Le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter, avec un volume de butanol approprié (point A sur la figure 3-83 ci-dessous²⁰⁰). Il y a bien concentration des particules, puisque 10% de butanol suffisent à se situer dans la zone grise du diagramme, qui correspond à un mélange biphasique.

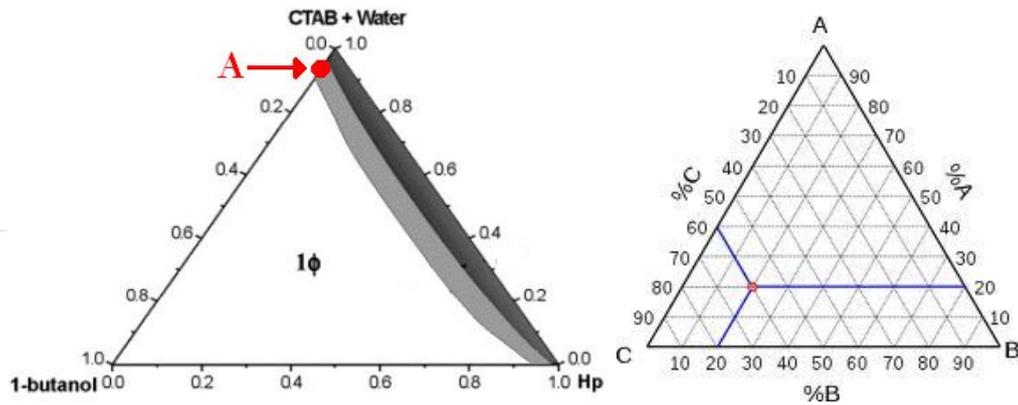


Fig 3-83 : Diagramme de phases d'un mélange contenant du butanol, et une phase aqueuse CTAB+eau.

L'agitation ne doit pas être trop brusque, afin d'éviter de faire mousser la solution. Le passage des particules de la phase aqueuse à la phase organique est quasiment instantané, grâce à l'écart important de solubilité du CTAB.

Cependant, lors du changement de phase, les particules subissent une déformation puis une agrégation, et enfin, à plus long terme une dissolution presque totale, comme le montrent les courbes d'absorbance UV-Visible sur la figure 3-84 ci-dessous, prises avant et après l'étape de concentration des nanofils que nous avons synthétisés.

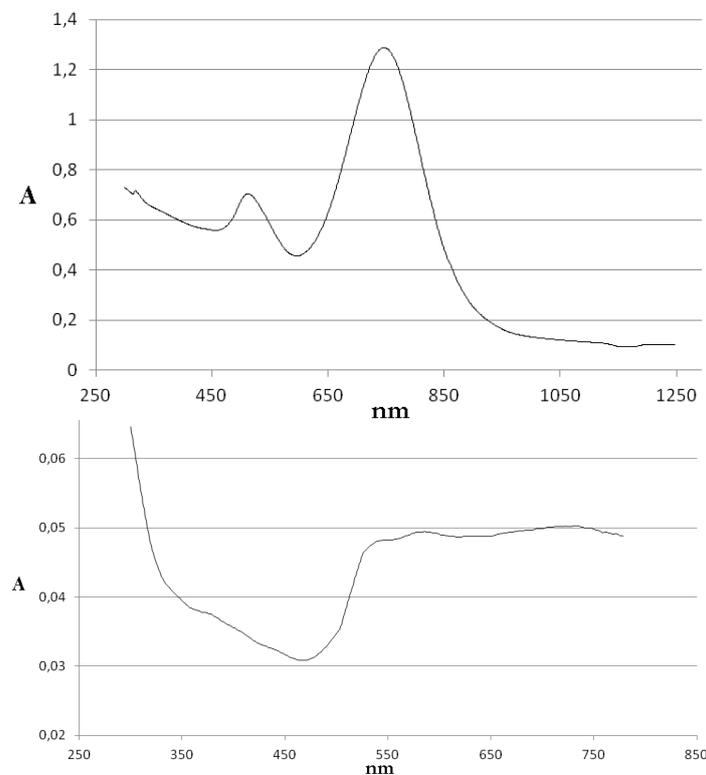


Fig 3-84 : Spectre UV-Vis de nanofils d'or avant concentration par le mélange CTAB/butanol/eau (en haut), Spectre UV-Vis après concentration (en bas). On constate la totale dégradation de l'échantillon.

➤ Concentration et fonctionnalisation par phospholipides :

Nous avons déjà évoqué cette stratégie en page 117. Cette méthode est applicable aux particules ayant été synthétisées en présence de CTAB. Il est important de noter qu'il s'agit d'une méthode qui combine concentration et fonctionnalisation des particules.

Lorsque des particules d'or en solution sont directement mélangées avec du chloroforme, la modification de l'absorbance UV-Visible est même avantageuse. L'exemple ci-dessous (figures 3-85 et 3-86) montre comment l'ajout de chloroforme à une solution de nanofils qui pouvait sembler médiocre (courbe rouge), « nettoie » les particules d'un excès parasite de CTAB, et améliore la solution (courbe bleue, le pic longitudinal est bien meilleur).

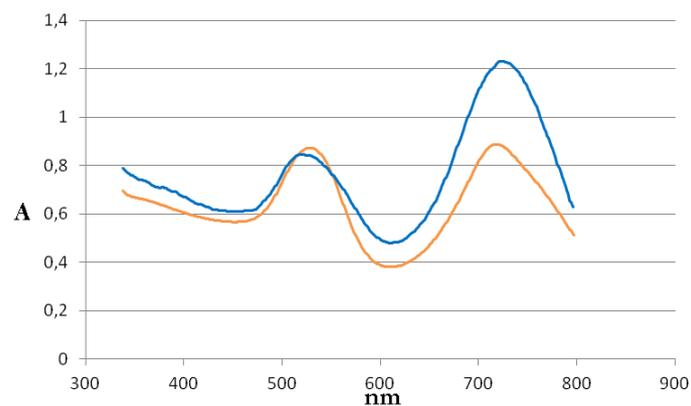


Fig 3-85 : Amélioration du spectre UV-Vis d'une solution de nanofils d'or par utilisation du mélange chloroforme/phosphatidylcholine (spectre avant en rouge, spectre après en bleu).

Nos proportions usuelles sont les suivantes : pour 150 ml de nanofils, on ajoute 75 ml de chloroforme, dans lequel 1,125g de phosphatidylcholine a été dissous (figure 3-86).

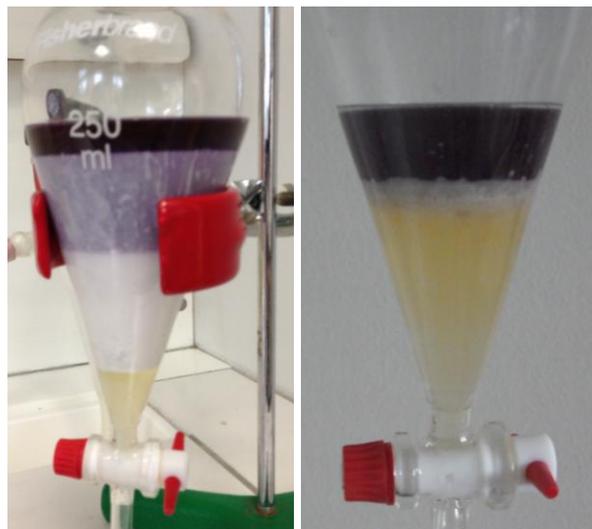


Fig 3-86 : Séparation de phase en cours à gauche (de haut en bas : nanofils d'or en violet foncé, mélange nanofils/CTAB en violet clair, CTAB pur en blanc, chloroforme/phosphatidylcholine en jaune), séparation terminée à droite.

Il s'agit de la technique que nous utilisons désormais en routine pour purifier et concentrer nos solutions de particules lorsque celles-ci ont été produites en présence de CTAB.

➤ Concentration par méthode chimique :

Cette méthode est applicable à toutes les particules que nous avons synthétisées.

Nous pouvons appliquer cette méthode pour toutes les particules n'ayant pas été synthétisées en présence de CTAB.

On utilise des chaînes aliphatiques possédant une unique fonction thiol.

La dissolution de thiols dans un solvant organique est suivie de l'ajout de la solution aqueuse de particules. Cette méthode permet d'assurer une bonne solubilité dans les solvants apolaires.

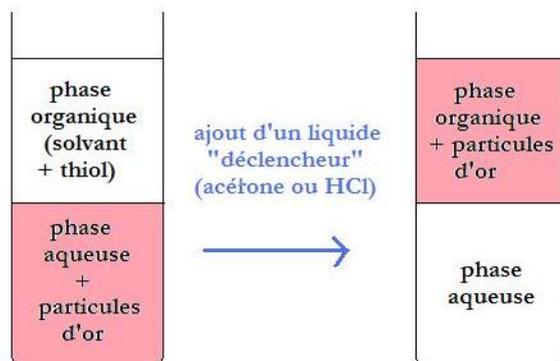
Nous avons utilisé cette méthode avec les molécules suivantes :

- Perfluorodécane-thiol : Voir chapitre 4 page 198.
- 1-Dodécane-thiol :

Méthode 1 : Les particules d'or en solution aqueuse sont mises en contact avec un volume plus faible de dodécane-thiol. On ajoute ensuite très progressivement de l'acétone à la solution biphasée (sous agitation magnétique douce). A partir d'un seuil visible à l'œil nu, les particules vont commencer à migrer de phase, et se retrouver concentrée dans la couche supérieure.

Méthode 2 : Les particules d'or en solution aqueuse sont mises en contact avec un volume plus faible de dodécane-thiol/toluène. Le ratio atomique est (Au : S = 2 : 1). On ajoute ensuite à cette solution biphasée de l'acide chlorhydrique très concentré, sous agitation magnétique douce. A partir d'un seuil visible à l'œil nu, les particules vont commencer à migrer de phase, et se retrouver concentrée dans la couche supérieure.

Dans les deux cas, on doit retrouver la situation suivante :



➤ Concentration par méthode mécanique :

Cette méthode est applicable à toutes les particules que nous avons synthétisées.

Nous pouvons appliquer cette méthode pour toutes les particules n'ayant pas été synthétisées en présence de CTAB.

Il suffit d'utiliser un évaporateur rotatif afin d'éliminer la plus grande quantité d'eau possible, en vérifiant au fur et à mesure qu'il ne se crée pas de phénomène d'agrégation entre les particules. On achève ensuite la concentration des particules en utilisant une centrifugeuse (on effectue autant de cycles de 15 minutes à 15 000 RPM que nécessaire).

g) Fonctionnalisation générale des échantillons

Dans notre cas, l'intérêt principal de la fonctionnalisation est de limiter l'agrégation des particules lors de l'étape de concentration. Elle peut aussi être mise à profit pour inclure des fonctions chimiques utilisables lors de greffages ultérieurs.

De façon générale, la fonctionnalisation de nos particules est réalisée de deux façons :

➤ Phospholipides :

Cette fonctionnalisation (qui découle de l'étape de purification et concentration des particules) a été présentée dans la section précédente.

➤ Composés thiolés :

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une unique fonction thiol :

Cette fonctionnalisation (qui découle de l'étape de purification et concentration des particules) a été présentée dans la section précédente.

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une fonction thiol à une extrémité, et une fonction amine ou acide carboxylique à l'autre extrémité :

Nous avons utilisé cette méthode avec les molécules suivantes :

- O-(2-Carboxyethyl)-O'-(2-mercaptoethyl)heptaethylene glycol
- 11-Mercaptoundecanoic acid
- Cysteamine
- DTDTPA (voir section suivante)

L'emploi de ces thiols permet de conserver la solubilité en milieu aqueux des particules. Il suffit de les ajouter (en large excès) directement à la solution de particules, et de maintenir une agitation magnétique pendant 12h.

h) Fonctionnalisation spécifique des échantillons (DTDTPA)

Dans notre cas, l'intérêt principal de cette fonctionnalisation est de permettre la combinaison d'atomes d'intérêt (or et gadolinium) pour l'imagerie scanner.

Un composant un peu plus complexe, le DTDTPA (figure 3-87), acide dithioldiéthylènetriaminepentacétique (issu du DTPA : acide diéthylènetriaminepentacétique auquel on vient greffer deux fonctions thiols) a été synthétisé, en se basant sur la synthèse proposée par Debouttière *et al.*²⁰¹, aménagée au vu de nos équipements au laboratoire (voir Annexe 14 page 256).

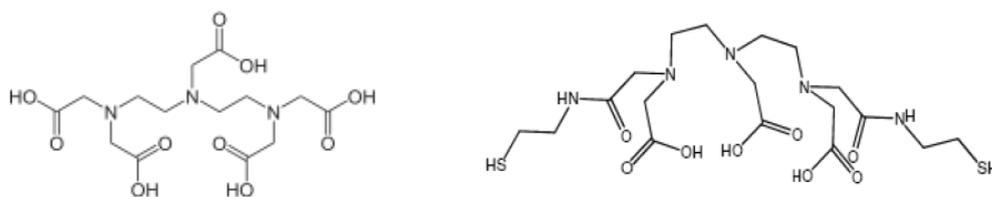


Fig 3-87 : Structures chimiques de DTPA (à gauche) et DTDTPA (à droite).

Nous avons utilisé ce composé que nous avons synthétisé dans nos expérimentations avec les ions gadolinium que nous détaillons par la suite.

Ci-après (figure 3-88), nos analyses par FTIR de la molécule de base (DTPA, en orange), et de la molécule finale (DTDTPA, en bleu) que nous avons obtenue, pour laquelle la présence de thiol est confirmée par la bande C.

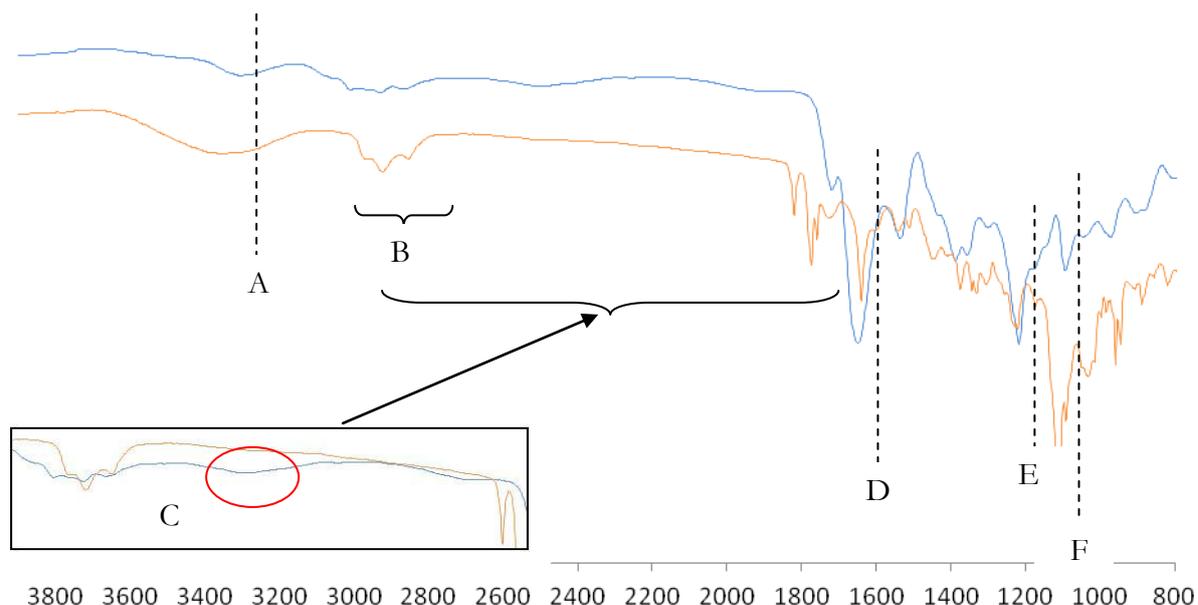


Fig 3-88 : Spectre FTIR du DTPA (en orange) et du DTDTPA (en bleu).

Bande A : liaisons N-H

Bande B : liaisons C-H

Bande C : thiols à 2500 cm^{-1} (cerclé de rouge, car la bande est faible de nature),
anhydrides cycliques à 1770 cm^{-1}

Bande D : amides à 1640 cm^{-1}

Bande E : acides carboxyliques à 1220 cm^{-1}

Bande F : liaisons C-O

Le composé DTDTPA est directement ajouté aux particules d'or dès la fin de sa synthèse, car il s'agit d'un composé sensible, qui forme rapidement des ponts disulfures (il forme alors une pâte collante jaunâtre).

L'intérêt de cette molécule est sa capacité complexante. Une fois les particules d'or fonctionnalisées, il est possible d'ajouter à la solution un composé ionique, donnant accès à des ions multivalents, tels que les ions gadolinium (employés dans cette étude, et commercialement appelé Magnevist®), les ions manganèse (la forme commerciale Teslascan® utilise un complexe de dipyridoxal diphosphate au lieu d'un complexe de DTDTPA), ou les ions ferriques, afin d'obtenir des particules qui peuvent aussi être employées en imagerie IRM.

Nous avons vérifié la saturation des molécules de DTDTPA par les ions Gd^{3+} en utilisant du xylénol orange. Ce composé s'utilise à pH 4, et ses complexes virent de couleur du jaune au rose puis au violet (figure 3-89) lorsque le pH augmente. Le xylénol orange est en effet un complexant plus faible que le DTDTPA, et permet de détecter les ions Gd^{3+} laissés libres en solution une fois les molécules de DTDTPA saturées (figure 3-90).



Fig 3-89 : Changement de couleur d'une solution de xylénol en fonction du pH (à gauche pH=2, à droite pH=8). Puisque le but est d'observer une variation de couleur vers le rose/rouge lors d'une éventuelle complexation, on constate qu'il vaut mieux utiliser l'indicateur colorimétrique à pH acide.

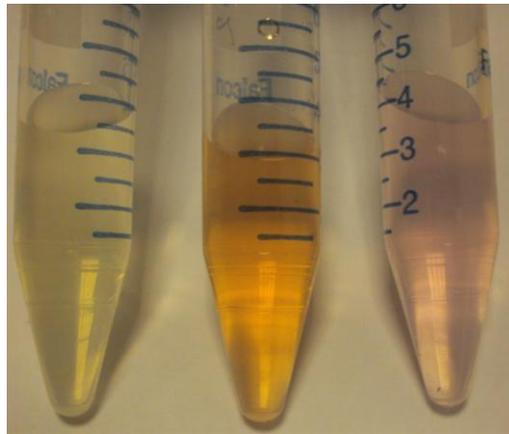


Fig 3-90 : Changement de couleur d'une solution contenant des particules d'or fonctionnalisées: à gauche, particules recouvertes de DTDTPA+ xylenol, au milieu particules/DTDTPA + xylenol + Gd^{3+} en faible quantité, à droite début du virage de couleur vers le rose après ajout d'une quantité plus importante de Gd^{3+} .

Le xylénol orange présente un pic d'absorbance aux alentours de 440 nm. Ce pic est de plus en plus intense lorsque l'on augmente la concentration de la solution. Lorsque des ions gadolinium sont chélatés, la première bande d'absorption se décale légèrement aux alentours de 480 nm, et une seconde bande apparaît vers 580 nm. Nous avons bien retrouvé ces particularités lorsque nous avons analysé nos solutions par UV-Visible (figure 3-91 et 3-92 ci-après).

Nos résultats sont conformes à ceux présentés par Alric et al.¹⁰² et Debouttiere et al.

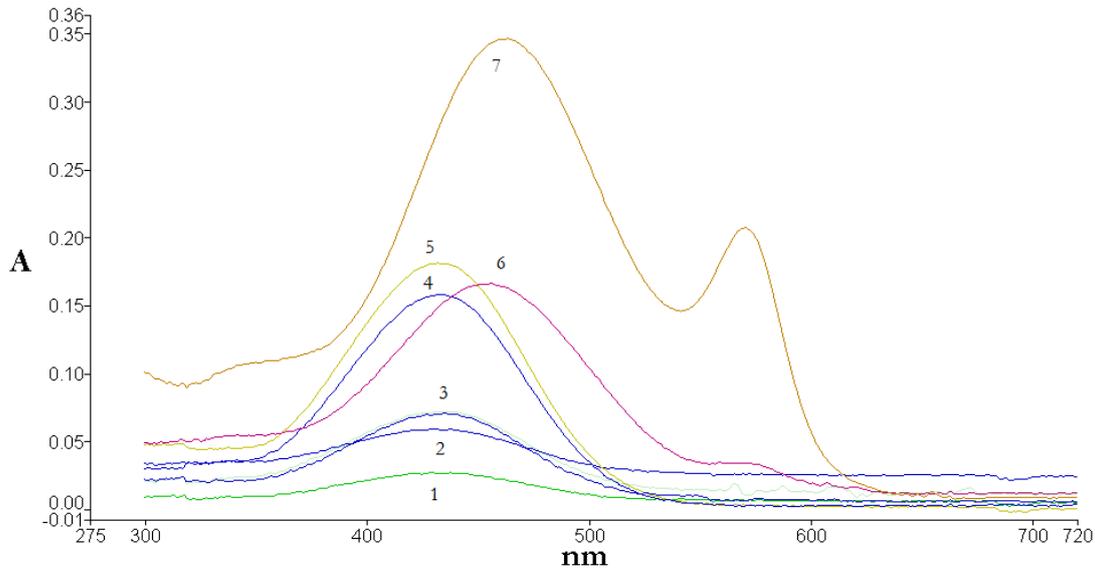


Fig 3-91 : Evolution du spectre d'absorbance du xylénol orange en fonction de la concentration de la solution (courbes 1 à 5), et évolution du spectre d'absorbance lors de la complexation des ions Gd^{3+} (courbes 5 à 7, apparition progressive du pic à 580 nm qui confirme la chélation).

De même, en présence de particules d'or recouvertes de DTDTPA, le spectre est modifié comme suit (figure 3-92). Le composé TDTPA est bien lié aux particules d'or car le spectre commence « haut » (cercle jaune sur la figure, informations complémentaires en annexe 14 page 256) :

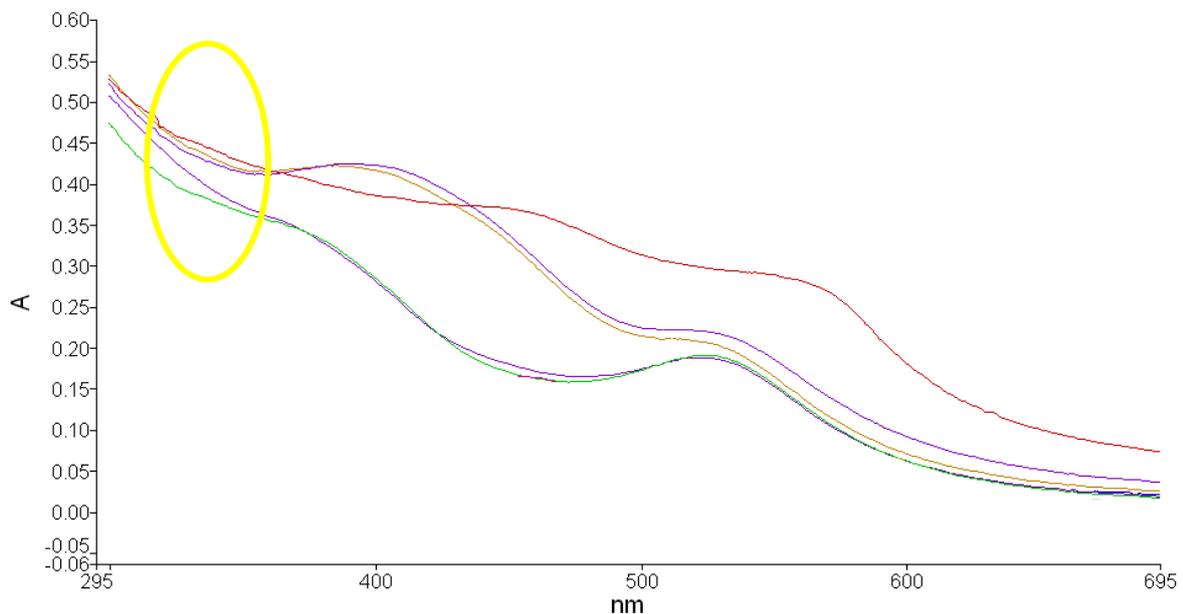


Fig 3-92 : Evolution du spectre des nanoparticules d'or recouvertes de DTDTPA en fonction de la quantité d'ions Gd^{3+} ajoutés (du haut vers le bas : la courbe rouge correspond à la situation sans gadolinium, les courbes violettes et oranges correspondent à l'ajout d'une petite quantité d'ions, les courbes verte et bleue correspondent à un large excès de gadolinium).

6) Résultats au μ CT/ μ PET-scanner Inveon Siemens

L'objectif de notre travail était de déterminer s'il existe une influence de la forme et de la taille des particules métalliques sur le contraste en imagerie scanner. Pour cela, nous avons synthétisé différents échantillons de particules (cf. paragraphes précédents), et nous les avons comparés à des composés iodés traditionnellement utilisés dans les protocoles cliniques classiques. Par ailleurs, nous avons vérifié l'influence d'une part, des paramètres clés de réglages de l'équipement scanner (à savoir la tension et le courant appliqués afin de produire les rayons X), et d'autre part, des paramètres physiques (densité des matériaux, valeur des sauts K-edge) inhérents à la théorie en imagerie médicale.

Notre protocole d'étude est résumé dans le graphique suivant (figure 3-93), où les paramètres les plus importants sont écrits en rouge. Les paramètres pour la réalisation d'un « échantillon blanc » sont donnés en Annexe 13 page 255.

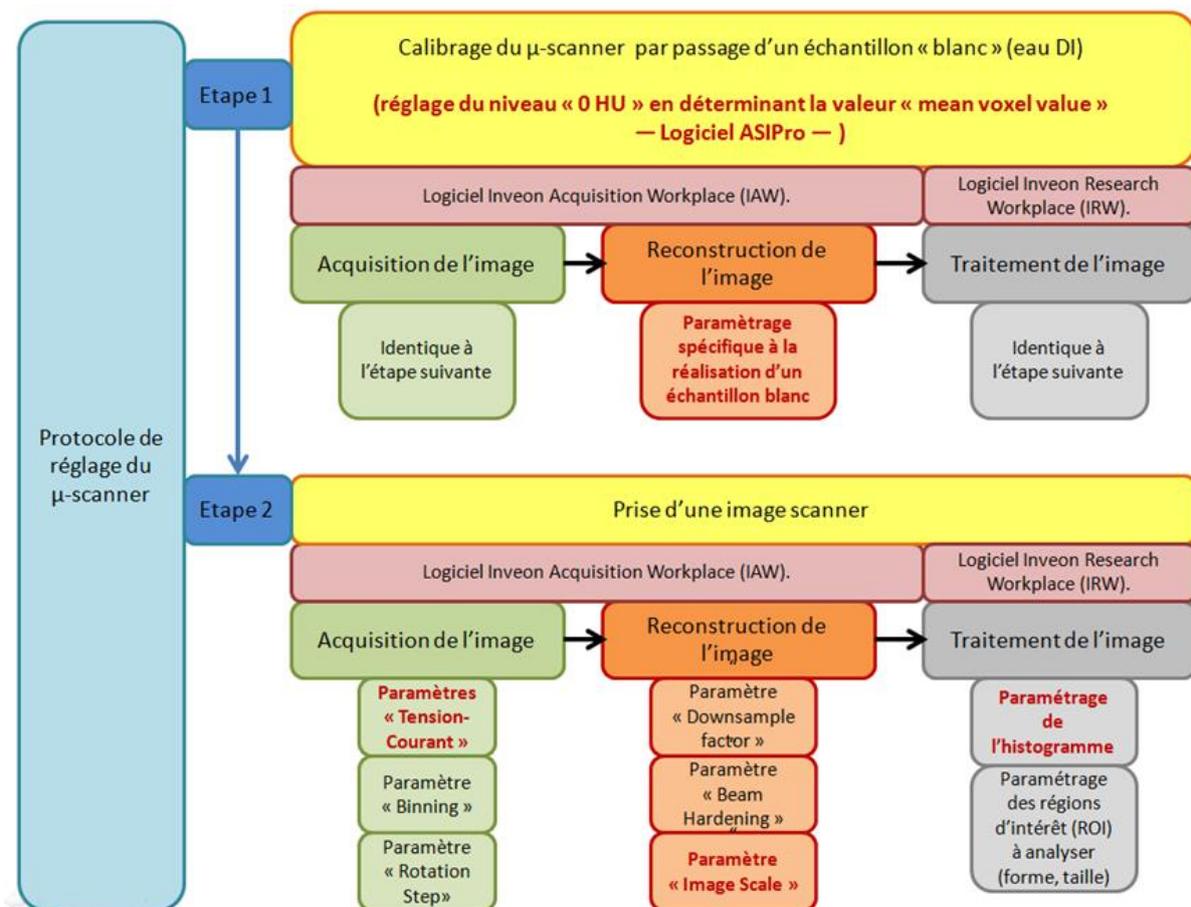


Fig 3-93 : protocole d'étude au μ -scanner du CHRU de Lille.

La linéarité d'atténuation en fonction de la concentration a tout d'abord été vérifiée pour le composé iodé utilisé à l'hôpital (Omnipaque), comme le montrent les figures 3-94 et 3-95 :

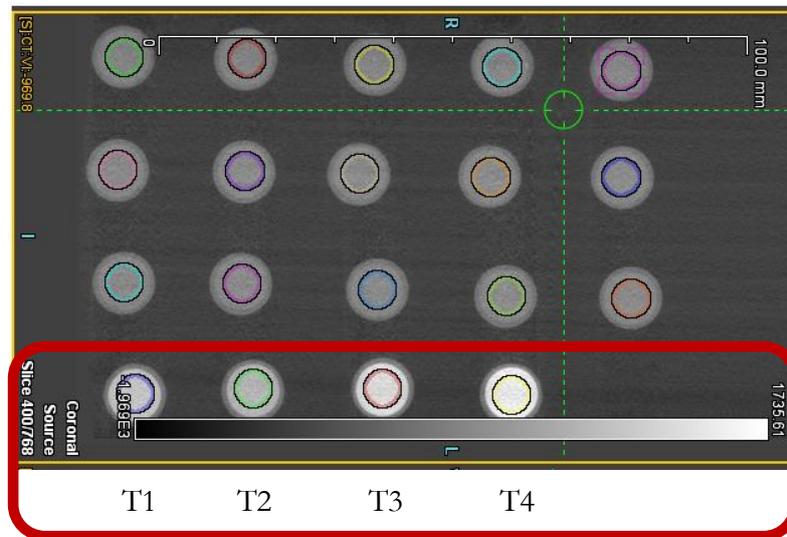


Fig 3-94 : Aperçu visuel de l'augmentation du contraste à l'image lorsque la concentration en iode augmente (de gauche à droite, tubes T1 à T4).

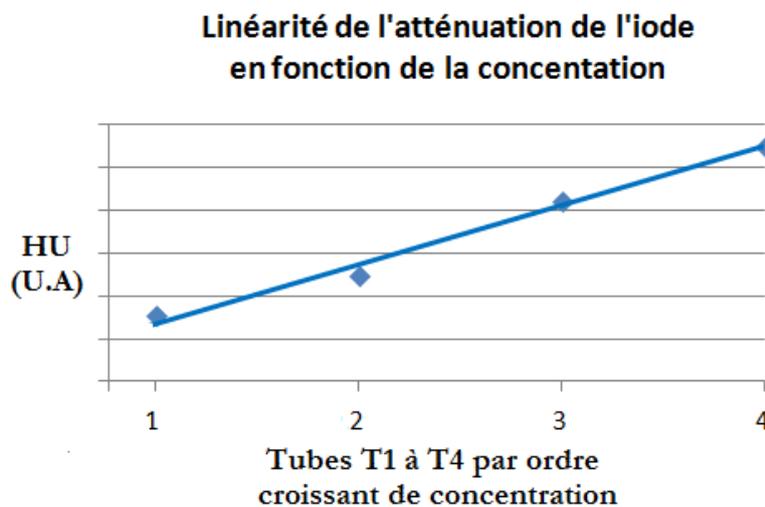


Fig 3-95 : Evolution de l'atténuation Hounsfield en fonction de la concentration en iode (Omnipaque). Le résultat est conforme à celui de Xu et al¹²⁴ présenté page 96 (la courbe précise est donnée en figure 3-66 page 189).

Enfin, il est important de garder à l'esprit que dans la plage d'action de ce μ -scanner spécifique (en dessous de 80 keV), l'iode possède naturellement l'avantage, puisque son coefficient massique d'atténuation des rayons X est supérieur à celui de l'or (cf. figure 2-13 page 80, et figure 3-96 ci après).

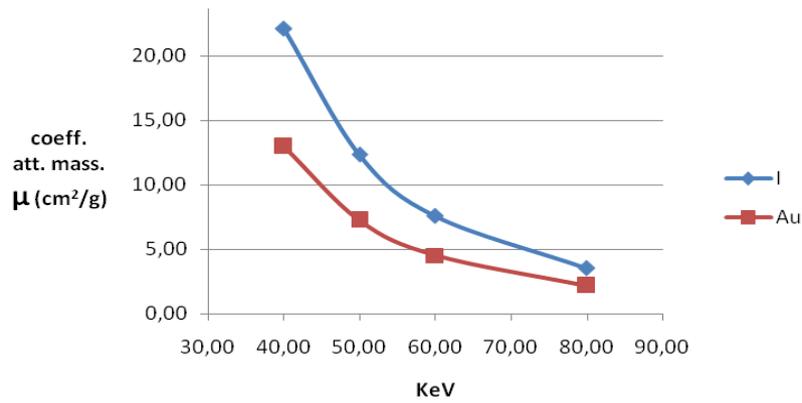


Fig 3-96 : Evolution des coefficients massiques d'atténuation en fonction du voltage appliqué. Ces courbes sont tracées à partir des données du National Institute of Standards and Technology.

Par ailleurs, les expériences ci-dessous (figures 3-97 et 3-98) que nous avons menées avec des solutions simples (particules d'or « brutes » non fonctionnalisées dans de l'eau DI, et solutions d'eau DI additionnée ou non de NaCl) illustrent l'importance de la pureté et de l'uniformité chimique des solutions à analyser par CT-scanner :

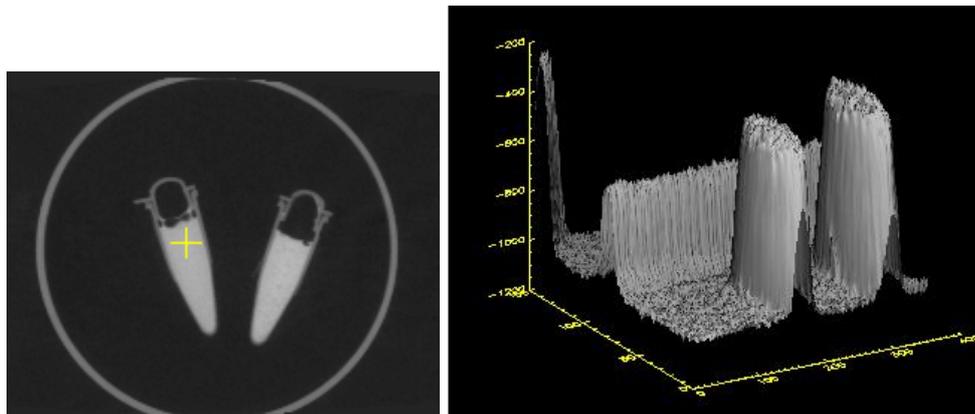


Fig 3-97 : A gauche, deux tubes contenant les particules d'or. A droite, expression en unités Hounsfield du contraste des tubes (Le tube de gauche a une concentration un peu plus faible que celui de droite).

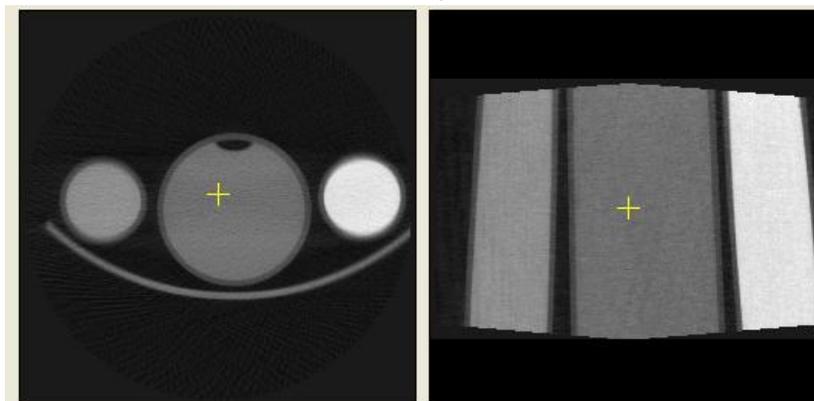


Fig 3-98 : Coupes transverse et coronale de trois tubes contenant respectivement à gauche de l'eau DI additionnée de 1g de NaCl; de l'eau DI seule au centre; à droite de l'eau DI additionnée de 3g de NaCl. Expérimentation menée à 80 keV.

La figure 3-98 ci-dessus montre bien que tout composé parasite, qui n'aurait pas été éliminé lors des étapes de purification, a une influence non négligeable sur les valeurs HU obtenues. Par ailleurs, on rappelle que selon la figure 2-9 page 76 que nous avons également obtenue sur le μ -scanner du CHRU de Lille, un voltage bas (<50 keV) aura tendance à dilater l'échelle Hounsfield, ce qui est en faveur de nos expérimentations (Les agents de contraste doivent en effet permettre une différenciation plus aisée des tissus, en accentuant leurs écarts en unités HU). Un voltage bas est également bénéfique médicalement (réduction de la dose appliquée au patient, et meilleur contraste à l'image). Malheureusement, sur l'équipement μ -scanner que nous avons utilisé, un voltage trop bas était également une source très importante de parasitage (bruit de fond), comme nous le présentons ci-après aux figures 3-99 et 3-100.

Nous avons donc choisi d'effectuer nos mesures à 60 keV, afin d'être à la fois dans une zone satisfaisante en terme de parasites et en fonction de notre utilisation de gadolinium dans certains de nos échantillons.

A ce stade, la conclusion suivante s'impose :

La caractérisation par ICP-AES (pour connaître les concentrations atomiques), et le soin apporté à la purification des solutions de particules d'or produites sont effectivement deux paramètres particulièrement importants pour pouvoir analyser finement les données récoltées lors du passage au CT-scanner. En effet, la différence de contraste entre les différents organes et le sang se fait à l'échelle de quelques dizaines d'unités HU tout au plus, comme nous l'avons vu. Si les échantillons ne sont pas suffisamment purifiés (présence de sels parasites, milieu trop hétérogène d'un échantillon à un autre), l'interprétation des résultats devient rapidement plus arbitraire.

La mise au point d'un protocole d'acquisition d'images au μ -scanner a également révélé les points essentiels suivants :

- Le μ -scanner peut fonctionner dans une plage de tension allant de 35keV à 80 keV. Cependant, pour des raisons tant pratiques (voir figure ci-dessous), que théoriques (sauts k-edge des éléments présentés dans le chapitre 2), les données ne se sont révélées correctes que pour des valeurs de tensions supérieures à 45 keV,
- Les différences obtenues en unités Hounsfield entre les données récoltées de 65 à 80keV sont assez faibles, comme on le constate à la figure 3-101 (elles sont parfois du même ordre que la marge d'erreur (une trentaine d'unités HU)!

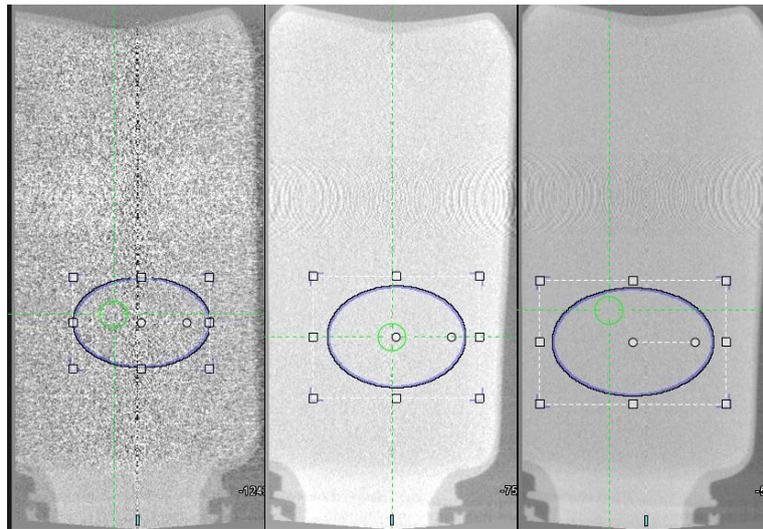


Fig 3-99 : De gauche à droite, image très dégradée à 35 keV, image de qualité moyenne à 55 keV, image de bonne qualité à 80keV. Le témoin est une simple bouteille d'eau.

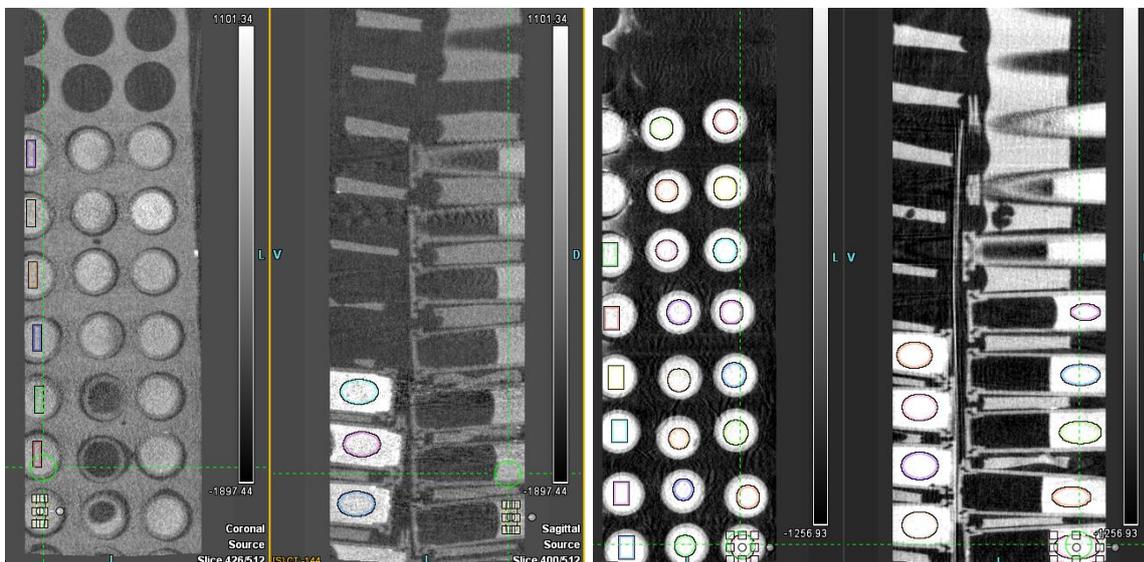


Fig 3-100 : A gauche : image dégradée à 35 keV, à droite : image de bonne qualité à 80keV. Les tubes contiennent nos solutions de particules d'or.

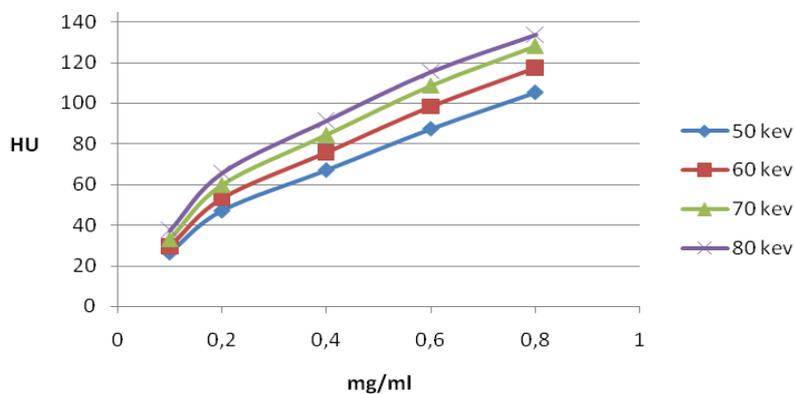


Fig 3-101 : Contraste obtenu en unités Hounsfield pour une gamme de concentration de particules sphériques commerciales BioRad® (800 nm) en fonction de la tension appliquée.

La figure 3-101 montre l'influence de la tension appliquée sur les mesures effectuées au μ -scanner. Ces courbes correspondent à notre toute première expérience sur cet équipement. Les quatre courbes ont été obtenues au cours de quatre acquisitions successives (les cinq tubes contenant les différentes concentrations de particules sont les mêmes tout au long de l'expérience). Les écarts en HU que l'on constate sont dus d'une part aux erreurs de pesée des particules (les particules BioRad® sont disponibles sous forme de poudre), et aux variations existantes entre deux sets de mesure sur le μ -scanner, qui sont de l'ordre de 50 HU.

Une telle étude comparative entre des particules d'or de formes et de tailles si variées constitue une nouveauté :

➤ Nomenclature des solutions de particules d'or analysées au μ -scanner et résultats :

Type de solution	Taille des particules	Label
Solution de nanofils longs	250 nm	RL
Solution de nanofils courts	20 nm	RC
Solution de nucléation (particules sphériques de 15 nm)	15 nm	SB
Solution de dendrites (synthèse en présence d'HEPES)	1 à 15 μm de côté	H
Solution de microsphères de taille moyenne (particules commerciales BioRad® 800 nm)	800 nm	MP
Solution de microparticules de grande taille (fabriquées sur wafer par lithographie)	2 μm de côté	GP
Solution de nanocapsules lipidiques contenant des nanofils recouverts de perfluorodécane-thiol	50 nm	P+RC
Solution de nanotriangles (synthèse en présence de BSA)	150 nm de côté (~15 nm épais.)	BSA
Solution de microparticules polygonales (synthèse en présence d'acide aspartique ou de citronnelle)	1 μm de côté et quelques nm d'épaisseur	C
Solution eau/Omnipaque	—	Omnipaque

Il est à noter que :

- Les différents types de particules sont analysés simultanément (~40 tubes peuvent être analysés à la fois, comme on peut le voir sur la figure 3-64).
- Afin de confirmer nos résultats, l'expérience a été réalisée trois fois, avec des particules fraîchement préparées à chaque fois. Chaque courbe linéaire est issue de la moyenne de ces trois sets d'expérimentation.

- Les données sont obtenues dans la gamme de tension allant de 30 à 80 keV (complétant de fait les données de la littérature qui sont presque exclusivement obtenues au-delà de 80 keV).
- Etude de formes nouvelles de particules (dendrites, polygones épais et fins).
- Une comparaison est effectuée avec des particules encapsulées.

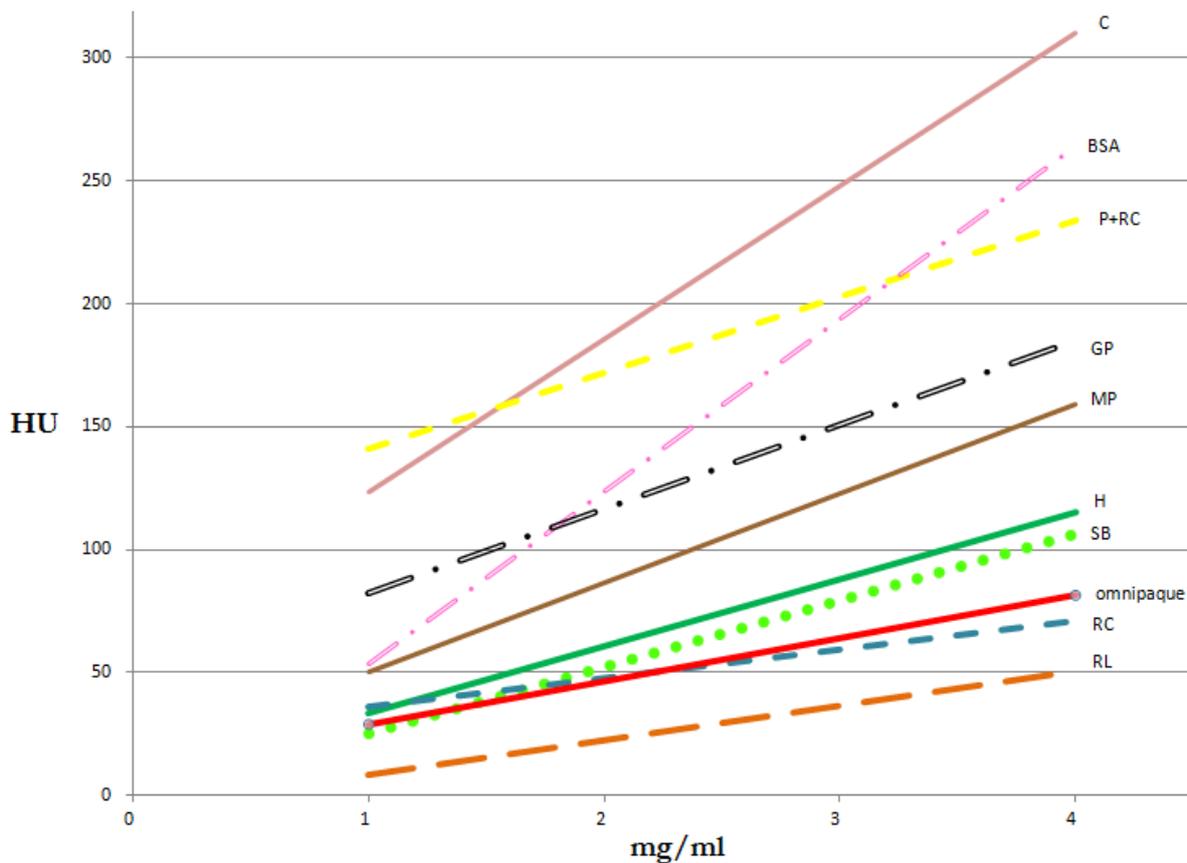


Fig 3-102: Contraste obtenu (plage 55 à 60keV, 500mA) en unités Hounsfield pour les diverses solutions de particules en fonction de la concentration en or ou en iode en mg/ml. Chaque courbe linéaire est issue de la moyenne de trois sets d'expérimentation (4 mg/ml correspond à 2×10^{-2} mol/L).

Ce graphique (figure 3-66) permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

- ✓ Les courbes que nous obtenons pour nos particules sphériques de 15 nm (label SB) et pour l'Omnipaque, ainsi que le niveau relatif entre les deux, sont conformes à la littérature (figures 3-3 à 3-6 pages 96 à 98), et nous permettent de valider nos expérimentations.

- ✓ Nous observons que ce sont les particules de plus grande taille qui ont apporté un contraste plus important à l'image. Ce résultat est opposé à celui obtenu par Xu et al. (dont l'étude exclusivement menée sur des particules d'or sphériques, de taille comprise entre 4 et 60 nm, voir figure 3-4 pages 97-130). Néanmoins, il est important de noter que pour l'ensemble des études auxquelles nous nous sommes référées (pages 96 à 98), les barres d'erreur obtenues sont importantes.
- ✓ Par ailleurs, on observe que, dans notre cas, ce sont les particules plates de forme triangulaire, issues soit de la synthèse en présence d'extrait de citronnelle, soit de la synthèse en présence de BSA, qui sont les plus performantes. On peut potentiellement relier cette constatation au phénomène physique de l'effet photo électrique, qui se propagerait et serait renforcé grâce à ces particules. Suivant cette logique, on constate que plus la surface d'une particule est plane, plus l'alignement des atomes est favorable, et permet d'obtenir un bon contraste. De plus, on constate qu'une surface complexe (particules synthétisées en présence d'HEPES) composée de plusieurs plans (dont les orientations sont variables) est moins favorable qu'une surface plane unique. Ceci expliquerait pourquoi les particules triangulaires issues de la synthèse en présence de BSA présentent un meilleur contraste comparativement aux microdendrites.
- ✓ Les particules sphériques, quant à elles, présentent un intérêt lorsque leur rayon de courbure (et donc leur surface totale) est important (particules de 800 nm).
- ✓ La discrimination des formes par imagerie scanner semble donc effective, pour la gamme de tension et pour les concentrations utilisées, même si l'ensemble des données coexiste sur une faible plage d'unités Hounsfield (100 à 350 HU), et que les différentes courbes sont parfois très proches (microdendrites H et nanosphères SB), surtout lorsque l'on considère la marge d'erreur du μ -scanner (50 HU).
- ✓ Enfin comparé à l'Omnipaque (composé iodé), l'utilisation de particules d'or apporte un bénéfice net et ceci d'autant plus que les particules sont de grandes tailles et de grandes surfaces, puisque ce sont elles qui procurent le meilleur contraste.
- ✓ Nos résultats étayent et complètent ceux de Jackson et al.¹²⁹. Ces derniers avaient seulement comparé des nanosphères (3.8 nm, 5.8 nm, 25 nm) et des nanofils de taille avoisinant 30 nm, sans trouver de différences significatives de contraste entre ces deux formes.

Ci-dessous sont présentés des graphiques plus détaillés, incluant les barres d'erreurs correspondant à l'écart type sur notre meilleure série de trois expérimentations (Cf Annexe 15). On rappelle que la déviation machine au μ -scanner est de l'ordre de 50 HU. Une barre d'erreur de cette amplitude est donc acceptable.

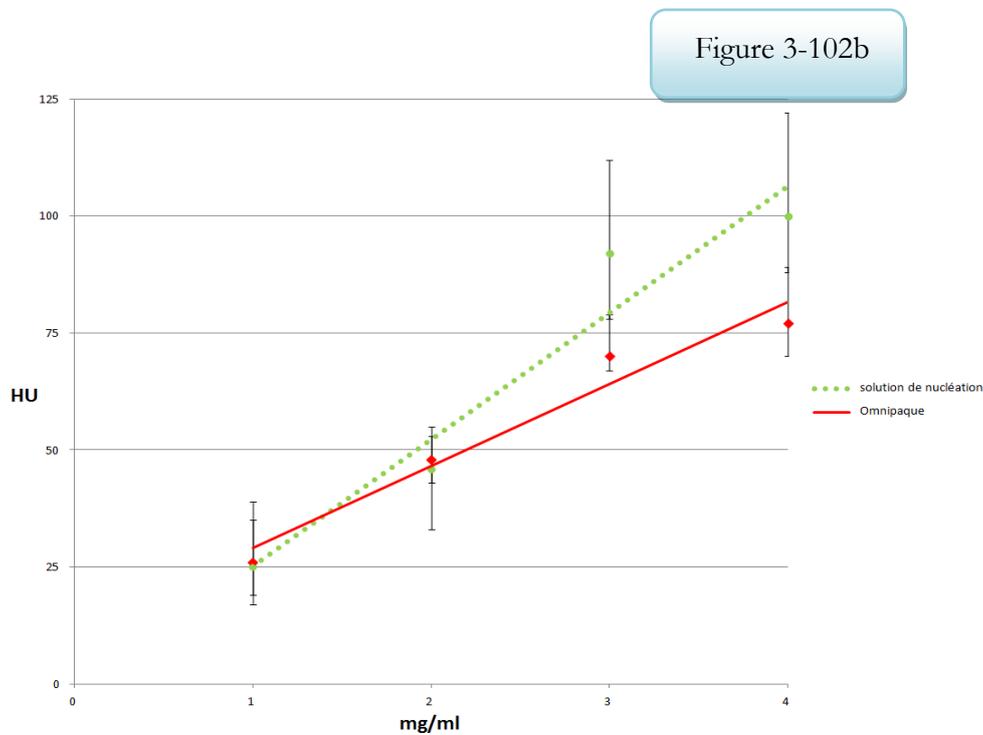
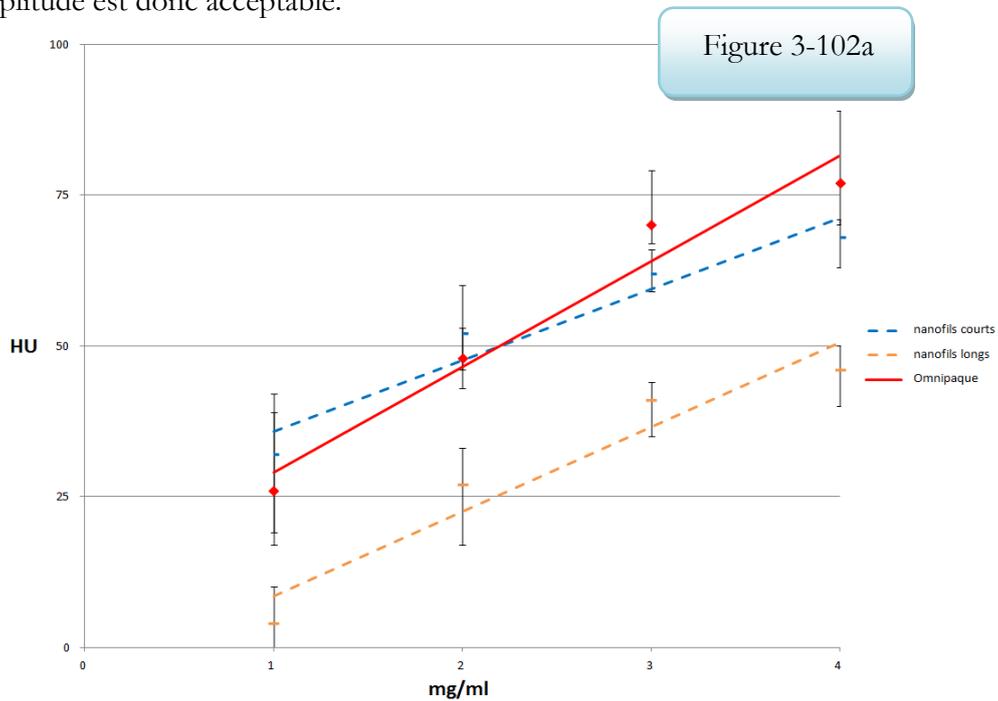


Fig 3-102a et 3-102b: Détails des courbes correspondant aux nanofils courts, nanofils longs et à la solution de nucléation, comparativement à l'Omnipaque.

Figure 3-102c

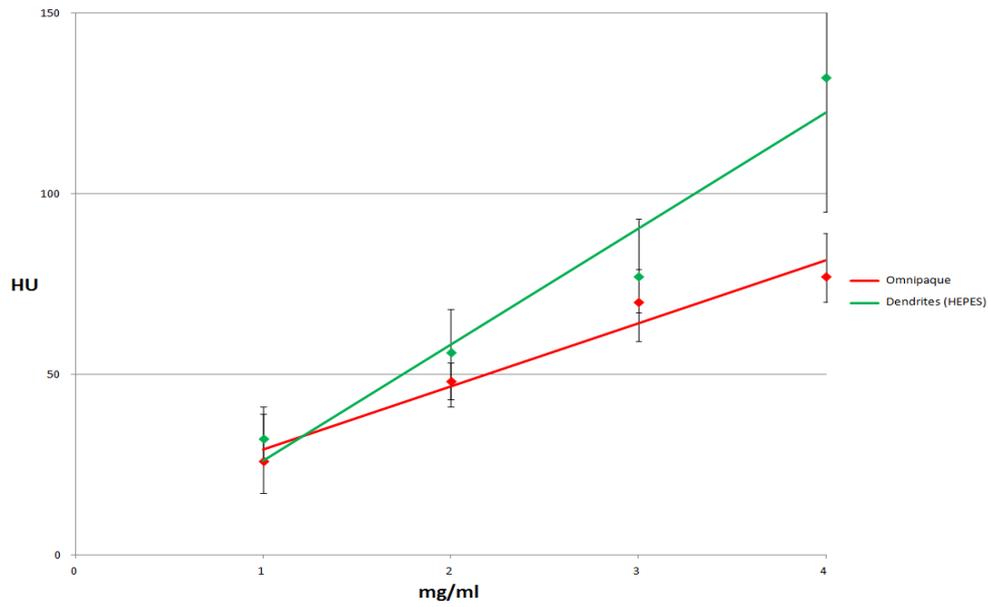


Figure 3-102d

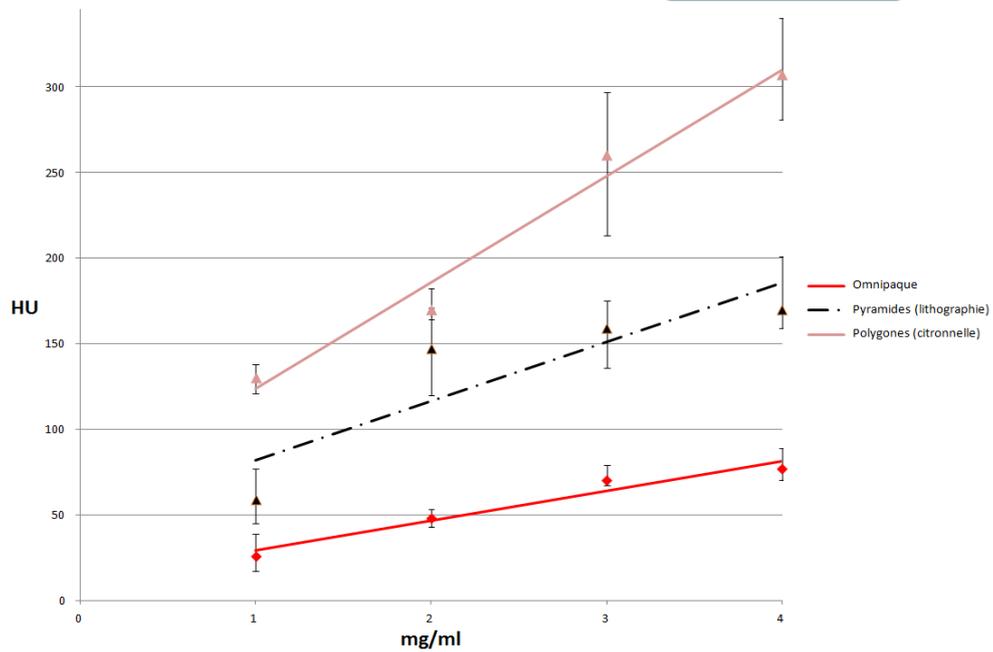


Fig 3-102c et 3-102d: Détails des courbes correspondant aux dendrites, aux pyramides réalisées par lithographie/gravure et aux polygones obtenus en présence de citronnelle, comparativement à l'Omnipaque.

Figure 3-102e

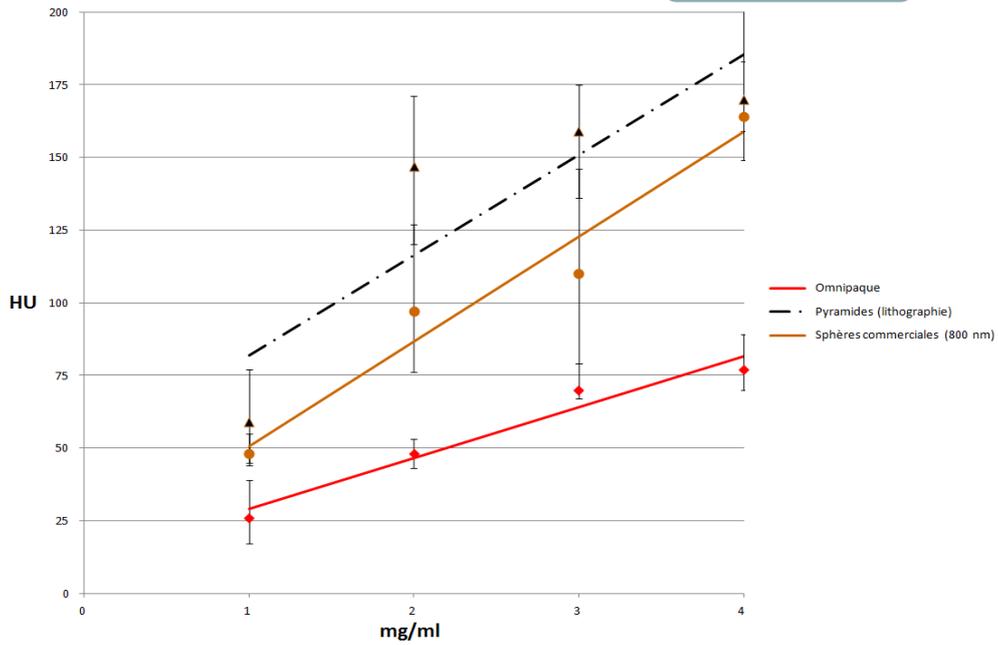


Figure 3-102f

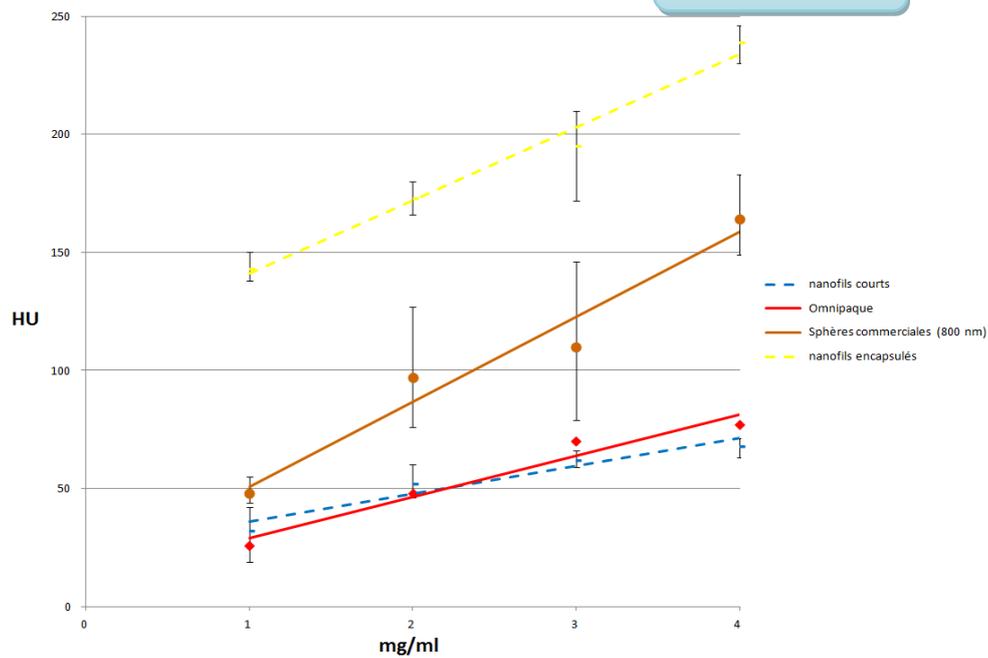


Fig 3-102e et 3-102f: Détails des courbes correspondant aux sphères commerciales (800 nm) et aux nanofils encapsulés, comparativement à l'Omnipaque.

A notre connaissance, par notre travail, il s'agit de la première fois qu'une comparaison est effectuée avec des particules non sphériques et sur une gamme de dimension importante, montrant potentiellement une discrimination de forme par imagerie scanner et un meilleur contraste par rapport aux composés iodés.

Chapitre 4 : Synthèse de capsules lipidiques pour
l'imagerie par rayons X

Introduction

Nous présentons dans ce court chapitre nos synthèses de nanoparticules lipidiques. Ces nanocapsules contiendront au choix un composé iodé hydrophobe (triiodobenzène) ou des nanoparticules d'or recouvertes de perfluorodécane-thiol. L'état de l'art est tout d'abord présenté dans la partie I ci-dessous, tandis que les synthèses, la caractérisation des solutions et les résultats obtenus au μ -scanner du CHU de Lille sont présentés dans la partie II de ce quatrième chapitre.

I) Etat de l'art

Une stratégie peut être mise en place quand il est nécessaire de réduire les coûts et la toxicité des traitements médicamenteux : la vectorisation ciblée de molécules thérapeutiques. Cette vectorisation peut être réalisée par différents moyens : le couplage molécule-nanoparticule, ou encore, l'imitation des composants biologiques de base par la fabrication de capsules possédant une bicouche lipidique à forte ressemblance avec les membranes cellulaires. Des études ont ainsi utilisé la stratégie d'encapsulation de rhénium²⁰², d'iode^{203,204,205}, ou de gadolinium²⁰⁶ dans des liposomes.

Les capsules lipidiques sont donc une voie de vectorisation intéressante, à la fois pour l'imagerie médicale, mais aussi pour le traitement direct des pathologies²⁰⁷. Elles sont constituées d'un cœur huileux et d'une enveloppe de polyéthylène glycol/phospholipides.

Il est possible d'inclure de nombreuses molécules hydrophobes curatives à l'intérieur de ces capsules ou dans leur enveloppe externe. L'expérience peut aussi être tentée avec de l'iode, des nanoparticules d'or²⁰⁸ ou du gadolinium²⁰⁹.

1) Particules lipidiques iodées

L'idée des huiles iodées²¹⁰ est relativement « simple », et a été mise en œuvre dès 1901. Marcel Guerbet invente alors le Lipiodol, dont il ne découvrira les propriétés radio-opaque qu'en 1918. Le produit ne sera donc autorisé en tant qu'agent de contraste qu'en 1926. Il est toujours exploité aujourd'hui (avec quelques modifications) par la société Guerbet (figure 4-1). D'autres concurrents ont créé des composés assez similaires²¹¹.

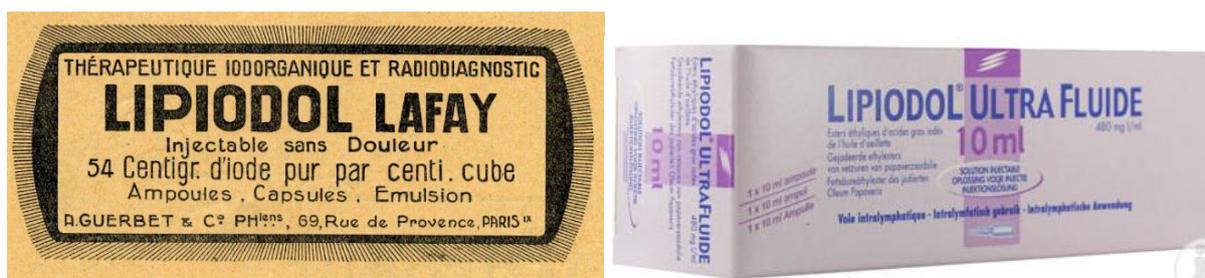


Fig 4-1 : Publicité pour le Lipiodol (à gauche, datant de 1930, à droite, années 2000).

Sachant que les agents de contraste actuellement utilisés lors des examens par imagerie à rayons X, sont des solutions aqueuses iodées, il peut être intéressant de proposer une alternative à ces formulations. En effet, l'emploi de ces composés peut parfois devenir gênant (allergies^{212,213}, sensations désagréables pour le patient, telles que bouffées de chaleur, douleur veineuse, nausées²¹⁴...). Par ailleurs, il est nécessaire d'injecter une dose d'iode très élevée afin d'obtenir un bon contraste à l'image.

Ainsi, en reprenant l'idée de base des huiles iodées décrites ci-dessus, il est théoriquement possible d'obtenir deux types de particules lipidiques iodées, telles que présentées dans les schémas de la figure 4-2 ci-dessous, où l'iode est présent soit à l'intérieur de la capsule (image A), soit dans son enveloppe externe (image B) :

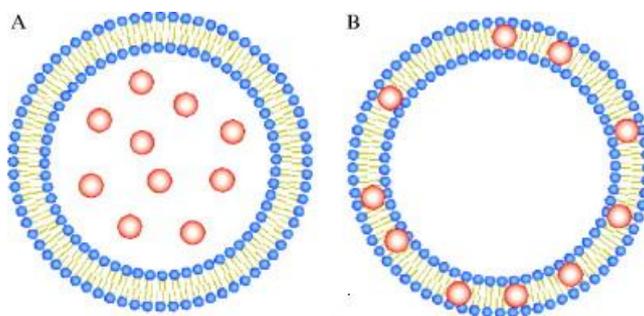


Fig 4-2 : Schéma représentant des capsules iodées.

En proposant une formulation qui encapsule un composé iodé hydrophobe dans des capsules lipidiques, il nous a été possible de les comparer aux solutions aqueuses d'iode traditionnellement utilisées lors des examens à l'hôpital (par exemple le Iohexol commercial : Omnipaque 350 (figure 4-3), qui a une masse molaire de 821,14g/mol et un LogP négatif : (-2,71)).

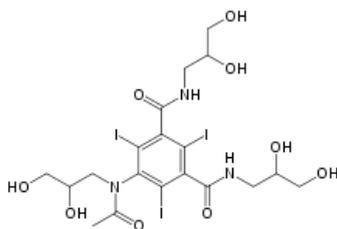


Fig 4-3 : Molécule d'Omnipaque.

2) Particules lipidiques contenant des particules d'or

Comme nous l'avons mentionné précédemment (chapitre 2, parties VI et VII), les particules d'or peuvent être rendues hydrophobes (et même lipophiles) par un procédé simple de fonctionnalisation, en les recouvrant d'une couche de perfluorodécane-thiol.

En appliquant ce procédé à des nanoparticules d'or de très petite taille (20 nm au plus), il est possible de les inclure dans des capsules lipidiques, dont la taille peut aller jusqu'à 150 nm de diamètre (figure 2-48).

Quelques études utilisent ces principes^{215,216}. Ces émulsions ont par ailleurs de bonnes propriétés en termes de biocompatibilité, distribution sanguine homogène....

Les capsules lipidiques que nous avons fabriquées sont constituées d'un cœur huileux et d'une bicouche lipidique, le tout en milieu aqueux. Leur procédé de fabrication reprend la méthode développée par Heurtault *et al.*²¹⁷

Les capsules fabriquées sont donc constituées d'une phase huileuse comprenant de la perfluorodécane et des triglycérides (Labrafac). Les capsules sont formées à l'aide d'un composé mixte, la phosphatidylcholine (phospholipide à tête polaire hydrophile et queues aliphatiques hydrophobes), ou la lécithine.

La perfluorodécane, quant à elle, est un composé fluoré biocompatible, utilisé dans les formulations de sang artificiel. Sa masse molaire est de 462 g/mol, et son LogP est de 8,33.

Elle peut aussi être employée pour les lavages pulmonaires²¹⁸, ainsi que pour l'oxygénation de tout autre tissu biologique²¹⁹ (notamment pour la conservation d'organes lors des transports pour greffe), et cela grâce à son exceptionnelle capacité à contenir de l'oxygène dissout²²⁰. Enfin, il s'agit aussi d'un composant utilisable en imagerie à ultrasons.

Ainsi, il est possible d'obtenir deux types de nanocapsules contenant des nanoparticules d'or, comme le montre la figure 4-4 ci-dessous :

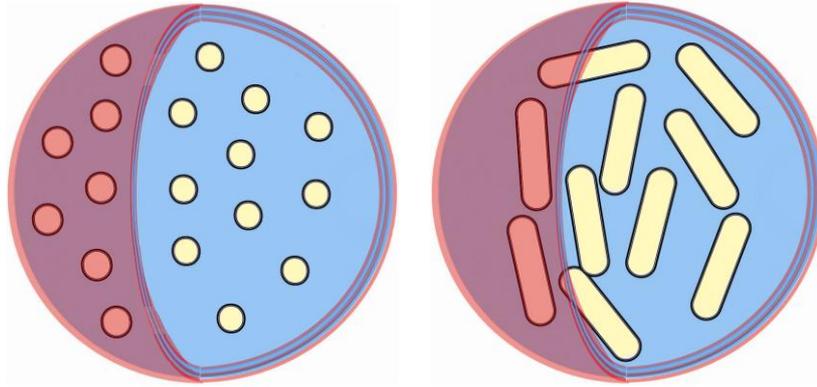


Fig 4-4 : Schéma d'insertion de nanosphères d'or à gauche, et de nanofils d'or à droite dans des nanocapsules.

À notre connaissance, la comparaison de tels composés avec des particules d'or qui seraient elles mêmes encapsulées ou non, n'a jamais été tentée. Cela a motivé notre étude, afin d'apporter des résultats nouveaux, notamment dans la gamme de tension d'un microscanner.

Dans le cas particulier de l'imagerie médicale, les finalités visées sont les suivantes : une innocuité satisfaisante, l'obtention d'un temps suffisant de circulation dans l'organisme, ainsi qu'une excrétion quasi-totale après une durée de 72h.

II) Synthèses de capsules lipidiques pour l'imagerie médicale - Résultats

1) Capsules iodées

a) Capsules avec iode inclus dans la bicouche lipidique

La fabrication de ces capsules passe par deux étapes : tout d'abord il faut réaliser une iodation de lipides, puis une émulsification par bain à ultrasons permet la formation des particules. Actuellement, les huiles iodées commerciales que nous avons mentionnées précédemment (Lipiodol, figure 4-1 page 177) sont moins proposées aux patients en France car elles ne doivent pas être injectées par voie intraveineuse et présentent un temps de rétention dans l'organisme très long (jusqu'à deux ans !).

De plus, elles sont réservées à des usages très spécifiques (lymphographie et diagnostic des lésions hépatiques notamment). La réalisation de capsules lipidiques à partir de ces composés est cependant intéressante, et la réalisation de ce type d'émulsion est facile :

Etape 1 : Iodation des lipides	Par action du réactif de Wijs (monochlorure d'iode, en excès) sur un acide gras insaturé (acide α -linoléinique)
Etape 2 : Réalisation de l'émulsion	Mélange (eau déionisée : huile) = (1:2), au bain à ultrason pendant 2h.

b) Fabrication de capsules avec composé encapsulé par émulsification par cycles en température

Les capsules lipidiques sont réalisées selon le protocole suivant :

	Solution 1	Solution 2
Etape 1 :	Solutol 240 mg NaCl 22 mg Eau 540 μ l	Labrafac 420 mg Lecithine 37,5 mg Composé à encapsuler (pas plus de 5% en masse)
	porter les deux solutions à 85 °C séparément	
Etape 2 :	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanger les solutions 1 et 2, • Effectuer une succession de 4 cycles d'alternance en température (85 \leftrightarrow 60 °C) tels que décrits sur le graphique (figure 4-5) ci-dessous. • On stoppe le processus au cours du 4^{ème} cycle en température en réalisant une trempe par ajout d'un volume de 3,3 ml d'eau glacée, • On ajuste ensuite le volume final à 4,6 ml 	
Etape 3 :	Purification des capsules par gel-filtration (colonnes polymères dextran)	

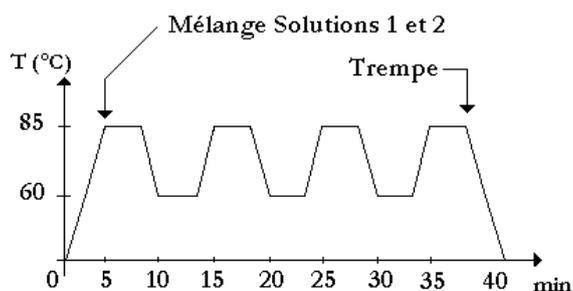


Fig 4-5 : Cycles en température et arrêt par trempe.

Les capsules sont ensuite caractérisées en taille par DLS (figure 4-6):

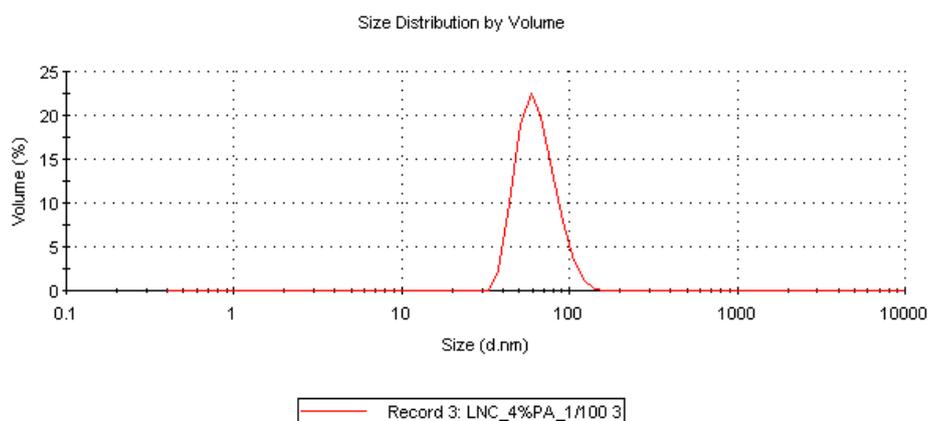


Fig 4-6 : Les nanocapsules lipidiques ont une taille de 50 nm environ. Cette taille est spécifique aux paramètres de synthèse mentionnés précédemment.

Les capsules iodées fabriquées renferment du triiodobenzène (dont la formule est donnée en figure 4-7). Ce composé a une masse molaire $M = 455,79$ g/mol et son Log P vaut 5,59 :

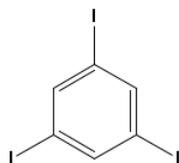


Fig 4-7 : Molécule de triiodobenzène.

Ce type de formulation est stable pendant plusieurs mois.

L'encapsulation est vérifiée (figures 4-8 et 4-9) par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Le solvant utilisé est le DMSO :

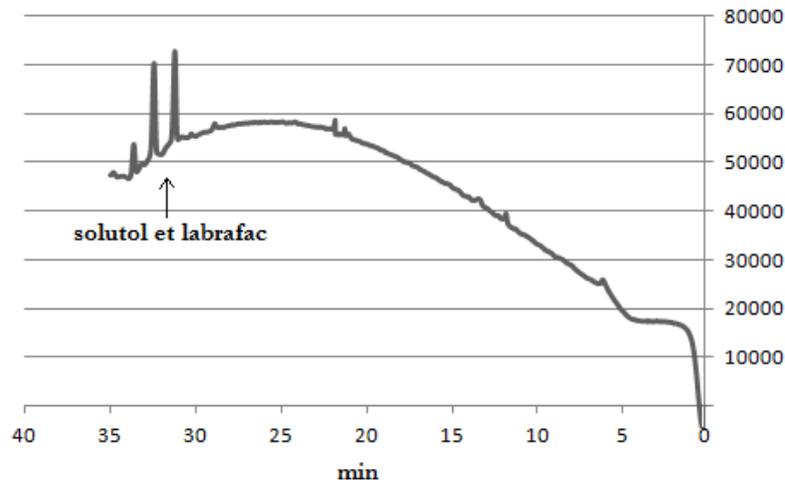


Fig 4-8 : Spectre obtenu par HPLC pour les nanocapsules lipidiques vides.

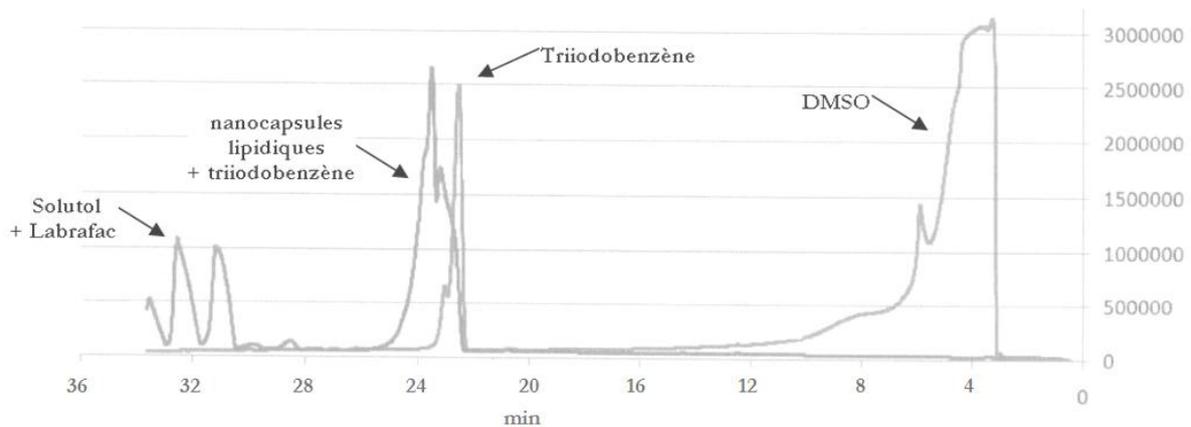


Fig 4-9 : Spectre obtenu par HPLC pour la molécule de triiodobenzène seule et encapsulée.

2) Capsules fluorées contenant des particules d'or

Tout d'abord, la fonctionnalisation par les thiols est réalisée par la méthode suivante :

On mélange du perfluorodécane-thiol (figure 4-10, à gauche) dans de la perfluorodécane (figure 4-10, au centre). On détermine le ratio optimal volumique à 1:5. On ajoute ensuite un maximum de 12 volumes de nanosphères ou de nanofils d'or de 20 nm (purifiées au préalable par usage de la phosphatidylcholine ou par centrifugation). On mélange au vortex la solution (20 min minimum, en alternance avec des périodes de repos).

Après avoir répété cette étape 3 fois on obtient un déphasage bien visible (figure 4-10, à droite), avec les particules d'or qui se regroupent à l'interface entre la perfluorodécane en bas (densité 1,908), les particules d'or recouvertes de perfluorodécane (densité 1,678) au milieu, et l'eau au dessus :

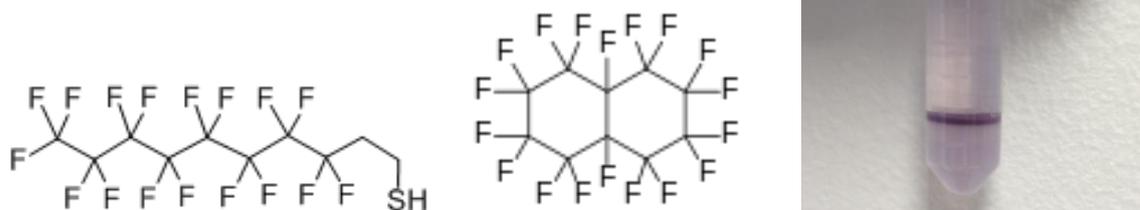


Fig 4-10 : De gauche à droite : perfluorodécane (PFDT), perfluorodécane (PFD), séparation de phase.

La phase contenant les particules d'or est récupérée, et les émulsions sont ensuite réalisées selon l'un ou l'autre des protocoles suivants :

a) Emulsification par bain à ultrasons :

Au préalable, il faut préparer une solution de phosphate de calcium par précipitation de calcium (provenant d'une solution de CaCl_2) dans une solution de PBS (phosphate buffer salin). Le précipité récupéré est re-dissout dans une quantité d'eau déionisée appropriée.

Les particules d'or recouvertes de perfluorodécane sont ensuite légèrement diluées dans une nouvelle quantité de perfluorodécane, en association avec du Labrafac, tandis que de la phosphatidylcholine est diluée dans de l'eau déionisée. Les deux solutions sont ensuite mélangées en utilisant un barreau magnétique, puis un bain à ultrasons (Branson 2510).

Par suite, on ajoute en plusieurs fois de petites quantités concentrées de phosphate de calcium à l'émulsion, en laissant un temps de repos de 30 min entre chaque ajout. En effet, le fluor existant à la surface de la perfluorodécane peut interagir avec ce composé et renforcer sa cohésion, créant une coquille autour de la capsule. Cette coquille est encore renforcée à la fin du processus par l'ajout final d'acide diéthylènetriaminepentacétique (DTPA) à la solution. Ce dernier vient complexer les ions autour des capsules et contribue également à la stabilité de l'émulsion.

b) Emulsification par cycles en température :

Le protocole est le même que celui décrit pour les particules iodées, sachant que le cœur huileux des capsules est dans ce cas précis enrichi par la perfluorodécane et les particules d'or recouvertes de perfluorodécane-thiol.

Toutes les particules synthétisées selon les protocoles proposés auparavant peuvent ensuite être analysées au μ -scanner Inveon Siemens disponible au CHRU de Lille.

III) Résultats au μ CT/ μ PET-scanner Inveon Siemens

- Nomenclature des solutions de particules encapsulées analysées au μ -scanner
 - Les différents types de particules sont analysés simultanément (~40 tubes peuvent être analysés à la fois, comme on peut le voir sur la figure 3-64).
 - La comparaison de particules lipidiques ou bimodales avec les particules d'or traditionnelles (sphères et nanofils) est une expérimentation nouvelle, et complète donc les résultats existants dans la littérature.
 - Afin de confirmer nos résultats, l'expérience a été réalisée trois fois, avec des particules fraîchement préparées à chaque fois. Chaque courbe linéaire est issue de la moyenne de ces trois sets d'expérimentation.

Type de solution	Label
Solution d'Omnipaque	omnipaque
Solution de Iodobenzène	triiodobenzene
Solution de particules d'or (15 nm) fonctionnalisées avec du DTDTPA et du gadolinium (taille finale max. 30 nm)	Gd+DTDTPA+Au (particules bimodales) 
Solution de gadolinium chélaté par du DTDTPA	Gd+DTDTPA
Solution de GdCl ₃	GdCl ₃
Solution de GdCl ₃ et Omnipaque	Gd+omnipaque
Solution de GdCl ₃ et Iodobenzène	Gd+triiodobenzène
Solution de nanocapsules lipidiques et Omnipaque	Capsules+omnipaque
Solution de nanocapsules lipidiques et Triiodobenzène	Capsules+triiodobenzene
Solution de nanocapsules vides	Capsules vides
Solution de nanocapsules lipidiques contenant des nanofils recouverts de perfluorodécane-thiol	P+RC

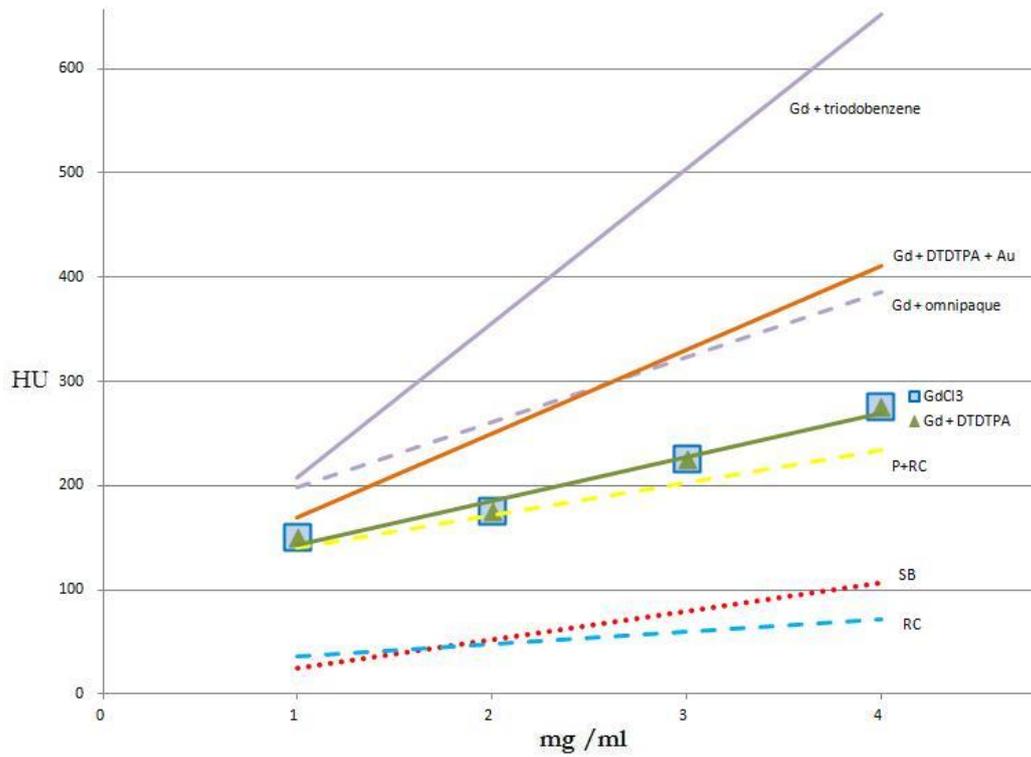


Fig 4-11 : Contraste obtenu (plage 55 à 60keV, 500mA) en unités Hounsfield pour diverses solutions de particules en fonction de la concentration en or ou en iode en mg/ml.

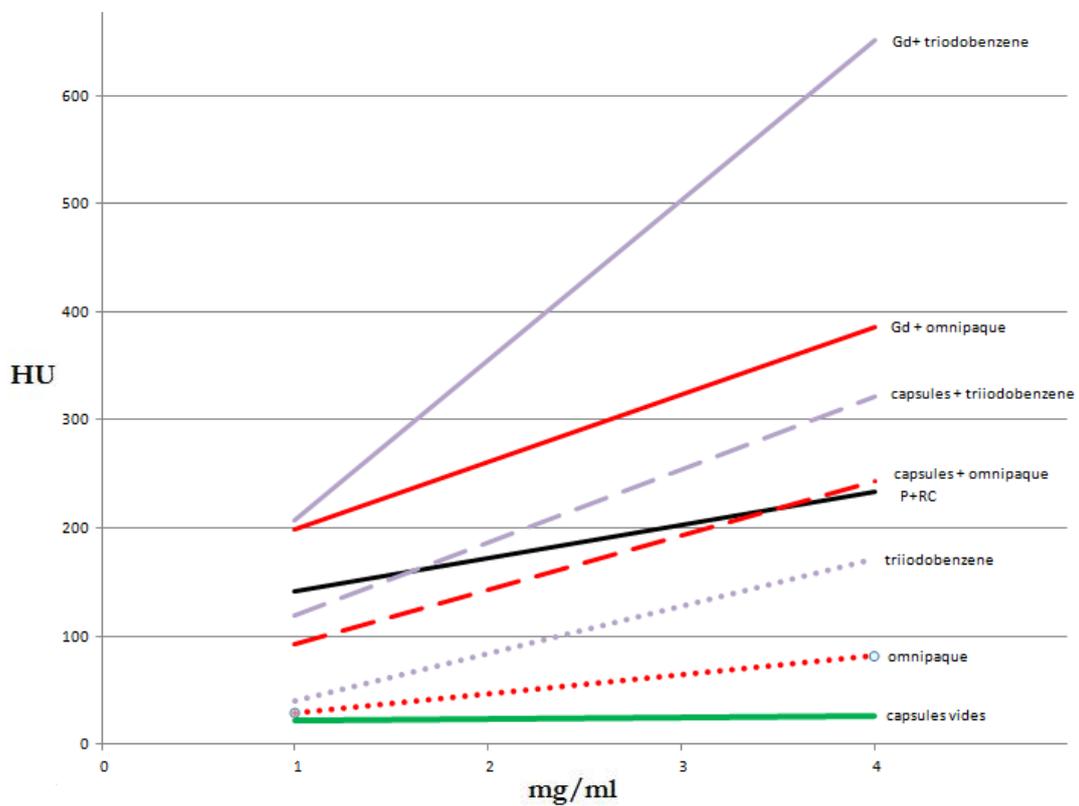


Fig 4-11b : Contraste obtenu (plage 55 à 60keV, 500mA) en unités Hounsfield pour diverses solutions de particules en fonction de la concentration en or ou en iode en mg/ml.

Les deux graphiques (figures 4-11 et 4-11b) précédents permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

- ✓ On remarque que les nanoparticules d'or encapsulées (P+RC) présentent un meilleur contraste que les particules libres (SB, RC). Une explication potentielle est la suivante : l'encapsulation permet de concentrer les particules dans un petit volume, ce qui peut « mimer » l'effet des particules plus volumineuses. Cette explication s'applique également à la figure 3-102 précédente (page 189).
- ✓ De même l'encapsulation de composés iodés (Triiodobenzène et Omnipaque) permet d'obtenir un meilleur contraste qu'avec les composés libres. L'encapsulation semble donc être une piste intéressante. De plus le Triiodobenzène est un composé hydrophobe, qui ne peut pas être directement utilisé chez les patients, son encapsulation permet de le rendre « biocompatible », ce qui est également très intéressant puisque le contraste obtenu avec ce composé est supérieur à celui de l'Omnipaque utilisé généralement.
- ✓ On constate que l'association de plusieurs agents de contraste est cumulative. Les particules d'or associées au gadolinium (particules multimodales) présentent un meilleur contraste que le gadolinium seul ou que les particules d'or seules. Cela est également dû à l'équipement scanner qui favorise le gadolinium dans la plage de tension utilisable (30 à 80 keV, cf. figure 2-27 page 91). De ce fait, l'association « gadolinium/composé iodé » possède un meilleur contraste comparativement au composé iodé seul.
- ✓ Il est intéressant de constater que les courbes correspondant aux particules bimodales (Gd+DTDTPA+Au) et à l'association (Gd+omnipaque) sont très proches (figure 4-11). On constate que dans nos conditions expérimentales, il est possible de remplacer l'iode, potentiellement allergisant par l'or.

Ci-dessous sont présentés des graphiques plus détaillés, incluant les barres d'erreurs correspondant à l'écart type sur notre meilleure série de trois expérimentations (Cf Annexe 15). On rappelle que la déviation machine au μ -scanner est de l'ordre de 50 HU. Une barre d'erreur de cette amplitude est donc acceptable.

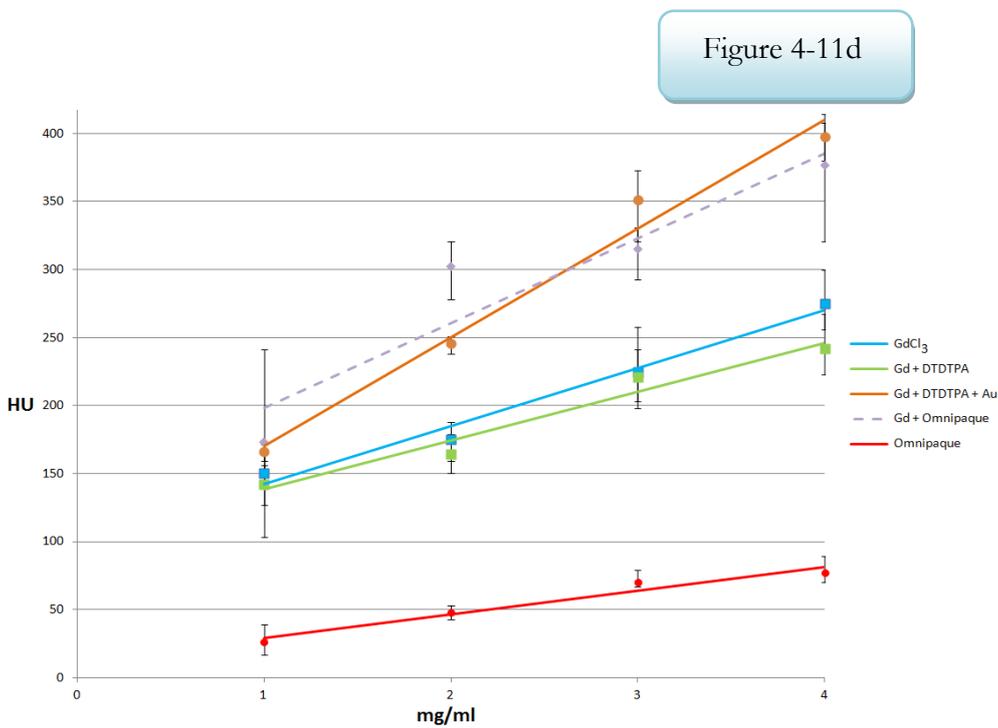
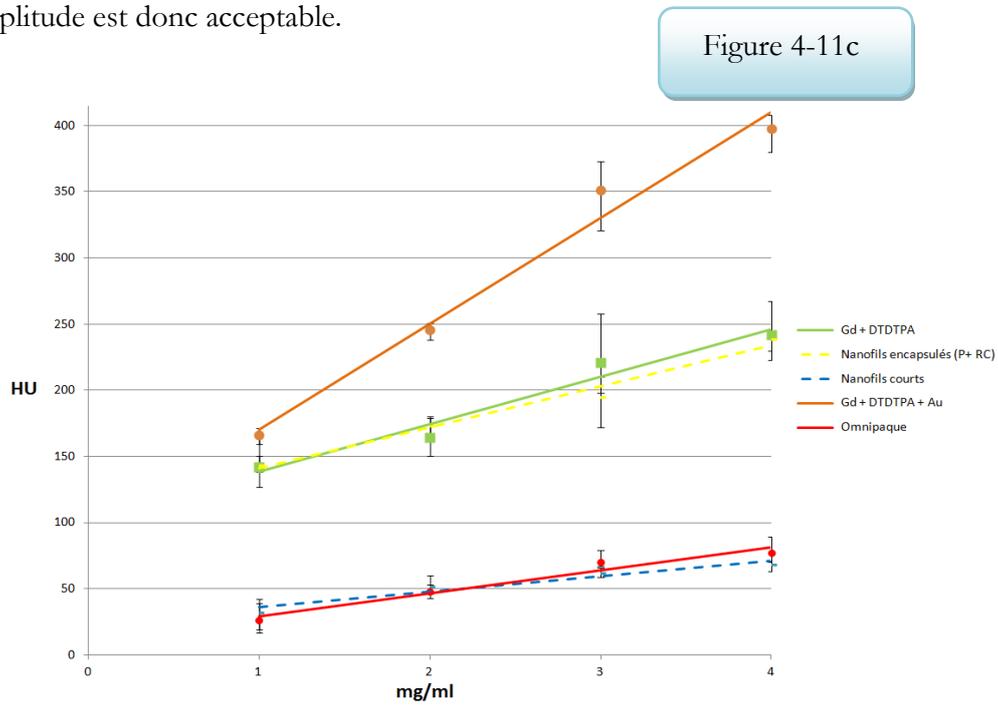


Fig 4-11c et 4-11d : Détails des courbes correspondant au gadolinium, à son couplage aux particules d'or et aux nanofils courts encapsulés ou non, comparativement à l'Omnipaque.

Figure 4-11e

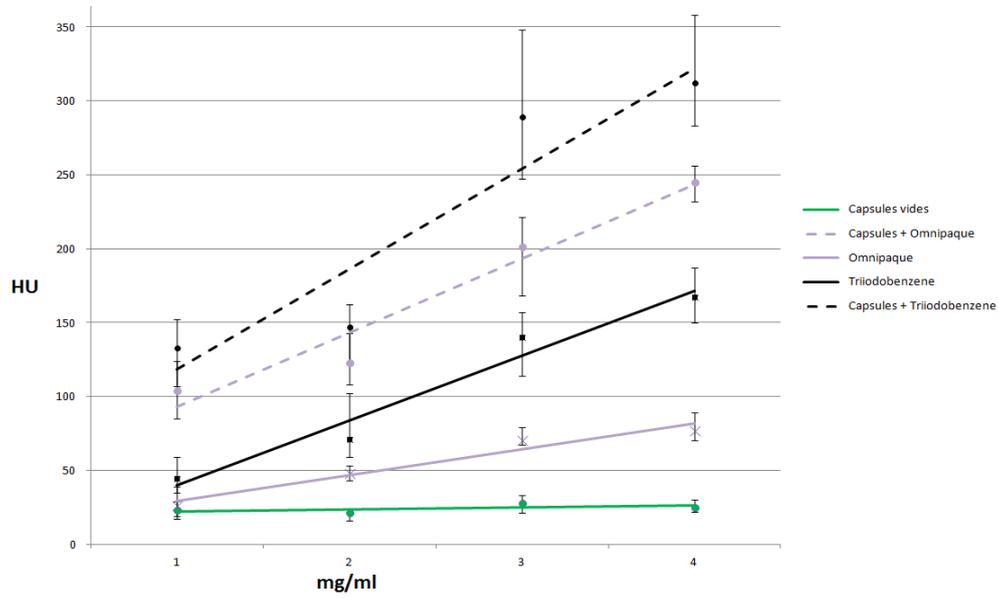


Figure 4-11f

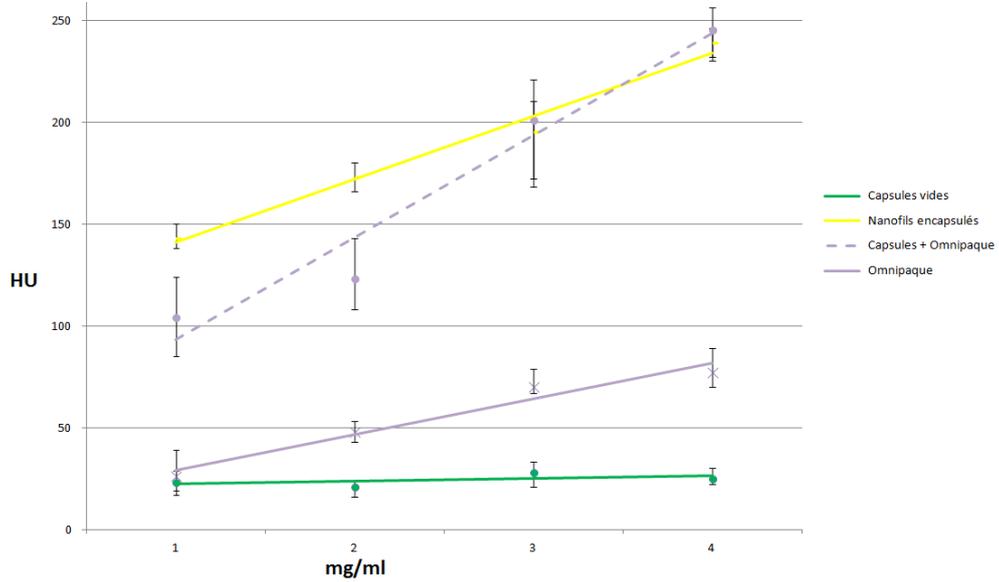
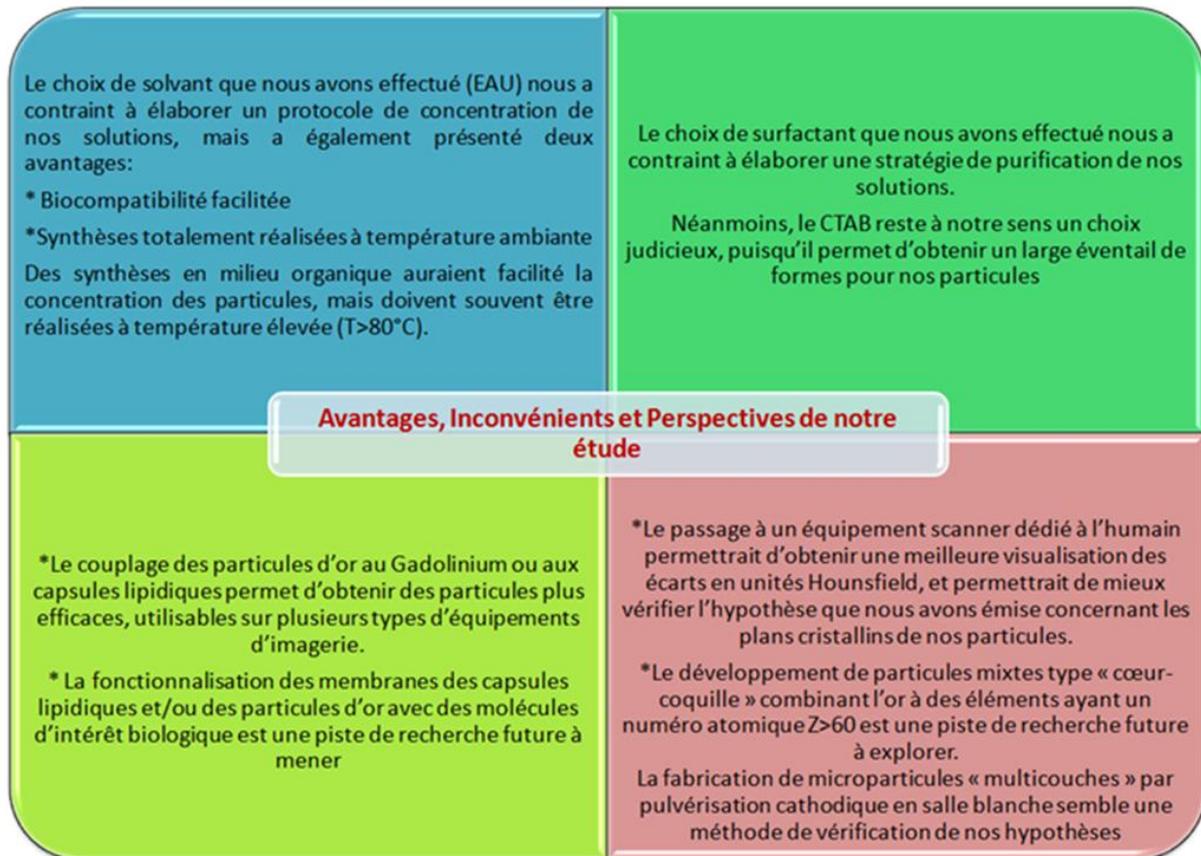


Fig 4-11e et 4-11f : Détails des courbes correspondant aux encapsulations (capsules vides, produits iodés, nanofils courts) comparativement aux composés libres.

Conclusion aux chapitres 2,3 et 4

Il est possible de résumer notre approche de la problématique sous forme d'un tableau synthétique, présentant les choix principaux que nous avons effectué, leurs avantages et inconvénients, ainsi que les pistes futures à explorer :



Conclusion Générale

Les deux études réalisées dans ce mémoire visaient, d'une part, la mise au point d'un procédé de fabrication simple de micro-canaux à section circulaire ($TCA=90^\circ$), et d'autre part la synthèse de particules d'or de formes et de tailles diverses, afin de mener une étude comparative entre ces dernières et les agents de contraste iodés utilisés en imagerie à rayons X.

En réponse à ces problématiques de départ nous avons tout d'abord proposé deux méthodes simples et rapides permettant la création à façon de réseaux des canaux microfluidiques ayant une section quasi-circulaire ($TCA > 70^\circ$). Notre stratégie s'est basée sur l'utilisation des propriétés de surface de matériaux respectueux de l'environnement ainsi que sur leur structuration chimique et géométrique. Ces résultats sont satisfaisants au regard de l'état de l'art, et proposent des pistes nouvelles pour la création d'architectures plus étendues.

L'enjeu d'une fabrication rapide et à moindre coût de dispositifs microfluidiques concerne par exemple la diffusion à grande échelle de systèmes d'analyse (ou de détection) ultra-compacts et à usage unique. Les nanoparticules constituent une ressource de choix à inclure dans de tels dispositifs, puisqu'elles disposent de multiples qualités attrayantes (grande surface de réaction, propriétés optique spécifiques...).

Dans le cas particulier des particules d'or, leur biocompatibilité naturelle favorise leur valorisation médicale. Depuis 2004 l'intérêt porté à ces particules pour une application en imagerie n'a cessé de croître. De ce fait, l'opportunité d'une collaboration instaurée avec l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique (plateforme IMPRT) de l'Université de Lille 2 nous a offert la possibilité de tester nos échantillons, tout en améliorant la maîtrise technique de leur nouvel équipement μ -scanner, puisque nous avons commencé à utiliser (et appris à « dompter ») la machine en même temps que l'équipe IMPRT.

Parmi les nombreuses techniques qui existent pour fabriquer des particules d'or, nous avons tout d'abord utilisé les techniques conventionnelles de la microélectronique (approche top-down), puis nous nous sommes inspirés des méthodes chimiques classiques basées sur la réduction en milieu aqueux d'un sel d'or de degré d'oxydation III (approche bottom-up). L'avantage théorique principal issu de cette décision était le traitement complet des solutions à température ambiante, depuis l'étape de fabrication brute jusqu'à leur fonctionnalisation, par des molécules simples, tout en étant biocompatibles.

Cependant, le challenge réel est survenu lors des étapes de purification et de concentration de nos solutions, puisque les concentrations des agents de contraste du commerce sont en réalité extrêmement élevées (aux alentours de 10 mg/ml). Par ailleurs, **les études scientifiques du domaine sont difficilement comparables les unes aux autres** (en terme d'amélioration du contraste) tant les protocoles d'études sont dépendants de nombreux facteurs (type de scanner, couples tension-courant utilisés, fenêtrage, calibrage des histogrammes...). Dans notre cas, la plage d'étude permise par ce scanner dédié aux petits animaux (35-80 keV) ne correspondait pas aux standards —applicables aux études sur sujets humains (80-150 keV)— qui sont les plus répandus dans la littérature.

Néanmoins, nous sommes parvenus à produire des particules de toutes tailles (15nm à 2µm) et formes (sphères, bâtonnets, polygones) avec des concentrations suffisantes (de l'ordre de 0,02mol/l, soit 4mg/ml) pour mener à bien une comparaison avec l'agent de contraste iodé le plus usuel : l'Omnipaque®.

Peu d'études font cas des phénomènes de sauts d'atténuation « k-edge » et de leur intérêt lorsque l'on souhaite maximiser le contraste en imagerie médicale, aussi, nous nous sommes attachés à souligner leur importance.

Nous avons observé que, dans notre cas, ce sont les particules plates de forme triangulaire qui sont les plus performantes. On peut potentiellement relier cette constatation au phénomène physique de l'effet photo électrique, qui se propagerait et serait renforcé grâce à ces particules. Suivant cette logique, on constate que plus la surface d'une particule est plane, plus l'alignement des atomes est favorable, et permet d'obtenir un bon contraste.

En effet, nos résultats ne démontrent pas un bénéfice net des plus petites particules d'or de notre panel sur les agents iodés pour la gamme de tension et pour les concentrations utilisées, ce qui était attendu (page 189, figure 3-120). En revanche, l'utilisation de particules d'or de grandes tailles et de grande surface (allant de 150 nm à 1 µm de côté et ayant une épaisseur de 20 nm environ) semble apporter un bénéfice net par rapport à l'utilisation des composés iodés et des particules sphériques classiques. La discrimination des formes de particules semble donc effective, même s'il faut prendre en compte les marges d'erreurs, puisque les valeurs en Unités Hounsfield s'apprécient avec une incertitude qui est celle de la machine (50 HU dans notre cas).

Nos résultats étayent et complètent donc ceux de la littérature (Jackson et al.¹³⁶). Cependant, à notre connaissance, par notre travail, il s'agit de la première fois qu'une comparaison est effectuée avec des particules non sphériques et sur une gamme de dimension importante, montrant potentiellement une discrimination de forme par imagerie scanner et un meilleur contraste par rapport aux composés iodés.

Nous avons également montré que les nanocapsules lipidiques contenant des composés iodés ou des particules d'or, ainsi que les nanoparticules multimodales pouvaient être une nouvelle stratégie très attrayante. En effet, nos résultats montrent d'une part que les nanoparticules d'or encapsulées (P+RC) présentent un meilleur contraste que les particules libres (RC) et, d'autre part, que les composés iodés encapsulés présentent un meilleur contraste que les composés libres. Ce résultat est également potentiellement très intéressant pour l'utilisation de composés à fort contraste mais pas forcément bio-compatible. Enfin, les courbes correspondant aux particules bimodales (Gd+DTDTPA+Au) et à l'association (Gd+omnipaque) sont très proches, ce qui signifie que dans nos conditions expérimentales, il est possible de remplacer l'iode, potentiellement allergisant par l'or.

Finalement, il serait également intéressant pour un travail futur de combiner les savoir-faire issus des deux domaines précédemment explorés pour, par exemple, permettre le développement de dispositifs microfluidiques utilisant les particules d'or en tant qu'agents de détection (par fluorescence, par chélation...). La grande polyvalence des particules d'or pourrait en effet rendre ces systèmes exploitables dans de très nombreux secteurs, de la nanomédecine à la dépollution chimique. Concernant le développement de particules multimodales, il serait intéressant de mettre au point un procédé de fabrication de particules « multicouches ». Par exemple en combinant le dépôt par évaporation d'or soit avec un dépôt par évaporation d'erbium ou de tungstène (bâties Meca 2000-1, Meca 2000-3, ou Plassys disponibles à l'CIEMN), soit avec un dépôt par ALD d'hafnium, de tantale ou de platine (équipement ALD Beneq, TFS 200, disponible à l'CIEMN). Grâce à ces équipements, la cristallinité des différents plans de ces particules pourrait être finement contrôlée, et permettrait de renforcer la validité de nos hypothèses concernant l'influence de l'effet photoélectrique sur nos particules.

Annexes

Annexe 1

➤ Protocole de fabrication de masques affinés en silicium

Le design des masques est réalisé en utilisant le logiciel Clewin3.

Les masques sont utilisés afin de créer des motifs hydrophiles sur certaines zones des surfaces recouvertes d'octadécyltrichlorosilane (OTS). Ils sont fabriqués en utilisant les équipements disponibles en salle blanche de l'IEMN, mais ils peuvent aussi être produits à plus bas coût en utilisant des équipements d'usinage mécanique.

Le procédé de fabrication est le suivant :

- Une couche d'aluminium est déposée par pulvérisation cathodique sur une plaquette de silicium
- Une enduction à la tournette de résine AZ1518 est réalisée (4000 tr/min, durant 8 secondes)
- Un recuit est effectué durant 60 secondes à 110°C
- Une exposition aux UV est réalisée à travers un masque en verre/chrome, et est suivie d'un second recuit (paramètres identiques au premier recuit)
- La résine est révélée dans un bain de AZ726, exposant de ce fait la couche d'aluminium par endroit.
- L'aluminium exposé est à son tour gravé dans un bain d'acide orthophosphorique, exposant à son tour le silicium aux endroits désirés (futurs motifs creux du masque)
- Enfin, la plaquette est séchée et placée dans l'enceinte du bâti à plasma couplé par Induction (ICP) de chez Surface Technology System, pour y subir une gravure par procédé Bosch (SF_6/O_2).

Annexe 2

➤ Contexte économique concernant les équipements d'imagerie médicale en France

Les équipements scanners sont plus nombreux (moins d'attente pour obtenir un premier examen pour le patient) et les examens réalisés par leur intermédiaire sont deux fois moins chers que pour l'IRM.

Tarifs des forfaits techniques des IRM

PUISSANCE DE L'APPAREIL (en teslas)	< 0,5 T	0,5 T	> 0,5 T et < 1,5 T	1,5 T (2)
Activités de référence	3500	4000	4000	4500
Amortis (1), forfaits pleins				
Paris		171,40 €		
Région parisienne (hors Paris)		164,22 €		
Province		154,18 €		
Non amortis, forfaits pleins				
Paris	198,64 €	194,34 €	218,72 €	230,20 €
Région parisienne (hors Paris)	192,90 €	187,17 €	211,55 €	223,03 €
Province	182,86 €	179,28 €	204,38 €	213,71 €

Tarifs des forfaits techniques des scanners

TYPE D'APPAREILS	FORFAIT plein	FORFAIT réduit selon les tranches d'activité		
	Activité	Activité	Activité	Activité
	≤ activité de référence	> activité de référence et ≤ seuil 1	> seuil 1 et ≤ seuil 2	> seuil 2
Amortis (1), toutes classes	71,38 €	59,72 €	42,88 €	30,63 €
Non amortis, toutes classes	100,51 €			

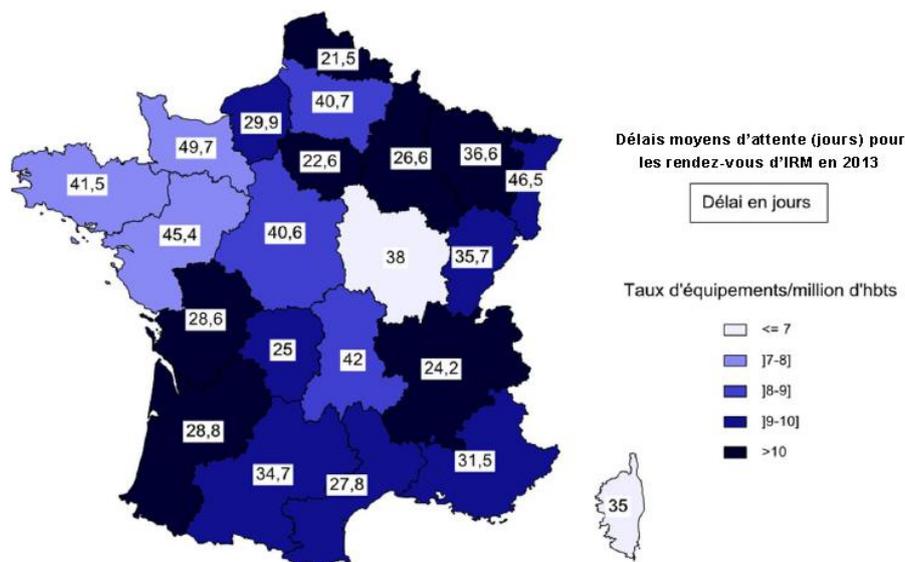


Fig A-1 : Comparaison de coûts entre examen scanner et examen IRM (tarifs 2007) et délai d'attente en 2013 pour un examen IRM.

Annexe 3

➤ Altérations possibles de la matière lors du passage aux rayons X

✓ Phénomène de freinage :

Les rayons X sont issus de l'interaction entre des électrons accélérés et une anode métallique.

Les électrons fortement accélérés sont déviés par le champ coulombien des noyaux lourds des atomes de l'anode. Cette accélération provoque l'émission d'un photon X. Cette émission entraîne une perte d'énergie, et donc un phénomène de freinage (« Bremsstrahlung »), illustré en figure A-2.

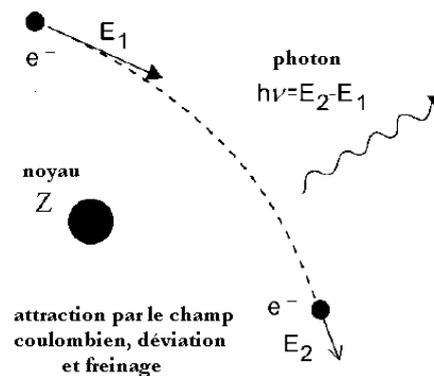


Fig A-2 : Illustration du phénomène de déviation des électrons et du freinage.

✓ Effet photoélectrique :

- Le photon X incident doit avoir une énergie $E = h\nu$ supérieure à l'énergie de l'électron avec lequel il va interagir,
- L'électron qui est concerné est un électron lié (électron de cœur, sur les couches K et L de l'atome, figure A-3) :

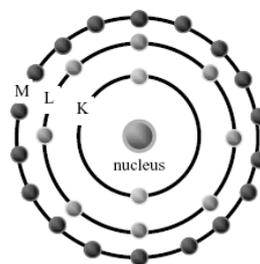


Fig A-3 : Structure électronique en couches de l'atome.

Si ces deux conditions sont réunies, le photon X est totalement absorbé et disparaît car il communique toute énergie à l'électron de cœur. Ce dernier obtient une énergie suffisante pour

être éjecté hors de l'atome (figure A-4). La vacance créée dans la couche interne laisse l'atome dans un état ionisé. Elle est comblée par un électron issu d'une couche plus externe (réorganisation du cortège électronique) :

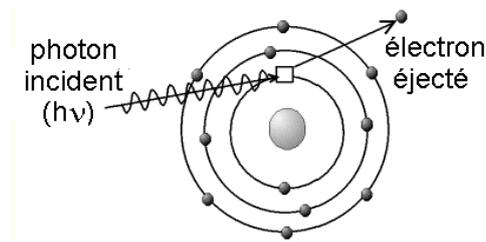


Fig A-4 : Principe de l'effet photoélectrique.

L'utilisation de filtres-grilles en aluminium (figure A-5) peut permettre d'affiner la superposition des zones d'énergie visées lorsque l'on souhaite bénéficier pleinement de l'effet photoélectrique:

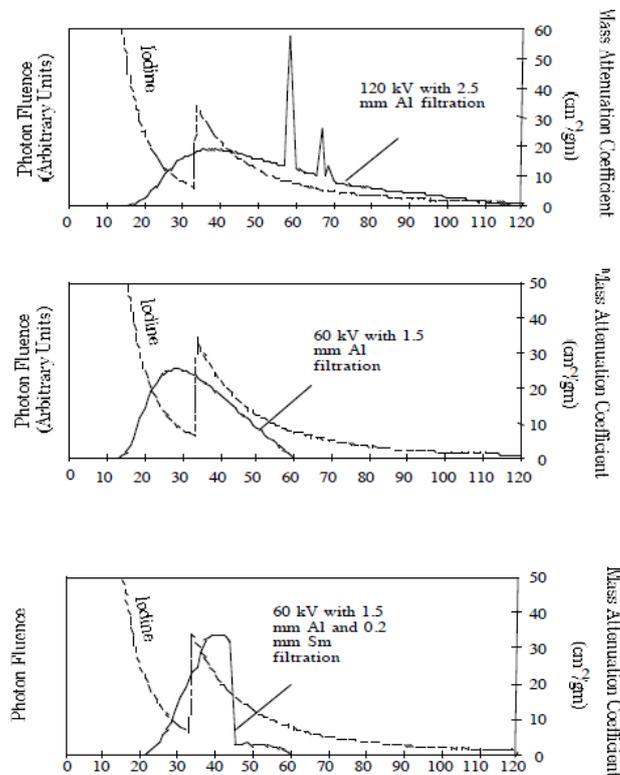


Fig A-5 : Effet des grilles de filtration en aluminium sur le spectre des rayons X ²²¹.

On peut également ajouter que cet effet physique permet non seulement d'améliorer le contraste radiographique, mais peut également être utilisé de manière thérapeutique pour engendrer la mort cellulaire au niveau des tumeurs cancéreuses. L'ionisation engendrée a des effets directs et indirects (via les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau) sur les molécules biologiques (lipides, protéines, ADN)²²² comme l'illustre la figure A-6 ci-dessous:

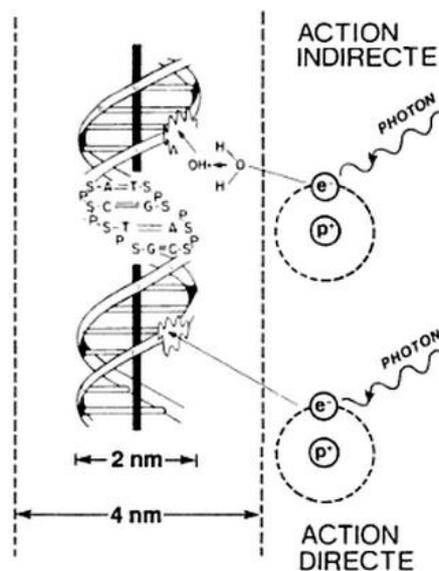


Fig A-6 : Action des rayons X sur l'ADN.

L'effet photoélectrique engendre l'effet k-edge.

Cet effet peut être mis à profit, mais il intervient plus ou moins favorablement selon l'atome considéré.

Si l'on considère le paramètre G , représentant le gain des coefficients massiques d'absorption μ , et défini comme étant le ratio entre les valeurs de μ prises juste après et avant le saut K-edge :

$$G = \frac{\mu^{Z, E+}}{\mu^{Z, E-}}$$

On peut alors tracer le graphique suivant :

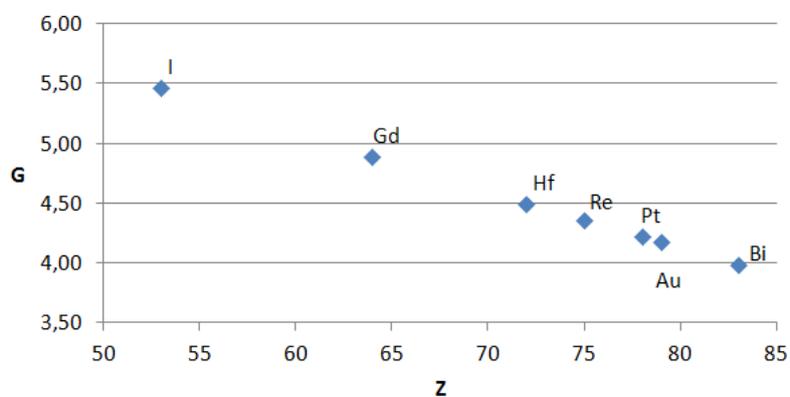


Fig A-7 : Gain lors du saut K-edge en fonction du numéro atomique des éléments choisis.

La figure A-7 montre que les éléments possédant les meilleures capacités d'atténuation sont ceux ayant un numéro atomique faible. Ainsi, le passage du seuil K pour l'iode permet d'atténuer 5,46 fois plus les photons d'énergie légèrement supérieure, contre 4,1 fois pour l'or.

✓ Effet Compton :

Cet effet (illustré en figure A-8) peut quant à lui se produire par interaction avec un électron libre. L'électron est éjecté, mais le photon n'a pas perdu toute son énergie dans la bataille : il est dévié et ressort avec une énergie plus faible.

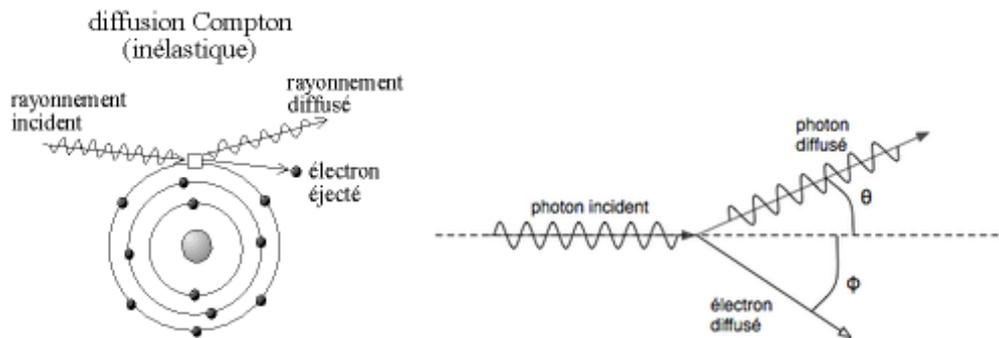


Fig A-8 : Principe de l'effet Compton.

La probabilité d'atténuation par effet Compton (C) s'exprime en fonction du numéro atomique, selon la relation suivante (k' est une constante) :

$$\mu(C) = k' * \frac{Z}{hu}$$

✓ Phénomène de matérialisation :

Ce phénomène n'existe qu'aux hautes énergies ($E >$ quelques MeV). Le photon X disparaît en donnant naissance à une paire électron/positron, qui va elle-même s'annihiler spontanément. Ce phénomène ne concerne pas nos études, aux vu des valeurs d'énergie mises en jeu.

On peut ainsi regrouper ces interactions avec la matière selon deux catégories :

- interaction avec les électrons (effet photoélectrique et effet compton),
- interaction avec les noyaux (matérialisation de paires électron-trous)

Annexe 4

➤ Digression concernant l'imagerie par Résonance Magnétique

Les propriétés de résonance magnétiques des noyaux atomiques sont découvertes en 1938 par Isidor Isaac Rabi. Les mesures réalisées spécifiquement par induction magnétique sont pour leur part effectuées après-guerre, en 1946, par Felix Bloch et Edward Mills Purcell. Cette base théorique permettra par la suite le développement des applications, et notamment de l'IRM.

La résonance magnétique nucléaire ne peut être observée que dans le cas d'atomes dont le spin nucléaire est non nul. De ce fait, l'hydrogène est le candidat idéal pour les applications en biologie, puisqu'il est présent en très grande quantité dans le corps humain (eau). Ces protons, soumis à un champ magnétique intense, alignent leurs spins. A partir de ce moment, il est possible de les exciter en leur appliquant des séquences d'impulsions (RF/ écho de spin / écho de gradient). Le processus est illustré en figure A-9. Lorsque ces impulsions s'arrêtent, les protons reviennent progressivement au repos dans des délais variables selon les tissus concernés :

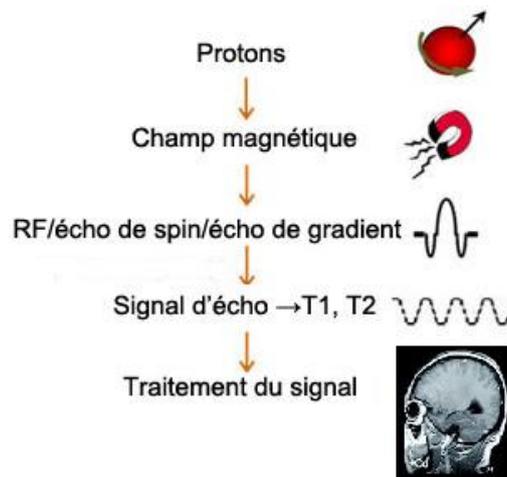


Fig A-9 : Principe de l'acquisition d'une image en IRM.

Le signal d'écho permet d'obtenir deux valeurs d'intérêt : les temps de relaxation T1 et T2 :

- Le temps T1 donne une information sur la densité des tissus,
- Un raccourcissement du temps T1 signifie l'apparition d'un phénomène d'hypersignal,
- Le temps T2 donne une information sur les tissus environnant
- Un raccourcissement du temps T2 signifie l'apparition d'un phénomène d'hyposignal

Les images IRM sont réalisées en réglant l'équipement de façon à privilégier l'un de ces deux temps. On parle de « pondération ».

Les temps T1 et T2 influent sur le contraste de l'image de façon opposée, comme indiqué sur la figure A-10 suivante :

Tissu	Pondération T1	Pondération T2
Eau	noire	blanche
Graisse	blanche	noire
Substance blanche	blanche	grise
Substance grise	grise	blanche

Fig A-10 : Teinte des images IRM en fonction des pondérations appliquées et des tissus visualisés.

Les produits de contraste utilisés pour améliorer les clichés IRM peuvent être classés en deux catégories, dont les effets sur le contraste sont présentés en figure A-11 :

- Les produits superparamagnétiques (par exemple, les particules SPIO) :
Ces agents s'aimantent lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Lorsque l'effet du champ cesse, ils perdent leur aimantation instantanément, contrairement aux matériaux ferromagnétiques qui présentent un phénomène de rémanence. Au niveau de l'IRM, ils provoquent une inhomogénéité de champ. Un déphasage des spins se produit. Leur action se fait ressentir principalement sur le temps de relaxation T2.
- Les produits paramagnétiques (par exemple, les chélates de gadolinium) :
Les ions impliqués peuvent interagir avec les protons qui les entourent. L'interaction en question se traduit par un raccourcissement des temps de relaxation T1 (majoritairement) et T2. Les ions utilisés doivent souvent être chélatés, du fait de leur haute toxicité en milieu cellulaire.

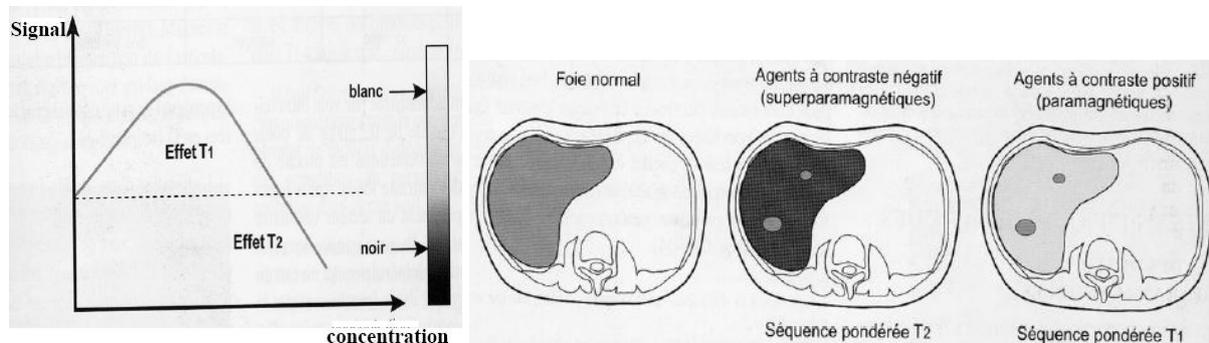


Fig A-11 : A gauche, effet du gadolinium sur le contraste de l'image IRM, en fonction de la concentration. A droite, effet des agents de contraste sur l'image IRM.

Annexe 5

➤ Généralités concernant les micro et nanoparticules

▪ Définition d'une nanoparticule

Au sens strictement mathématique du terme, une nanoparticule est une particule dont la taille est comprise entre 1 nm et 1 μm . Dans la pratique, on retiendra l'intervalle allant de 10 à 250 nm, qui correspond à l'étendue de gamme la plus fréquemment rencontrée dans les études scientifiques récentes.

Le même type de définition peut être appliqué à l'échelle « micro », une microparticule a donc une taille variant de 1 μm à 1 mm.

Ces nanoparticules sont constituées d'un nombre fini d'atomes, mais on remarque aisément que d'un point de vue spatial, plus la taille des particules diminue, plus le rapport surface/volume augmente. En effet on a :

$$S/V = 4\pi r^2 / (4\pi r^3 / 3) \propto [1/r]$$

Cela signifie que lorsque la taille des particules diminue, le nombre d'atomes de surface exposés au milieu extérieur augmente par rapport au nombre d'atomes situés à l'intérieur de la particule.

La forme des particules considérées influe également sur ces données, comme le montrent les graphiques de la figure A-12 ci-dessous.

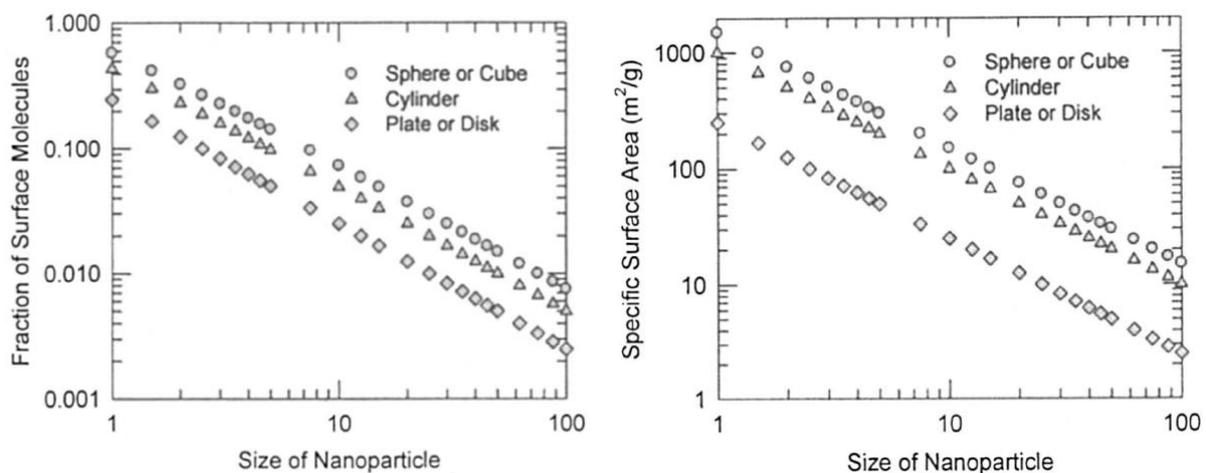


Fig A-12 : Evolution de la surface spécifique disponible en fonction de la taille des nanoparticules²²³.

▪ Données concernant le marché actuel des nanoparticules :

Aujourd'hui, il est relativement aisé de produire industriellement des nanoparticules aux propriétés choisies et calibrées, à partir de nombreux matériaux. L'argent, le carbone (fullerènes, nanotubes...), les oxydes de silicium et de titane sont ainsi régulièrement utilisés dans l'industrie. Ainsi, en 2008, en France ont été produites de grandes quantités de nanoparticules de tout type, comme l'a recensé l'Afsset (figure A-13) ²²⁴ :

Type de Nanoparticules	Quantités produites (tonnes)	Utilisations
silice	485 000	Alimentation animale, pneumatiques, peintures...
alumine	469 000	Plasturgie, peintures, céramiques, composants électroniques...
dioxyde de titane	250 000	Pigments, parfums, cosmétique, ciments, verres, équipements automobiles, dépollution de l'eau...
carbone	240 000	Nanotubes dans les matières plastiques et matériaux, pneumatiques et caoutchoucs, accumulateurs, noir de carbone utilisé dans la production chimique....

Fig A-13 : Quantité et types de nanoparticules produites en France en 2008 ²²⁴.

Les produits à base d'or, eux, sont par contre peu présents sur le marché (cf figure A-14 ci-dessous, datant de 2006) :

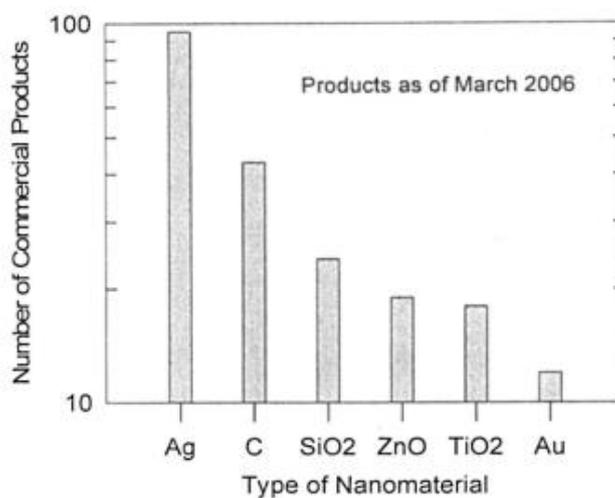


Fig A-14 : Nombre de produits contenant des nanoparticules commercialisés en 2006, en fonction de l'élément chimique prépondérant dans les nanoparticules en question ²²⁴.

Annexe 6

➤ Histoire de l'iode, de la découverte des rayons X et de l'imagerie médicale

Au premier siècle après JC, Claude Galien, médecin émérite travaille lui aussi sur les goitres, et ses méthodes feront loi jusqu'au 17^{ème} siècle, comme le montre l'extrait (figure A-15) ci-dessous qui date de 1827²²⁵. A cette période de l'histoire, l'iode vient à peine d'être découvert depuis une quinzaine d'années par Bernard Courtois.

ANATOMIE
 • Dans les six livres sur les parties affectées, Galien a répandu beaucoup de faits anatomiques & physiologiques. Il a vu, à l'occasion d'une opération faite sur un goitre, la voix se perdre quand les nerfs récurrents ont été blessés. L'ani-

Fig A-15 : Propriétés médicinales de l'iode²²⁵.

Une dizaine d'années plus tard, en 1838, le chimiste et physicien Mickael Faraday étudie les décharges électriques dans les gaz raréfiés grâce à un dispositif expérimental simple : une anode et une cathode sont placées en vis-à-vis dans un tube en verre (figure A-16).

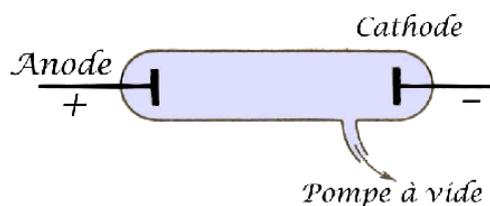


Fig A-16 : Schéma d'un tube cathodique.

La mise sous tension (assez élevée) de la cathode permet d'observer une étincelle entre les deux électrodes. Faraday augmente ensuite le vide dans l'ampoule : l'étincelle disparaît au profit d'une « vapeur » violette.

Par la suite de nombreux physiciens retravaillèrent l'expérience, en modifiant la forme du tube ou encore le gaz présent dans l'ampoule. Le physicien allemand Plücker réussit par la suite à observer que le vide poussé rend le tube très résistant au passage du courant et qu'une fluorescence verte apparaît alors.

Hittorf, qui a étudié ces phénomènes avec Plücker, prouve en 1869 que cette lumière verte est due à des rayons qui se propagent en ligne droite depuis la cathode. En effet, en intercalant un petit objet dans l'ampoule, celui-ci projette son ombre sur le fond du tube, du côté de l'anode (figure A-17). On donnera à ces rayons le nom de « cathodiques », au vu de leur provenance.

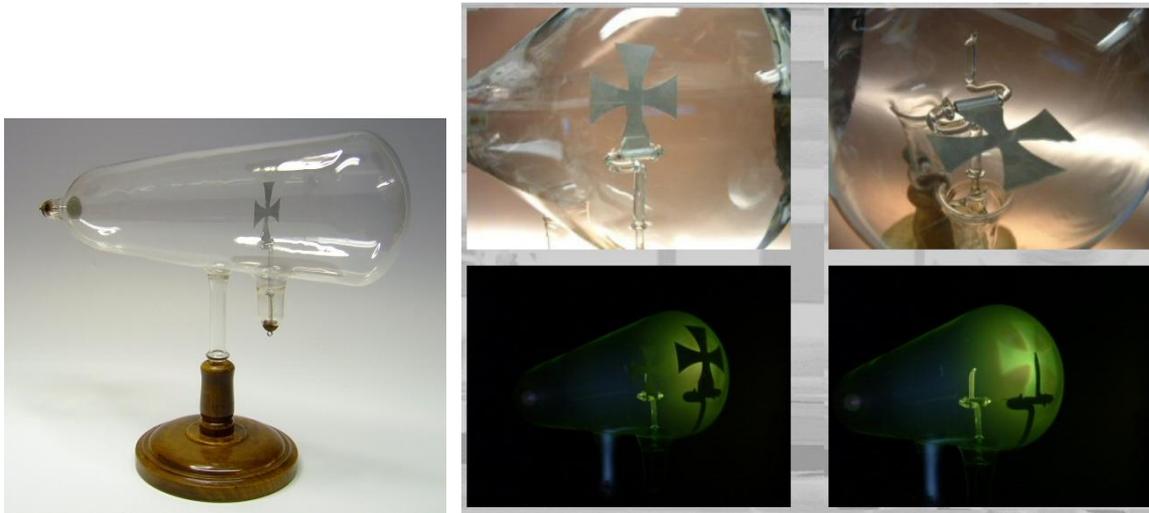


Fig A-17 : Premiers tubes cathodiques à rayons X²²⁶.

On pense également que ces rayons sont confinés à l'intérieur du tube de verre. Heinrich Hertz et Philippe Lenard cherchent à étudier ces rayons à l'extérieur de l'ampoule, et émettent l'hypothèse suivante: si les rayons cathodiques ont une nature similaire aux rayons UV, alors ils pourront passer au travers d'une petite « fenêtre » de quartz aménagée dans le verre de l'ampoule. Cette expérience est un échec. Lors de la mise au point de l'expérience, ils choisissent fortuitement d'isoler le dispositif de la lumière, à l'exception d'une petite fenêtre F. En outre, le dispositif était contenu dans une boîte métallique dont le matériau renfermait de l'étain et/ou du plomb. Cela retardera la découverte des rayons X.

Cependant, en 1892, Hertz s'aperçoit que des sels d'uranium enveloppés dans de l'aluminium et placés dans l'ampoule deviennent phosphorescents. Lenard réitère alors l'expérience de l'ampoule avec « fenêtre », avec une petite modification : celle-ci n'est plus en quartz mais en aluminium. Les rayons cathodiques passent désormais à l'extérieur du montage (figure A-18).

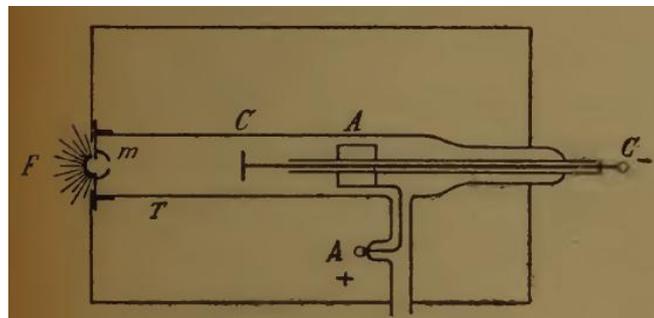


Fig A-18 : Schéma du montage de Lenard²²⁷.

En 1895, Wilhem Röntgen travaille sur ce même sujet dans son laboratoire. Il souhaite reproduire les expériences de Lenard, mais pour des raisons inconnues, soit pour réduire le coût, soit par envie d'aller plus vite ou pour alléger le poids du montage, il effectuera l'isolation du dispositif par du carton noir plutôt que par une boîte en métal.

A l'autre bout du laboratoire, il prépare un écran censé produire de la phosphorescence uniquement s'il est positionné devant la fenêtre aménagée. Il allume l'appareil, plonge la pièce dans le noir, et constate que l'écran produit de la lumière, même s'il n'a pas été mis à la position prévue. Il en déduit que des rayons qui diffèrent des rayons cathodiques doivent passer au travers de l'ampoule (et donc du verre), et porter assez loin et en tout sens pour activer l'écran. Il vient de découvrir un rayonnement nouveau, qu'il nomme rayons X.

Annexe 7

➤ Historique des nanoparticules d'or

Depuis l'Antiquité, les particules d'or sont traditionnellement fabriquées par voie chimique, en solution. L'une des plus anciennes descriptions françaises ayant trait à cette chimie des particules d'or remonte à 1679. A. Neri traduit cette année là, dans son livre *Art de la verrerie*, des textes provenant de plusieurs pays d'Europe, et notamment le *Sol Sine Veste* (figure A-19) de J.C. Orschall²²⁸. Les expériences de cet ingénieur métallurgiste l'amènèrent à fabriquer des colloïdes d'or de couleur rouge, en employant entre autre de l'argent, de l'étain et de l'eau régale.

On prend trois quarts d'eau-forte dans laquelle on ait précipité de l'argent, & un quart d'eau falée ; on les mêle ensemble ; ce mélange prend une couleur laiteuse , c'est-à-dire que l'argent dont quelques parties sont encore demeurées dans l'eau forte après la précipitation, tombe au fond du vase. On laisse ce mélange dans cet état jusqu'à ce qu'il soit redevenu clair ; il est alors d'une couleur d'aigue-marine ; on le décante ensuite dans un autre vase pour le séparer de son sédiment , & on le filtre avec soie. Après cette préparation, on jette dans cette liqueur un peu de limaille d'étain ;

S I N E V E S T E. 491
 on l'expose à une chaleur douce, & on laisse diffoudre peu à peu. Mais il ne faut jeter dans la liqueur qu'une petite pincée d'étain à chaque fois, c'est-à-dire, autant que l'on peut en prendre avec les deux premiers doigts ; il faut attendre qu'une pincée soit dissoute pour en remettre une autre ; on continue ce procédé jusqu'à ce que l'eau soit entièrement devenue d'un beau jaune, ce qui est la marque que la solution a été suffisante ; on filtre cette liqueur jaune de façon qu'elle soit très-belle & très-pure, & on la garde en cet état.
 On fait ensuite une eau-régale avec de l'eau-forte & du sel ammoniac suivant la méthode connue de tout le monde ; on dissout de l'or dans cette eau. On fait tomber quelques gouttes de cette solution d'or dans un très-grand verre plein d'eau de fontaine bien pure & bien nette ; on remue bien le tout ensemble, & ensuite on laisse tomber dans le même verre une ou deux gouttes de la dissolution d'étain préparée comme on l'a enseigné ci-dessus ; sur le champ on voit toute la liqueur devenir rouge & d'une belle couleur de sang. C'est ici la

Fig A-19 : Procédé de fabrication de particules d'or au 17^{ème} siècle ²²⁸.

Environ deux siècles plus tard (~1857), M. Faraday²²⁹ propose une méthode rigoureusement formalisée, mettant en jeu des ions tetrachloroaurate lors d'une réaction de réduction électrochimique.

Beaucoup plus récemment, une technique permettant d'obtenir de manière simple et rapide des colloïdes d'or en solution, avec ces mêmes ions, a été décrite avec précision par J. Turkevich en 1951²³⁰. Cette méthode fait appel à l'utilisation d'ions citrates faisant office d'agents réducteurs et d'agents d'encapsulation des particules d'or formées. Ce procédé donne des colloïdes assez monodisperses, sphériques, de diamètre 10 à 20 nm, en solution aqueuse.

Par la suite plusieurs méthodes ont vu le jour. Chacune d'elles donne aux colloïdes des caractéristiques de taille et d'enrobage spécifiques. Les premiers essais de ce type, toujours avec les ions citrates ont été menés en 1973 par Frens *et al.*²³¹ Puis l'utilisation d'ions halogénures fut intensivement explorée, notamment pour produire des nanofils d'or.

Annexe 8

➤ Particules métalliques diverses

Les premiers agents de contraste ont été choisis parmi les atomes connus au début des années 1900. La sélection a été faite en fonction des numéros atomiques, et selon les propriétés médicales présumées de l'époque.

Sur cette base, parmi l'éventail plus large de nanoparticules dont nous disposons actuellement, toutes ne sont pas éligibles en tant qu'agents de contraste. Les nanofils de silicium en sont un bon exemple ($Z(\text{Si})=14$ bien trop faible). Le numéro atomique des quantum dots CdSe s'avère intéressant ($Z(\text{Cd})=48$), mais ils auraient des effets toxiques comparables au bismuth.

Les derniers développements les plus novateurs de l'industrie pharmaceutique datent de 2008. En effet, il existe une concurrence intense entre un petit nombre de sociétés de nanotechnologie. Nanobiotix (figure A-20) en France a fait le pari d'utiliser des oxydes d'hafnium ($Z(\text{Hf})=72$), et a obtenu une première autorisation pour des tests à l'échelle humaine au début de l'année 2012.



Laurent Lévy, président du directoire de Nanobiotix.

Activables par radiothérapie

Environ 50 à 60 % des patients atteints de cancer sont traités par radiothérapie. Cette solution présente toutefois un inconvénient : les dommages collatéraux subis par les tissus sains avoisinants. Nanobiotix a donc développé une nouvelle approche thérapeutique basée sur NanoXray. « Ces nanoparticules inertes, conçues pour entrer dans les cellules tumorales, libèrent une quantité impressionnante d'énergie lors de l'activation par une dose standard de rayons X, explique Laurent Lévy, président du directoire de Nanobiotix. Les radicaux libres ainsi formés détruisent les cellules cancéreuses. La bonne dose est alors délivrée aux cellules tumorales compatibles avec tous les équipements de radiothérapie

existants. » L'AFSSAPS vient de donner son autorisation à la réalisation d'un essai clinique de phase I portant sur 27 patients souffrant d'un sarcome des tissus mous. Les premiers résultats sont attendus d'ici à la fin de l'année.

Fig A-20 : Nanobiotix cherche à populariser les oxydes d'Hafnium.

Annexe 9

➤ Exemples de synthèses existantes dans la littérature

Ci-dessous sont donnés des extraits d'articles de la littérature présentant divers procédés de synthèse de nanoparticules d'or en milieu aqueux :

En 2001, Jana et al. (équipe Murphy) proposent une méthode permettant la fabrication de nanofils longs. Le procédé implique une synthèse en cascade en trois parties, mais le rendement n'est pas optimal pour les nanofils ayant un faible ratio d'aspect:

Experimental Section

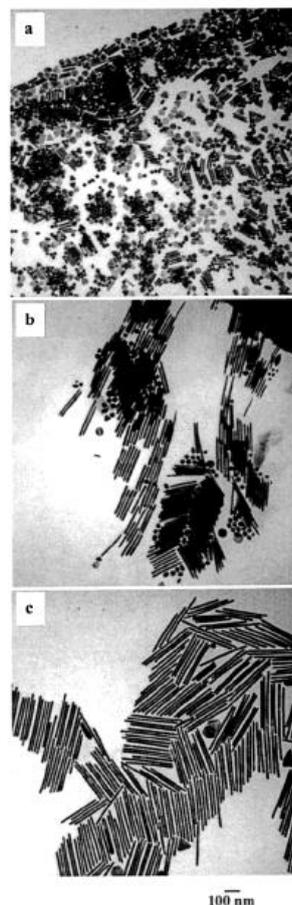
I. Preparation of 3.5 nm Seed. A 20 mL aqueous solution containing 2.5×10^{-4} M HAuCl_4 and 2.5×10^{-4} M tri-sodium citrate was prepared in a conical flask. Next, 0.6 mL of ice cold 0.1 M NaBH_4 solution was added to the solution all at once while stirring. The solution turned pink immediately after adding NaBH_4 , indicating particle formation. The particles in this solution were used as seeds within 2–5 h after preparation. The average particle size measured from the transmission electron micrograph was 3.5 ± 0.7 nm. Some irregular and aggregated particles were also observed that were not considered for determining the size distribution. Here, citrate serves only as

the capping agent since it cannot reduce gold salt at room temperature (25 °C). Experiments performed in the absence of citrate resulted in particles approximately 7–10 nm in diameter.

II. Preparation of 4.6 ± 1 Aspect Ratio Rod. In a clean test tube, 10 mL of growth solution, containing 2.5×10^{-4} M HAuCl_4 and 0.1 M cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), was mixed with 0.05 mL of 0.1 M freshly prepared ascorbic acid solution. Next, 0.025 mL of the 3.5 nm seed solution was added. No further stirring or agitation was done. Within 5–10 min, the solution color changed to reddish brown. The solution contained 4.6 aspect ratio rods, spheres, and some plates. The solution was stable for more than one month.

III. Preparation of 13 ± 2 Aspect Ratio Rod. A three-step seeding method was used for this nanorod preparation. Three test tubes (labeled A, B, and C), each containing 9 mL growth solution, consisting of 2.5×10^{-4} M HAuCl_4 and 0.1 M CTAB, were mixed with 0.05 mL of 0.1 M ascorbic acid. Next, 1.0 mL of the 3.5 nm seed solution was mixed with sample A. The color of A turned red within 2–3 min. After 4–5 h, 1.0 mL was drawn from solution A and added to solution B, followed by thorough mixing. The color of solution B turned red within 4–5 min. After 4–5 h, 1 mL of B was mixed with C. Solution C turned red in color within 10 min. All of the solutions were stable for more than a month. Solution C contained gold nanorods with aspect ratio 13.

IV. Preparation of 18 ± 2.5 Aspect Ratio Rod. This procedure was similar to the method for preparing 13 aspect ratio rods. The only difference was the timing of seed addition in successive steps. For 13 aspect ratio rods, the seed or solutions A and B were added to the growth solution after the growth occurring in the previous reaction was complete. But to make 18 aspect ratio rods, particles from A and B were transferred to the growth solution while the particles in these solution were still growing. Typically, solution A was transferred to B after 15 s of adding 3.5 nm seed to A, and solution B was transferred to C after 30 s of adding solution A to B.



I. Synthesis of seed

2.5×10^{-4} M HAuCl_4 +
 2.5×10^{-4} M Na-citrate



+

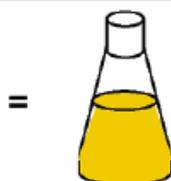
0.6 mL 0.1 M
Ice-cold aq NaBH_4



Gold nanoparticle seeds
(~ 4nm diameter)

II. Stock solution

Stock solution
 2.5×10^{-4} M HAuCl_4
+ 0.1 M CTAB



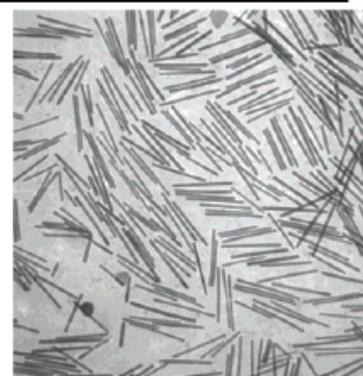
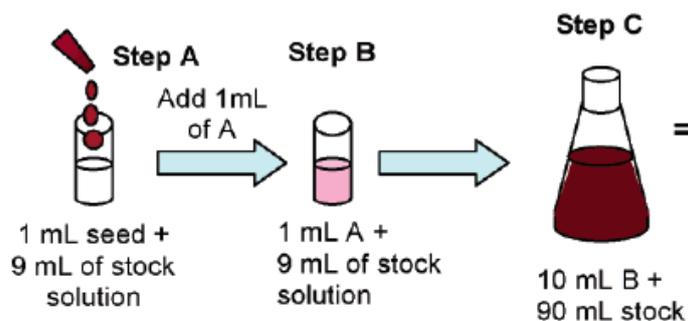
=

Addition of
Ascorbic acid



Reduction
of Au^{3+} to
 Au^{1+} results
in disappearance
of color

II. Three step protocol for nanorod synthesis



En 2003, Busbee et al. proposent une méthode concurrente, permettant la synthèse de nanofils d'or avec un rendement élevé (la principale différence concerne l'ajout d'heptane et d'hydroxyde de sodium aux solutions usuelles):

Experimental

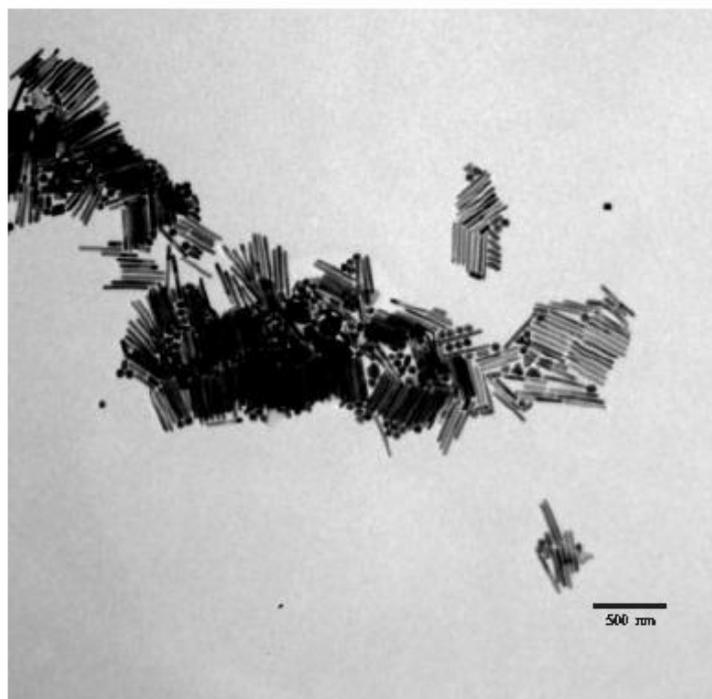
All reagents were obtained from Aldrich Chemicals and used as received. Ultra-pure deionized water (Continental Water Systems) was used to prepare all aqueous solutions. Dedicated glassware was cleaned before each reaction with aqua regia and then rinsed with ultra-pure deionized water.

Gold nanoparticles were viewed using a JEOL JEM-100CXII transmission electron microscope (TEM) operating at 80 kV. Sizing was enabled using an AMT Kodak Megaplug digital camera and software. Samples were prepared for electron microscopy by evaporating 1 μL of nanoparticle solution (at 25 $^{\circ}\text{C}$) on formvar-coated copper grids.

For gold-seed production, 0.5 mL of 0.01 M HAuCl_4 trihydrate in water and 0.5 mL of 0.01 M sodium citrate in water were added to 18 mL of deionized H_2O and stirred. Next, 0.5 mL of freshly-prepared 0.1 M NaBH_4 was added and the solution color changed from colorless to orange. Stirring was stopped and the solution was left undisturbed for 2 h. The resulting spherical gold nanoparticles were 4 nm in diameter and were active for 2–6 h after preparation.

For gold nanorod growth from the seeds, three flasks were labeled A, B, and C. Growth solutions A and B consisted of 9 mL of 0.1 M cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in water (for nanorods with aspect ratio of ~ 20 , heptane was added to make a final heptane concentration of 0.1 M), 0.25 mL of 0.010 M HAuCl_4 trihydrate in water, 50 μL of 0.1 M ascorbic acid, then 50 μL of 0.1 M NaOH (for the production of nanorods with an aspect ratio of ~ 25 the volume of NaOH was doubled to 100 μL). Growth solution C was prepared with 90 mL of 0.1 M CTAB, 2.5 mL of 0.01 M HAuCl_4 , 0.5 mL of 0.1 M ascorbic acid, then 0.5 mL of 0.1 M NaOH .

To grow the gold nanorods, 1.0 mL of the seed solution was added to growth solution A. Growth solution A was shaken for approximately 3–5 s and 1.0 mL of solution A was added into B. Solution B was shaken for ~ 3 –5 s, then all of B was poured into growth solution C. The solution color of C changed from colorless to a reddish brown and was allowed to sit overnight.



En 2004, Sau et al. (équipe Murphy) démontrent qu'en variant les ratios entre les différents composés chimiques traditionnellement utilisés, il est possible d'obtenir des formes diversifiées de nanoparticules d'or :

Table 1. Produced Gold Nanorod Dimensions and Yield, with Corresponding Initial Concentrations of Reactants^a

product		reaction conditions				figure number
dimension ^b (length × width)	yield ^b	[Au ³⁺], M	[Ag ⁺], M	[AA], M	[Au] _{seed} , M	
87 (±17) × 42 (±10)	97 (±3)	4.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	6.4 × 10 ⁻⁴	1.25 × 10 ⁻⁷	2a
64 (±12) × 24 (±6)	97 (±3)	4.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	6.4 × 10 ⁻⁴	2.5 × 10 ⁻⁷	2b
62 (±10) × 23 (±3)	93 (±5)	4.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	6.4 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁷	2c
50 (±5) × 15 (±3)	90 (±5)	4.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	6.4 × 10 ⁻⁴	1.25 × 10 ⁻⁶	2d
475 (±24) × 15 (±2)	55 (±12)	4.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	6.4 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁷	2e
80 (±15) × 40 (±10)	97 (±3)	6.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	9.6 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁷	6a
54 (±10) × 14 (±3)	90 (±5)	3.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	2.4 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁷	6b
22 (±3) × 6 (±2)	88 (±5)	1.0 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁵	1.6 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁷	6c
90 (±11) × 15 (±2)	57 (±14)	4.0 × 10 ⁻⁴		3.0 × 10 ⁻³	5.0 × 10 ⁻⁷	7a
75 (±8) × 10 (±2)	55 (±14)	4.0 × 10 ⁻⁴		3.0 × 10 ⁻³	1.5 × 10 ⁻⁶	7b
50 (±6) × 10 (±2)	55 (±17)	4.0 × 10 ⁻⁴		3.0 × 10 ⁻³	2.5 × 10 ⁻⁶	7c

^a Reactants were added in the order indicated, from left to right. All reactions were run in 5 mL of aqueous 9.5 × 10⁻² M CTAB solutions at room temperature. ^b A total of 600 particles from three identical batches (200 particles from each) were counted to calculate the rod yield, and 150 nanorods from each identical batch were considered to calculate the average rod dimension. Rod yield is given by (number of rods)/(total number of particles) × 100%. The error bars in the dimensions correspond to one standard deviation in each case.

Methods. Preparation of Au Seeds. In a typical procedure, 0.250 mL of an aqueous 0.01 M solution of HAuCl₄·3H₂O was added to 7.5 mL of a 0.10 M CTAB solution in a test tube (glass or plastic). The solutions were gently mixed by the inversion. The solution appeared bright brown-yellow in color. Then, 0.600 mL of an aqueous 0.01 M ice-cold NaBH₄ solution was added all at once, followed by rapid inversion mixing for 2 min. Care should be taken to allow the escape of the evolved gas during mixing. The solution developed a pale brown-yellow color. Then the test tube was kept in a water bath maintained at 25 °C for future use. This seed solution was used 2 h after its preparation and could be used over a period of 1 week. This preparation differs from other seed preparations we have used, in that the CTAB surfactant is present at this stage. We prepared gold seeds at four different CTAB concentrations, namely, 9.5 × 10⁻², 7.5 × 10⁻², 5.0 × 10⁻², and 8.0 × 10⁻³ M. Seeds prepared at 8.0 × 10⁻³ M CTAB produced non-rod-shaped and phi-shaped rod particles.

Preparation of Au Nanorods. Appropriate quantities of CTAB solution, water, HAuCl₄, AgNO₃, AA, and seed solutions were taken one by one in the order given (see Table 1) in a test tube and mixed gently by inversion. When the seed solution was added before AA, the reaction became very slow. Therefore, the seed solution was always added after the addition of AA. For example, in a typical experiment, 4.75 mL of 0.10 M CTAB, 0.200 mL of 0.01 M HAuCl₄·3H₂O, and 0.030 mL of 0.01 M AgNO₃ solutions were added in that order, one by one, to a test tube, followed by gentle mixing by inversion. The solution at this stage appeared bright brown-yellow in color. Then 0.032 mL of 0.10 M AA was added to it. The solution became colorless upon addition and mixing of AA. Finally, 0.010 mL of seed solution was added, and

the reaction mixture was gently mixed for 10 s and left undisturbed for at least 3 h.

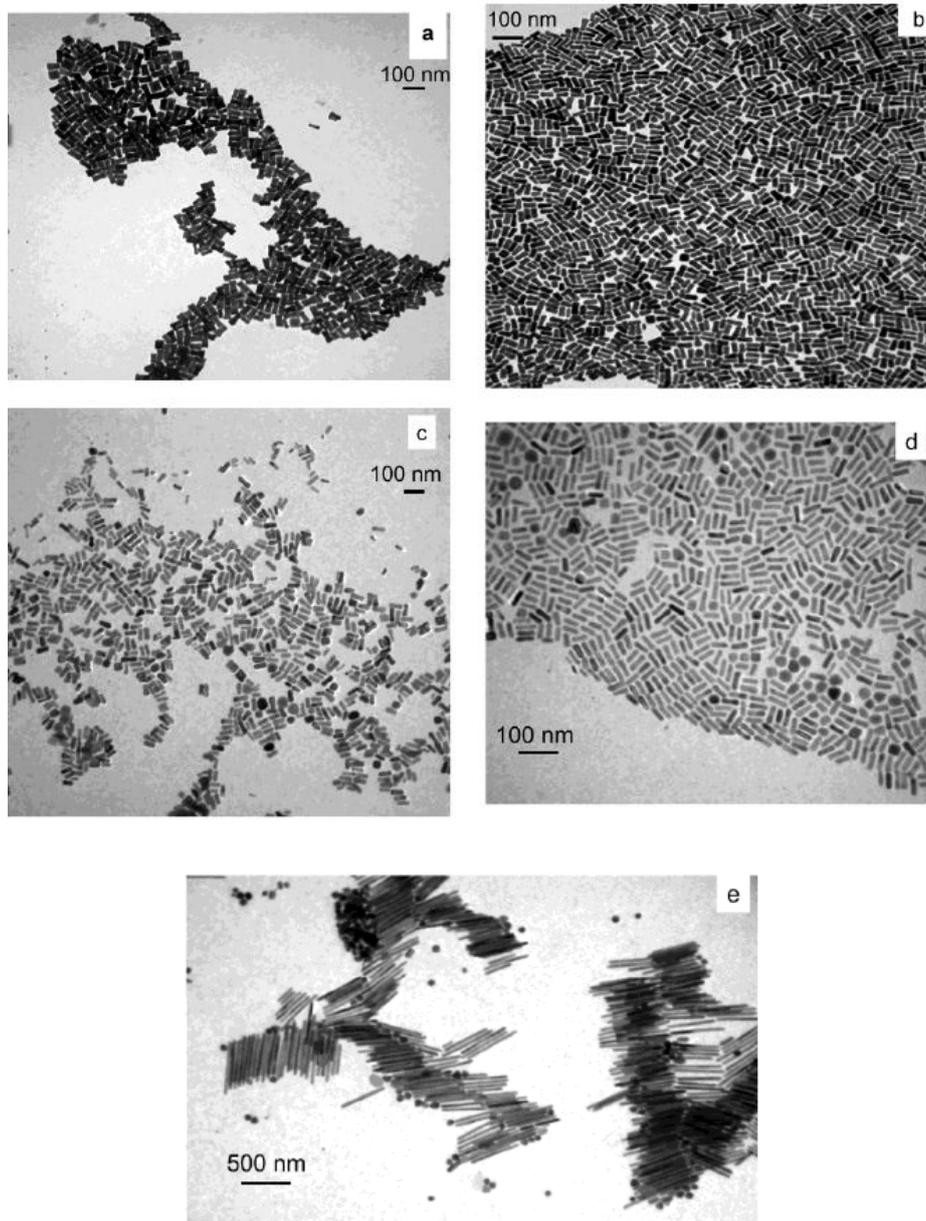


Figure 2. Transmission electron micrographs of dense ensembles of gold nanorods synthesized with different reaction conditions, as a function of seed concentration. $[\text{Au}]_{\text{seed}}$ were (a) 1.25×10^{-7} M, (b) 2.5×10^{-7} M, (c) 5.0×10^{-7} M, and (d) 1.25×10^{-6} M. The Au seed concentration in part e was the same as in part c. In all cases, $[\text{CTAB}] = 9.5 \times 10^{-2}$ M, $[\text{HAuCl}_4] = 4.0 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AgNO}_3] = 6.0 \times 10^{-5}$ M, and $[\text{AA}] = 6.4 \times 10^{-4}$ M, except no silver nitrate was used in part e.

Dans un second article de la même année (Sau et al.), les données sont encore plus complétées :

Supp. Table 1. Shapes of gold particles and corresponding reaction conditions.

[CTAB]/M	[Au] _{seed} /M	[Au ³⁺]/M	[AA]/M	Shape/Profile	Dimension [§]	% Yield
1.6×10^{-2}	1.25×10^{-8}	2.0×10^{-4}	6.0×10^{-3}	Cube	66 nm	~ 85
1.6×10^{-2}	1.25×10^{-8}	2.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}	Hexagon	70 nm	~ 80
1.6×10^{-2}	1.25×10^{-7}	2.0×10^{-4}	6.0×10^{-3}	Triangle	35 nm	~ 80
1.6×10^{-2}	1.25×10^{-8}	4.0×10^{-4}	6.4×10^{-4}	Cube [‡]	90 nm	~ 70
9.5×10^{-2}	1.25×10^{-7}	4.0×10^{-4}	6.0×10^{-3}	Tetrapod [¶]	30 nm	~ 70
1.6×10^{-2}	1.25×10^{-8}	4.0×10^{-4}	1.2×10^{-2}	Star	66 nm	~ 50
5.0×10^{-2}	6.25×10^{-7} ^b	5.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}	Tetrapod	293 nm	~ 75
9.5×10^{-2}	2.5×10^{-7}	4.0×10^{-4}	6.4×10^{-4}	Branched [‡]	174 nm	~ 95

[§]For triangular profile and cubes, this corresponds to edge lengths; for hexagonal profile, this corresponds to the distance between opposite sides; and for tetrapods and branched particles, this corresponds to center-to-tip distances. For cubes, triangles and hexagons, the dimensions are averaged over ~120 particles and are reproducible to within 5% of the given value; for the other shapes, the dimensions are averaged over ~120 particles and are within ~10% of the given value.

[‡] 6.0×10^{-5} M AgNO₃ was used.

^bSeed(5) was used here, otherwise results are reported for seed(1).

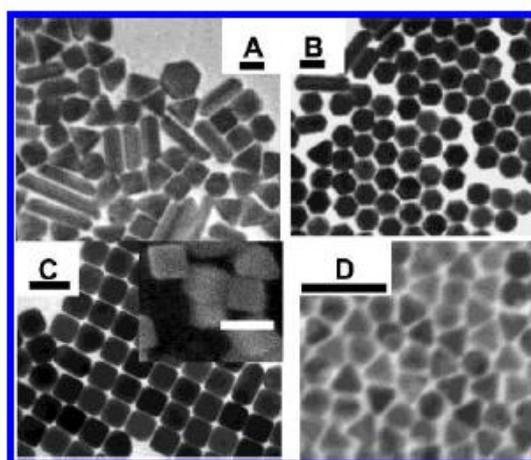


Figure 1. TEM (inset SEM) images of Au nanoparticles synthesized under different conditions. [AA] increases from A to C; and seed concentration increases from C to D. Scale bar = 100 nm. See also SI, Table 1.

En 2006, Wu et al. proposent également une méthode de fabrication de nanofils longs en trois parties, assez similaire à celle proposée par Murphy et al. quelques années auparavant (ici, c'est de l'acide nitrique qui est utilisé en complément des solutions usuelles):

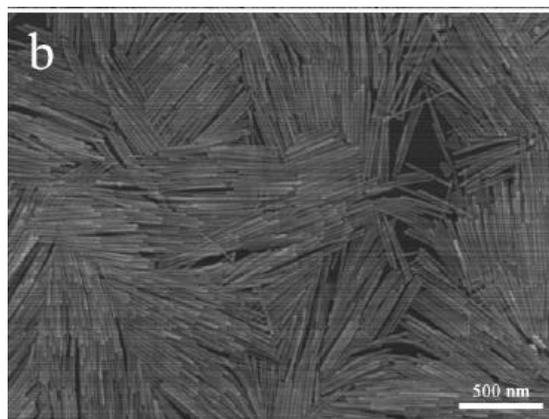
Experimental Section

Preparation of Gold Seeds. A volume of 0.25 mL of 0.01 M HAuCl_4 (Aldrich, $\geq 99.9\%$) and 0.3645 g of CTAB surfactant (Aldrich, $> 99.0\%$) were added to a flask. Deionized water was added to bring the total solution volume to 10 mL. The concentration of CTAB in this solution is 0.1 M. In a separate flask, 10 mL of ice-cold 0.01 M NaBH_4 (Aldrich, 98%) was

prepared. Then 350 μL of the NaBH_4 solution was transferred to the CTAB- HAuCl_4 solution, and the reaction was stirred for 3 min. The initial yellowish solution turned colorless and then faint brown upon the addition of NaBH_4 , indicating the formation of ultra-small gold particles.

Preparation of Growth Solution. A volume of 100 mL of 2.5×10^{-4} M HAuCl_4 aqueous solution was prepared. Then 1×10^{-2} mol of CTAB was added to the solution with stirring until the CTAB powder was completely dissolved.

Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods. Two 25-mL and one 100-mL conical flasks were labeled A, B, and C. In flasks A and B, 25 μL of 0.1 M L(+)-ascorbic acid (Riedel-de-Haën, 99.7%) was added to 4.5 mL of growth solution. In flask C, 250 μL of 0.1 M ascorbic acid and 300 μL of 0.1 M nitric acid were added to 45 mL of growth solution. Next, 400 μL of the gold seed solution was added to the solution in flask A, and the sample was stirred for 3 s. Then 400 μL of the solution in flask A was immediately added to flask B, and the sample was stirred for 5 s. Finally, 4 mL of the solution in flask B was transferred to flask C, and the sample stirred for 5 s. Flask C was left undisturbed in a water bath set at $26-27^\circ\text{C}$ for 12 h for the reaction to go to completion. The top solution contained mostly spherical nanoparticles and was removed, leaving only high aspect ratio nanorods that settled to the bottom of the flask as a precipitate. Then 10 mL of deionized water was added to redisperse the precipitate, and the solution color was brown. The nanorods were concentrated by centrifugation at 2000 rpm for 20 min (Hermle Z323 centrifuge). Again the top solution containing mainly spherical nanoparticles and CTAB surfactant was carefully removed with a pipet. The nanorod precipitate was then withdrawn with a pipet and diluted with deionized water for spectral analysis.



En 2007, Jiang et al. étudient l'influence des solutions de nucléation sur la synthèse de nanofils :

2.2. Synthesis of Au seeds, nanorods, and nanocrystals

2.2.1. Synthesis of Au seeds

In a typical protocol (total volume is 8.65 mL), 1.25 mL of 2.0×10^{-3} M aqueous HAuCl_4 solution is added to 2.74 mL of ultra-pure water in a test tube, followed by the addition of 3.76 mL of 0.20 M aqueous CTAB solution. The color of the mixed solution rapidly changes from light yellow to orange. Finally, 0.9 mL of an aqueous 10^{-2} M ice-cold NaBH_4 solution is added (all at once), followed by shaking the solution vigor-

ously for around 20 s and letting it stand at room temperature without disturbing. Immediately after NaBH_4 addition, the Au seeds solution is divided into three parts with the same volume, the first one, S_{2h} , is aged 2 h whereas the second, S_{10d} , and the third, S_{30d} , are kept for 10 and 30 days, respectively, at room temperature before use. The color of the produced Au-seed solution changes with time from light brown (aging 2 h) to pink (aging 10 days), to violet (aging 30 days).

2.2.2. Synthesis of Au nanorods

The growth solution for nanorods (total volume is 8 mL) contains $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4.0×10^{-4} M), CTAB (9.5×10^{-2} M) and Ag^+ (6.0×10^{-5} M). The molar ratio of reducing reagent—L-ascorbic acid (6.4×10^{-4} M) to $[\text{AuCl}_4^-]$ (4.0×10^{-4} M) is kept at 1.6. Given volumes of the various reactants [1.6 mL (0.002 M) of HAuCl_4 , 2.52 mL H_2O , 3.8 mL (0.2 M) of CTAB, 32 μL (0.015 M) of AgNO_3 , 51.2 μL (0.1 M) of L-ascorbic acid] are successively added to a test tube. In the final step, 34.7 μL of Au seed solution is added to the growth solution and the final ratio of seeds to gold salt concentration ($[\text{AuCl}_4^-]$) is kept at 1/320. The mixed solution is stirred vigorously for 20 s and then left over night. Eight milliliter of the Au nanorods solution is centrifuged for 30 min at a speed of 5000 rpm to precipitate the particles, then the supernatant is removed and the residue redispersed in 3 mL of ultra-pure water and centrifuged again. After a further repetition, the final precipitate is redispersed in a given volume of ultra-pure water to disperse the particles in solution.

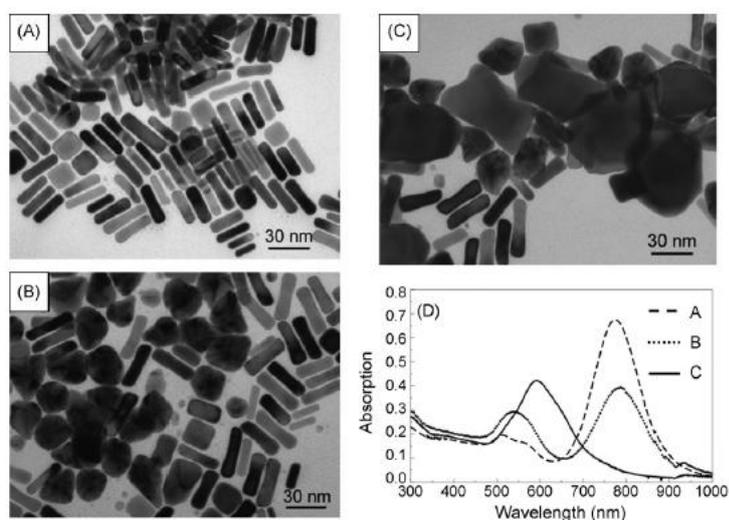


Fig. 2. TEM images (A–C) of Au nanorods synthesized by using the seeds (S_{2h} , S_{10d} , or S_{30d}) shown in Fig. 1A–C, and the UV-spectra corresponding to the Au nanorods: (A) dashed line, (B) dotted line, and (C) solid line.

En 2003, Nikoobakht et al. (équipe Al Sayed) proposent une étude pionnière concernant l'influence du nitrate d'argent sur la croissance de nanofils courts. Ces nanofils sont issus d'une nucléation par particules sphériques stabilisées par du CTAB. L'influence du nitrate d'argent sur les spectres UV-Visibles (et donc la taille) des particules est discutée :

Seed Solution. CTAB solution (5 mL, 0.20 M) was mixed with 5.0 mL of 0.00050 M HAuCl_4 . To the stirred solution, 0.60 mL of ice-cold 0.010 M NaBH_4 was added, which resulted in the formation of a brownish yellow solution. Vigorous stirring of the seed solution was continued for 2 min. After the solution was stirred, it was kept at 25 °C.

Growth of NRs with Plasmon Bands Less Than 850 nm. CTAB (5 mL, 0.20 M) was added to (0.050, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mL) of 0.0040 M AgNO_3 solution at 25 °C. To this solution, 5.0 mL of 0.0010 M HAuCl_4 was added, and after gentle mixing of the solution 70 μL of 0.0788 M ascorbic acid was added. Ascorbic acid as a mild reducing agent changes the growth solution from dark yellow to colorless. It is worth noting that the five growth solutions above are identical except for their silver ion content.

The final step was the addition of 12 μL of the seed solution to the growth solution at 27–30 °C. The color of the solution gradually changed within 10–20 min. For longer NRs, the color change takes place more slowly. The temperature of the growth medium was kept constant at 27–30 °C in all the experiments. This pathway produces pure NR solutions with aspect ratios up to 4.7.

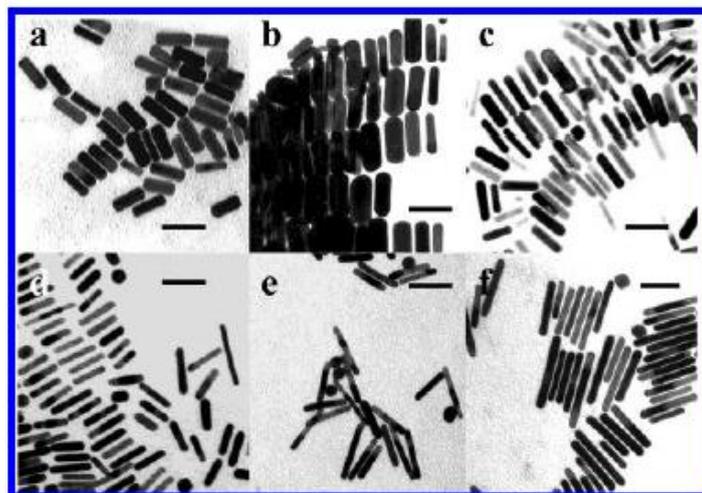


Figure 6. TEM images of gold NRs with plasmon band energies at (a) 700, (b) 760, (c) 790, (d) 880, (e) 1130, and (f) 1250 nm. The scale bar is 50 nm.

En 2005, Liu et al. proposent l'une des premières études concernant l'influence du nitrate d'argent sur la croissance de nanofils courts issus d'une nucléation par particules sphériques stabilisées par du citrate de sodium, et déduisent des paramètres menant à la synthèse de particules bipointes :

Preparation of Gold Seeds. Small gold nanoparticles were prepared as the seeds for the growth of gold nanostructures by reducing HAuCl_4 with NaBH_4 or L-ascorbic acid.

The first type (Type I) was prepared following the method developed by Nikoobakht and El-Sayed.¹⁰ A total of 0.25 mL of 10 mM HAuCl_4 was mixed with 10 mL of a 0.1 M CTAB solution at 30 °C. Next, 0.60 mL of a freshly prepared 10 mM NaBH_4 solution was injected quickly into the solution under vigorous stirring. The gold sol was stirred for at least 5 min for the complete decomposition of excess NaBH_4 .

The second type (Type II) was prepared via the procedure of Jana et al.⁸ To a 20 mL solution containing 0.125 mM HAuCl_4 and 0.25 mM sodium citrate under vigorous stirring, 0.3 mL of 10 mM freshly prepared NaBH_4 solution was added at room temperature. The gold sol was aged at room temperature for at least 2 h before use. UV-vis spectra showed that the characteristic plasmon resonance of gold nanoparticles at 520 nm was damped to various degrees for these two types of gold seeds, indicating that the particles were smaller than 5 nm.

Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods. The original method developed by El-Sayed and co-workers gives nearly quantitative yield of gold nanorods.^{10,22} However, it was observed by us and others that the freshly prepared nanorods can further grow into a dumbbell shape, causing the longitudinal plasmon resonance to blue-shift by up to 100 nm over the first few hours.^{22,26} We found that controlling the pH allowed us to significantly improve the method and product stability. In a typical synthesis, 0.5 mL of 10 mM HAuCl_4 and 0.1 mL of 10 mM AgNO_3 were mixed with 10 mL of a 0.1 M CTAB solution. The solution was then acidified with 0.2 mL of 1.0 M HCl to pH 3~4, followed by the addition of 0.08 mL of 0.1 M L-ascorbic acid, which reduced Au(III) to Au(I). Finally, 24 μL of gold seeds I was injected into the growth solution. The growth reaction was performed at 30 °C under gentle stirring. The reduction ended within 2 h. The effect of AgNO_3 was studied by varying its amount from 0 to 0.1 mL. For the growth from gold seeds II, more seed solution (80 μL) was used because of their larger particle size and therefore lower particle concentration.

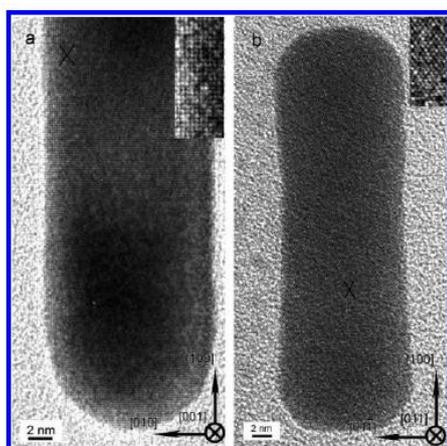


Figure 3. High-resolution TEM images of gold nanorods grown from gold seeds I with silver(I). The nanorods are aligned in [001] (a) and [011] (b) directions. The insets show 2 \times magnifications of the areas labeled by the black crosses. The dimensions of the insets are 2 nm \times 5 nm for panel a and 2 nm \times 4.6 nm for panel b.

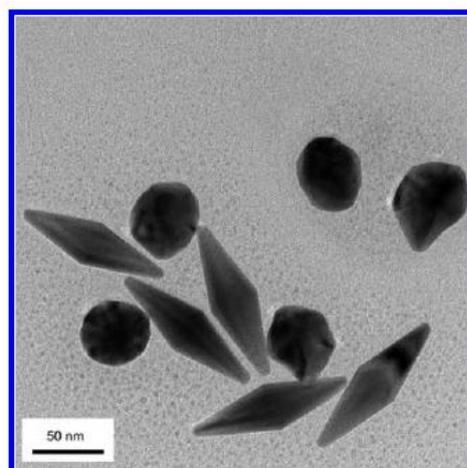


Figure 4. TEM image of gold nanostructures grown from gold seeds II with silver(I).

En 2006, Zijlstra et al. étudient également l'influence du nitrate d'argent sur la synthèse de nanofils. Cet article étudie aussi en parallèle l'influence de la température. Ils proposent également leur procédé de fabrication (la différence notable vient de l'ordre d'ajout des composés, et de la quantité de borohydrure de sodium associée):

Experimental Section

Particle Synthesis. Gold nanorods were prepared using a seedless growth method in aqueous solution, comparable to the method previously reported by Jana et al.¹⁴ A 5 mL aq solution containing CTAB (0.1 M) and HAuCl_4 (0.5 mM) was prepared. Various concentrations of AgNO_3 were added to this solution, depending on the experiment. Au(III) was reduced to Au(I) by adding 30 μL of an ascorbic acid solution (0.1 M) under vigorous stirring. Nucleation and growth were initiated 5 s after adding the ascorbic acid by quickly injecting 2 μL of a NaBH_4 solution (1.6 mM) under vigorous stirring.

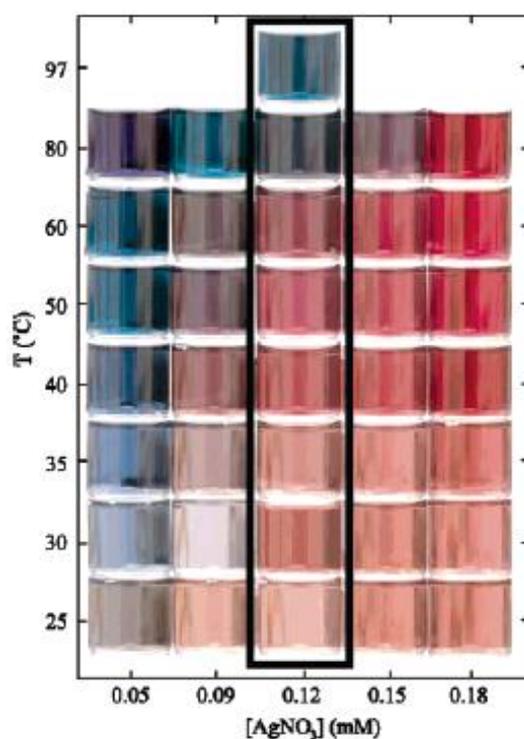


Figure 1. Photographs of reaction products obtained as a function of silver nitrate concentration and temperature. The optimum silver nitrate concentration is highlighted. A blue color indicates formation of short nanorods of aspect ratio ~ 3 , a brownish color is caused by nanorods with aspect ratio $\sim 4-5$, whereas a red color indicates the presence of spheres in the solution.

En 2009, Seo et al. proposent un autre procédé pour obtenir des nanofils et étudient eux aussi l'influence du nitrate d'argent sur les synthèses (la différence notable concerne la concentration en sel d'or dans la solution de croissance):

Experiment

Materials Materials used for this experiment were cetyltrimethylammonium bromide (CTAB 99%), hydrogen tetrachloroaurate (HAuCl_4 98%), sodium borohydride (NaBH_4 98%), silver nitrate (AgNO_3 99%), L-ascorbic acid; distilled water was used for all the solutions, and all glassware was washed with distilled water. Magnetic stirrers and water bath with adjustable temperature were also used.

Gold nanorod synthesis [12] The seed solution was prepared by mixing 5 mL of 0.2 M CTAB solution and 5 mL of 0.5 mM HAuCl_4 . This mixture was then stirred for about 2 min, then 0.6 mL of ice-cold 0.01 M NaBH_4 was added followed by vigorous stirring for 5 min. The resulting solution was then kept at 25 °C. The different growth solutions were prepared by the addition of 5 mL of 0.2 M CTAB and 5 mL of 1 mM HAuCl_4 to (50 μL , 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , and 500 μL) of 4 mM AgNO_3 solutions followed by 70 μL of 0.0788 M ascorbic acid. Of the seed solution, 12 μL was added to the growth solution which was then placed into a water bath to maintain the temperature within the range of 27–30 °C. After 15 min, the solution changed color indicating the synthesis, following which the solution was maintained at room temperature.

En 2006, Grzelczak et al. étudient l'influence de l'iode sur la forme des nanofils courts :

4. Experimental

Gold nanorods were prepared through the well-known seeded growth method [7,8], based on the reduction of HAuCl_4 with ascorbic acid on CTAB-stabilized Au nanoparticle seeds ($<3\text{ nm}$), in the presence of CTAB (0.1 M), HCl (pH 2–3), and AgNO_3 (0.12 mM). Upon synthesis, the gold nanorod solution (10 mL) was centrifuged (8000 rpm, 30 min) to remove excess silver salt, ascorbic acid and HCl, and redispersed in CTAB solution (2 mL, 0.1 M), so that the concentration of the gold nanorods in the seed solution used for further growth was 2.5 mM.

For the growth of gold nanorods in the presence of KI, an appropriate volume of 0.1 M CTAB (calculated for a total volume of 10 mL) was mixed with HAuCl_4 (0.05 mL, 0.05 M) and stored for 5 min at 27 °C to allow for complexation of gold salts, followed by addition of 0.01 M KI (5.7, 50, 120, 300, 550 μL) and ascorbic acid (0.04 mL, 0.1 M). Finally, a gold nanorod seed solution (0.6 mL, 2.5 mM) was added under stirring.

To examine the influence of gold nanorod seed concentration (at constant $[\text{KI}]/[\text{Au}]$ molar ratio), different growth solutions were prepared with identical concentrations of CTAB (0.1 M) and HAuCl_4 (0.25 mM), but different KI concentrations chosen to fit the selected $[\text{KI}]/[\text{Au}]$ molar ratios (3.6 and 0.083). To each of these solutions (10 mL), ascorbic acid (0.04 mL, 0.1 M) was added, followed by different amounts of gold nanorods (1, 0.6, 0.3, 0.1 mL; $[\text{Au}] = 2.5\text{ mM}$).

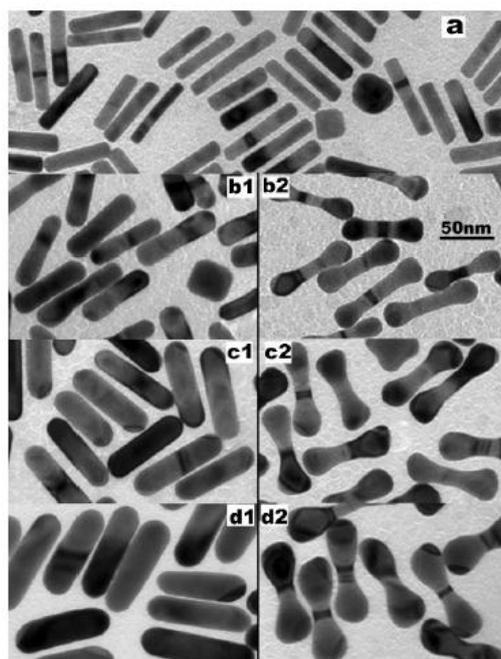


Figure 5. TEM images of nanoparticles resulting from the growth of Au nanorods for two $[\text{KI}]/[\text{Au}]$ ratios: 3.6 (left) and 0.083 (right). The relative amount of seeds employed for the growth decreases from top to bottom, so that larger particles are obtained.

En 2010, Guo et al. proposent une méthode permettant d'obtenir des nanotriangle

2.2. Synthesis of gold seeds

Gold seeds were synthesized by reducing 0.4 mL of 25 mM HAuCl_4 with 1 mL of ice-cold 0.1 M NaBH_4 with vigorously stirring. The reduction was done in the presence of 1 mL of 10 mM sodium citrate and 37.6 mL of water. Upon addition of the NaBH_4 , the solution turned a reddish orange color, indicating the generation of gold nanoparticles. The resulting solution was continually stirred for 2 min. The seed solution was allowed to stand for at least 2 h to ensure the complete hydrolysis of unreacted NaBH_4 . The gold seeds exhibited a SPR peak at 507 nm, and had an average diameter of less than 5.0 nm (see Supporting information).

2.3. Growth and achievement of gold nanoprisms with high-purity

An initial reaction mixture of gold nanoprisms was prepared by a one-step seed-mediated, iodide ion- and CTABr-assisted approach with new modifications [21,22]. Typically, a 100 mL of growth solution containing 0.25 mM HAuCl_4 and 0.05 M CTABr was prepared in a 150 mL beaker. To this solution was added 55 μl of 0.1 M KI,

0.55 mL of 0.1 M AA and 0.55 mL of 0.1 M NaOH (NaOH is used to deprotonate ascorbic acid for more effective reducibility) in turn and the resulting solution as growth solution was stirred gently. The orange color of the gold salt in the CTABr solution disappeared when AA was added, due to the reduction of Au^{3+} to Au^+ . The growth of gold nanoprisms was initiated by adding 0.1 mL of the seed solution to the growth solution. After the addition, the color of the growth solution changed from clear to light red, and then turned to deep claret-red over a period of 30 min. The reaction solution was kept at 30 °C and left undisturbed during the whole aging period. There were two ways for achieving high-purity colloidal gold nanoprisms: when the concentration of CTABr was greater than or equal to 0.05 M, the reaction mixture was aged without disturbance for 24 h; when the concentration of CTABr was lesser than 0.05 M, the reaction mixture was aged for 12 h, followed by adding NaCl until the sum of $[\text{Cl}^-]$ and $[\text{Br}^-]$ reached 0.2 M. After this, the reaction mixture was aged for another 12 h. Most of gold nanoprisms deposited on the bottom of the beaker during the aging period, and were easily collected by pouring out the supernatant. These gold products were redispersed to the colloidal solution for further characterization.

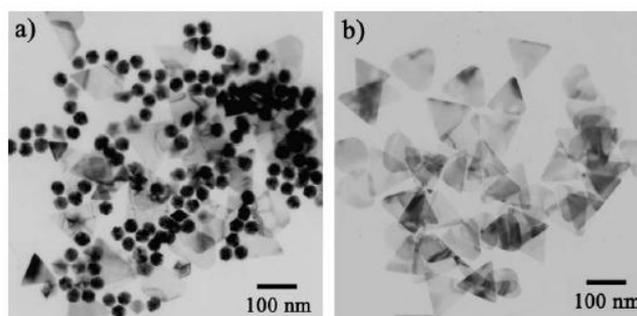
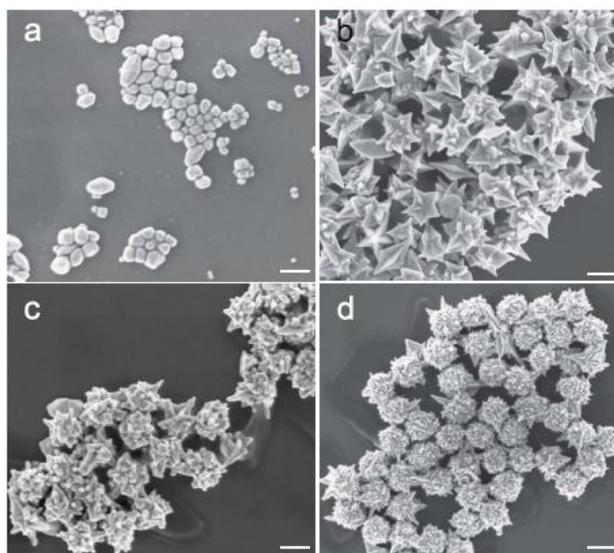


Fig. 5. TEM images of: (a) reaction mixtures consist of spherical gold nanoparticles and gold triangular nanoprisms and (b) redispersed gold triangular nanoprisms. Initial $[\text{CTABr}]$ is 0.0125 M.

En 2010, Ahmed et al. proposent une méthode de fabrication de particules possédant de multiples aspérités (type « dendrites ») :

The previously reported protocol for seeded preparation of gold nanorods [22] was modified for the synthesis of MBNPs. Briefly, for preparation of seeds, HAuCl_4 ($50 \mu\text{l}$, 0.1 M) and sodium citrate ($50 \mu\text{l}$, 0.1 M) were added to Millipore water (18 ml). Then ice cold NaBH_4 (0.6 ml , 0.1 M) was added and the solution was left to rest for 3 h . The seed diameter is around 3 nm [23].

For the preparation of growth solution, HAuCl_4 ($250 \mu\text{l}$, 0.1 M) was added to CTAB solution (10 ml , 0.1 M), followed by addition of AgNO_3 ($50 \mu\text{l}$, 0.1 M). Subsequently, aqueous solutions of ascorbic acid (AA; concentration varying from 2.5 to 40 mM) were added. Finally, $1 \mu\text{l}$ of the seed solution was added, and the mixture was left to rest overnight at 26°C . The solution was centrifuged twice at 7000 revolutions per minute, after which the precipitant was redispersed in purified water.



Annexe 10

➤ Influences des composés chimiques lors de la synthèse de particules d'or

❖ Rôle du composé chimique H₂AuCl₄

- ✓ Gravure de l'or métallique par eau régale (mélange HCl/HNO₃) :

Cette technique nous a été utile afin de pouvoir doser nos solutions à l'ICP-AES

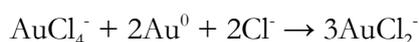
- ✓ Intéraction entre les sels d'or et l'iode (I₂) :

Cette dernière technique de gravure mérite d'être mentionnée car des impuretés iodées potentiellement contenues dans le composé chimique CTAB lors de nos synthèses peuvent mener à l'échec de ces dernières.

Les ions or existent sous plusieurs formes, parmi lesquelles les ions Au(I) et Au(III), qui font partie de la classe B de la classification périodique. Cela signifie que la stabilité des complexes qu'ils forment en solution tend à décroître lorsque l'électronégativité du ligand donneur augmente. On a donc une stabilité qui suit l'ordre suivant : I⁻ > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻.

- ✓ Intéraction entre les sels d'or et l'or métallique :

Il a été observé²³² que les ions AuCl₄⁻ sont agressifs envers les particules d'or métalliques, selon la réaction suivante :



C'est pourquoi l'utilisation de stabilisants (surfactants, polymères, thioalcanes....) est indispensable lors des synthèses.

Les potentiels de réduction connus de l'or dans l'eau sont les suivants :

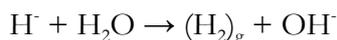
Au³⁺ / Au⁺	
$\text{Au}^{3+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Au}^+$	$E^0 = 1,40 \text{ V}$
$\text{AuCl}_4^- + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{AuCl}_2^- + 2\text{Cl}^-$	$E^0 = 0,926 \text{ V}$
$\text{AuBr}_4^- + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{AuBr}_2^- + 2\text{Br}^-$	$E^0 = 0,802 \text{ V}$
Au⁺ / Au⁰	
$\text{Au}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Au}^0$	$E^0 = 1,71 \text{ V}$
$\text{AuCl}_2^- + \text{e}^- \leftrightarrow \text{Au} + 2\text{Cl}^-$	$E^0 = 1,154 \text{ V}$
$\text{AuBr}_2^- + \text{e}^- \leftrightarrow \text{Au}^0 + 2\text{Br}^-$	$E^0 = 0,959 \text{ V}$

❖ Rôle des agents réducteurs

Lorsque le sel d'or est employé pour créer une solution colloïdale, il doit être réduit par un agent réducteur.

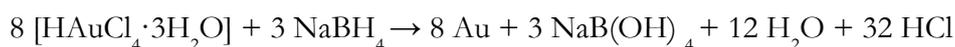
i. Cas du borohydrure de sodium NaBH_4

Il s'agit d'un réducteur fort très employé pour les synthèses de solutions de nucléation. Cependant, les hydrures ioniques sont des bases fortes. Ils sont donc détruits au contact de l'eau, via la réaction acido-basique suivante:



Cette réaction est exothermique et dégage du dihydrogène. C'est pourquoi il faut préparer les solutions de NaBH_4 quelques secondes avant leur utilisation, en utilisant un bain de glace. Par ailleurs, le contrôle exercé sur la forme des nanoparticules est difficile, étant donné la nature vélocité de la réaction.

La réaction avec le sel d'or a pour équation :



Le rôle du borohydrure de sodium a été étudié de près par Samal *et al.* en 2010²³³.

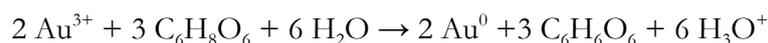
ii. Cas de l'acide ascorbique :

Toujours ajouté après le surfactant ou le polymère qui va déterminer la forme finale des particules, l'acide ascorbique agit selon les équations suivantes :

- En cas d'action conjointe avec le surfactant CTAB, dont le rôle sera discuté par la suite²³⁴ :

$\text{Au}^{3+} / \text{Au}^+$
(réaction confinée dans les micelles de CTAB)
$\text{CTA—AuBr}_4 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \rightarrow \text{CTA—AuBr}_2 + \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 + 2\text{H}^+ + 2\text{Br}^-$
$\text{Au}^+ / \text{Au}^0$
(réaction qui ne débute qu'après l'ajout de solution de nucléation)
$2 \text{CTA—AuBr}_2 + \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 \rightarrow 2\text{Au} + \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 + 2\text{CTA}^+ + 2\text{H}^+ + 4\text{Br}^-$

- Pour le polymère PolyVinylPyrrolidone (PVP)²³⁵ on a:



Durant cette réaction, le pH de la solution a tendance à diminuer, à cause du relargage de protons. Cela interdit toute interaction croisée avec le nitrate d'argent, car sa réduction en particules métalliques ne peut avoir lieu qu'en milieu basique²³⁶.

En outre, cet acide faible permet un contrôle plus fin de la morphologie des nanoparticules, puisque la réduction qu'il provoque est plus lente que celle occasionnée par le NaBH_4 .

iii. Agents réducteurs « exotiques »

➤ Buffer HEPES (production de nanodendrites):

Le buffer HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) fait partie de la catégorie des solutions tampons décrites par Good en 1966. Son pKa est de 7,55 à 20°C. Ces solutions tampons peuvent réduire les ions auriques en formant des composés intermédiaires, des radicaux libres cationiques N-centrés^{237,238}. Le mécanisme d'action est décrit en figure A-21 :

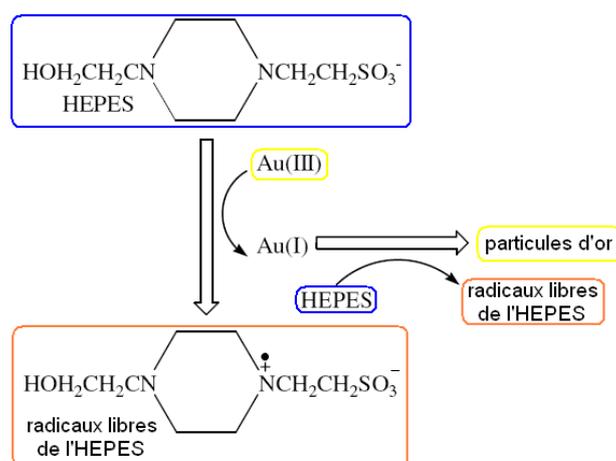


Fig A-21 : Mécanisme d'action du buffer HEPES lors de la synthèse de nanoparticules d'or.

Naturellement biocompatible, le tampon HEPES est un milieu de choix pour synthétiser des nanoparticules d'or, seul²³⁹ ou combiné avec un surfactant ou un polymère²⁴⁰.

➤ Citronnelle (production de microtriangles):

L'usage d'extraits de plantes comme agent réducteur de sels métalliques peut sembler très exotique. Cependant, cette méthode est à la fois très efficace, et écologique. Elle permet également de produire des formes de particules variées²⁴¹.

Son seul inconvénient réside dans la difficulté qui existe à déterminer quel composé (ou combinaison de composés) présent dans l'extrait donne aux particules leur forme finale. En effet, lorsque l'on considère la famille des citronnelles, chaque espèce possède une combinaison de composé qui lui est propre²⁴², et peut donner naissance à des formes similaires ou non de particules. Une inconnue encore plus grande réside dans la composition finale de la couche de fonctionnalisation des particules.

Les articles qui traitent du sujet utilisent cependant très fréquemment deux espèces de citronnelle : *Cymbopogon citratus* (particules sphériques), et *Cymbopogon Flexuosus*^{243,244} (particules triangulaires).

❖ Rôle des agents stabilisants

i. Cas du citrate de sodium :

Il s'agit à la fois d'un agent stabilisant, mais aussi d'un réducteur doux, contrairement au NaBH_4 . Il conduit à la formation des particules dont la charge de surface est globalement négative. Ce composé possède aussi une qualité de choix, puisqu'il agit comme solution tampon pour réguler le pH de la solution.



Les différentes étapes possibles dans la réaction sont données ci-dessous :

1. $\text{HAuCl}_4 + \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \xrightarrow{-\text{NaCl}} \text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 + \text{AuCl}_3$
2. $\text{HAuCl}_4 + \text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \xrightarrow{-\text{NaCl}} \text{NaC}_6\text{H}_6\text{O}_7-\text{AuCl}_2$
3. $\text{NaC}_6\text{H}_6\text{O}_7-\text{AuCl}_2 + \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \xrightarrow{-\text{NaCl}} \text{CO}_2 + \text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 + \text{NaC}_5\text{H}_5\text{O}_5 + \text{AuCl}$
4. $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 + \text{AuCl} \xrightarrow{-\text{NaCl}} \text{NaC}_6\text{H}_6\text{O}_7-\text{Au}$
5. $2 \text{NaC}_6\text{H}_6\text{O}_7-\text{Au} \xrightarrow[\text{disproportion}]{\text{radical}} \text{H}_2 + 2 \text{Au}^0 + 2 \text{CO}_2 + 2 \text{NaC}_5\text{H}_5\text{O}_5$

ii. Cas du bromure de cetyltriméthylammonium :

Lorsque le CTAB est utilisé pour produire des solutions de nucléation, l'aspect final des nuclei d'or formés est tel qu'il existe un noyau d'or métallique entouré d'une première couche d'ions AuCl_2^- et/ou AuBr_2^- , puis d'une seconde couche due aux chaînes alcanes du CTAB (figure A-22).

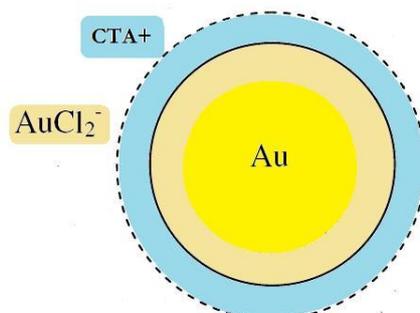


Fig A-22 : Aspect schématique des nuclei d'or.

Les nanofils d'or sont, eux, recouverts d'une bicouche, comme le montre la figure A-23 ci-dessous. Nous verrons par la suite les différentes explications de ce phénomène.

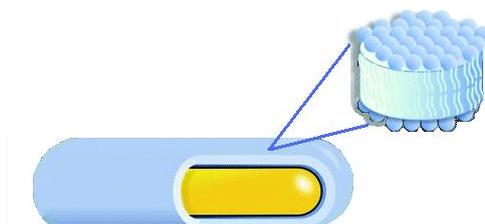


Fig A-23 : Aspect schématique d'une bicouche de CTAB recouvrant un nanofil d'or.

La polémique concernant la potentielle « contamination » des lots de CTAB des fournisseurs par des impuretés, et notamment de l'iode²⁴⁵⁻²⁴⁶⁻²⁴⁷⁻²⁴⁸ nous a directement concerné. Nous avons personnellement rencontré ces difficultés de reproductibilité expérimentale de nos synthèses lorsque nous avons changé de lot de CTAB, une fois le premier complètement épuisé.

Les études qui plaident en faveur d'un effet néfaste de l'iode avancent des arguments d'autant plus plausibles lorsque l'on considère les méthodes usuelles de gravure de l'or métallique évoquées auparavant.

Les mécanismes d'action du CTAB dans les synthèses sont liés à plusieurs données de base :

✓ Paramètre d'empilement $p = V/(A*L)$ compris entre $1/3$ et $1/2$ (figure A-24) :

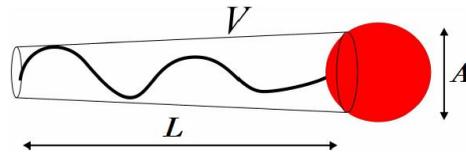


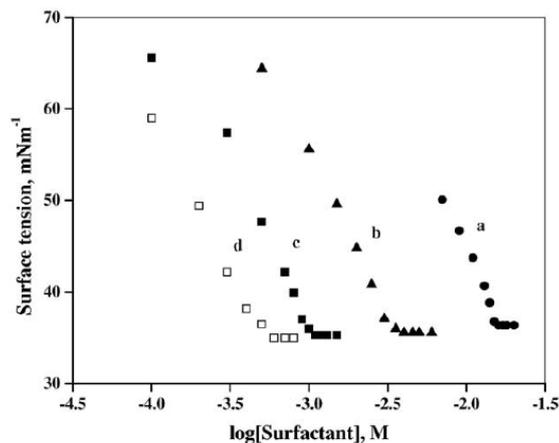
Fig A-24 : Description des paramètres de la molécule de CTAB permettant de définir le paramètre d'empilement p .

V est le volume de la partie hydrophobe du tensioactif, A la surface effective par tête polaire (tenant compte des interactions entre tensioactifs), et L la longueur de la chaîne hydrocarbonée en configuration étendue. On détermine ces valeurs par les équations suivantes²⁴⁹ :

- $L = 1,5 + 1,265*n$, où n est le nombre de carbones de la chaîne,
- $V = m (27,4 + 26,9*n)$, où m est le nombre de chaînes hydrocarbonées dans la molécule (ici $m=1$),
- $A = 1/(\Gamma_s*N_a)$, où N_a est le nombre d'Avogadro, et

$\Gamma_s = -\frac{1}{2RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln C} \right)$, où $\left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln C} \right)$ est la pente de la courbe avant la cassure donnant la concentration micellaire critique CMC (dont la valeur est de 0,95 mM pour le CTAB).

On peut estimer cette CMC à partir de courbes expérimentales telles que celles présentées en figure A-25 :



Surface active behavior of different surfactants in water at 303.15 K:
(a) DTAB, (b) TTAB, (c) CTAB and (d) OTAB.

Fig A-25 : Courbes permettant d'estimer les valeurs de CMC pour différents surfactants²⁵⁰.

On a donc ici les valeurs suivantes, spécifiques au CTAB :

L (Å)	V(Å ³)	A(Å ²)	p
21,74	457,8	≈50	0,42

Ce comportement en solution avait déjà été prédit en 1984 par Candau *et al.*²⁵¹

Le calcul reste assez grossier, et d'autres articles de la littérature donnent des valeurs qui font aboutir à des micelles sphériques. Néanmoins, il faut considérer que la zone d'existence des micelles sphériques est assez étroite.

Enfin, la variation de la CMC1 en fonction de la température est donnée par le graphique suivant (figure A-26, Modaressi *et al.*, 2007²⁵²) :

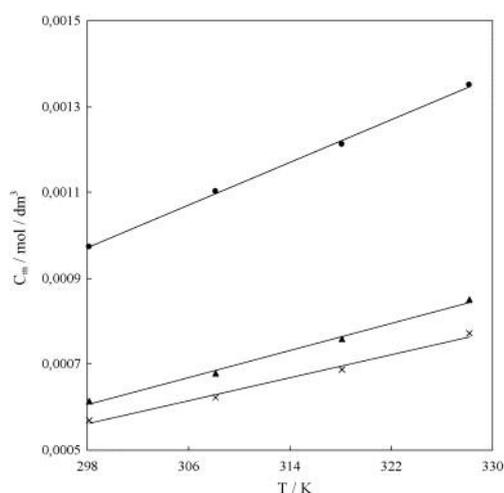


Fig A-26 : Variation de la CMC1 du CTAB en fonction de la température du milieu ²⁶².

✓ Interaction avec le sel d'or H₂AuCl₄:

Le CTAB intervient pour stabiliser les solutions de croissance des particules d'or.

Lorsque les ions AuCl₄⁻ sont mis en solution avec le CTAB, ils peuvent former deux types de complexes [AuCl₄⁻—CTA⁺], ou [AuBr₄⁻—CTA⁺], ce dernier étant légèrement plus stable. On notera génériquement ces complexes sous la forme [AuX₄⁻—CTA⁺].

Il y a précipitation de ces complexes si le ratio (AuX₄⁻:CTAB) est inférieur à (1:10), tandis que la solubilisation complète se produit aux alentours du ratio (1:60)²⁵³.

L'acide ascorbique qui sert de réducteur dans la suite de la synthèse, ainsi que l'ajout de solution de nucléation, font évoluer ces complexes vers la forme $[\text{AuX}_2^- \text{---CTAB}]$, puis vers l'or métallique Au^0 .

✓ Interaction avec le nitrate d'argent AgNO_3 :

- Dépôt sous potentiel (ou encore « dépôt sous-nernstien») :

Ce dépôt ne peut se produire que si le travail de sortie de l'élément à déposer est inférieur à l'élément qui doit recevoir la couche étrangère. La différence Δ des travaux de sortie est donc positive. Il est à noter que le travail de sortie d'un élément cristallin dépend de son orientation. L'argent et l'or sont dans ce cas :

Elément	Travail de sortie (T_s)	Face (100)	Face (110)	Face (111)
Ag	4,52 à 4,74	4.64	4.52	4.74
Au	5,1 à 5,47	5,47	5,37	5,31
$\Delta = T_s(\text{Au}) - T_s(\text{Ag})$		0,83	0,85	0,57

Le travail de sortie est l'énergie minimum en électron-volts nécessaire pour arracher un électron depuis le niveau de Fermi d'un métal jusqu'à un point situé à l'infini en dehors de ce dernier. La différence entre les travaux de sortie permet de classer les faces par ordre de facilité de déposition. Plus la différence est élevée, plus il est facile de déposer un métal sur l'autre. Ainsi, pour le dépôt en sous potentiel de l'argent sur l'or, ce sont les faces (110) qui sont les plus favorisées, suivie de la face (100) et enfin (111).

Ensuite, les faces privilégiées pour le dépôt d'argent le sont encore plus lorsque l'on connaît le comportement du CTAB face aux particules d'or. En effet, son adsorption est favorisée sur les faces (110) et (100) de l'or, en raison d'un bon accord entre la taille de sa tête polaire et l'espacement des sites de liaisons disponibles sur ces faces²⁵⁴.

Enfin, les particules anisotropiques peuvent être décrites cristallographiquement de la façon suivante (figure A-27)²⁵⁵ :

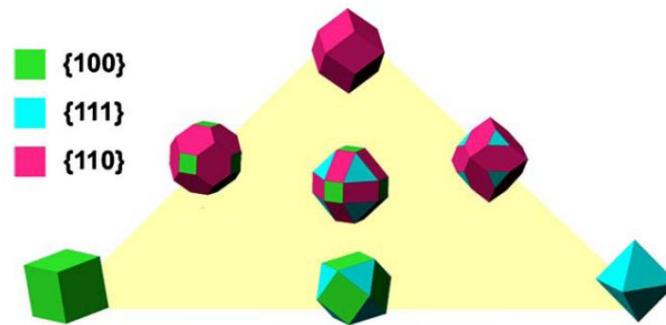


Fig A-27 : Schéma décrivant les facettes cristallographiques des particules d'or anisotropiques ²⁶⁵

Les nanofils ont eux un aspect cristallographique qui dépend du type de solution de nucléation employée (figure A-28):

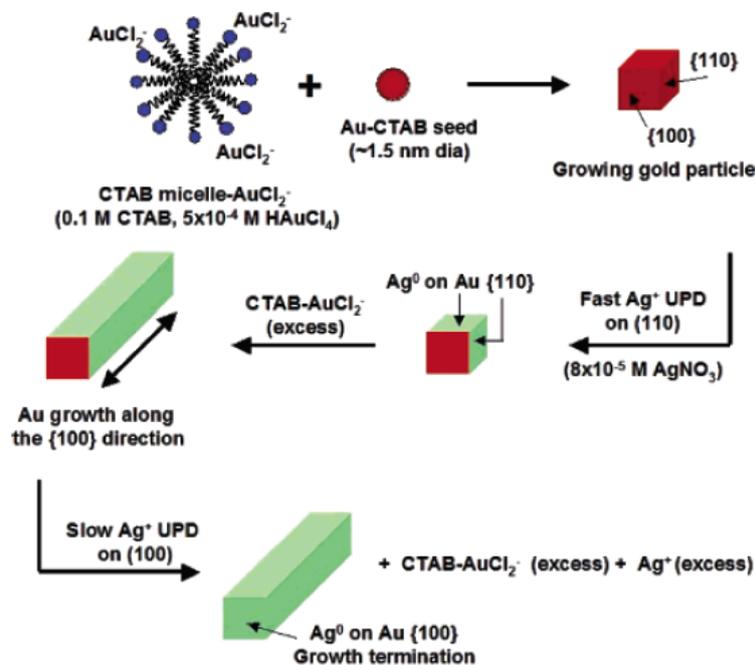


Fig A-28 : Influence des ions argent sur la croissance et la cristallographie des nanofils d'or ¹⁸⁷.

- Dépôt de bromure d'argent à la surface des particules d'or :

La plupart des études postulant l'existence des complexes $[\text{AuCl}_4^- - \text{CTA}^+]$ et $[\text{AuCl}_2^- - \text{CTA}^+]$ évoquent la formation de bromure d'argent AgBr . Ce composé s'adsorberait sur les faces (100) et (110) des particules selon un mode d'action assez similaire à celui du dépôt sous potentiel d'argent métallique, et faciliterait la croissance des nanofils ²⁵⁶. Les deux processus (dépôt d' Ag^0 et formation d' AgBr) pourraient même coexister. La gestion des concentrations restant le levier de contrôle des phénomènes ²⁵⁷⁻²⁵⁸.

❖ Concentration et purification des échantillons

i. Démarche

✓ Coefficient de partage P :

Le LogP (figure A-29) est égal au rapport des concentrations du soluté dans les deux phases (concentration en phase aqueuse C et en phase organique C'). Le logarithme associé à ce coefficient de partage permet d'évaluer la lyophilie du composé. En effet, lorsque (LogP > 0) le composé est lipophile, tandis que si (LogP < 0) le composé est hydrophile.

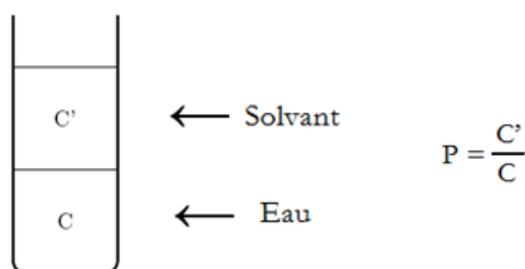


Fig A-29 : Description du coefficient de partage P d'un composé chimique.

ii. Cas du CTAB, en amont de la fonctionnalisation

La majorité des données liées à la synthèse des nanoparticules d'or concerne l'utilisation du CTAB comme molécule stabilisante.

La concentration préconisée par les articles de référence de la littérature est de 350mg/100ml. Après avoir effectué de nombreux tests en faisant varier exclusivement le paramètre « concentration en CTAB », nous avons choisi d'augmenter cette valeur à 450mg/100ml (voir illustration page 129, fig 3-41f).

La solubilité du surfactant et son comportement dans des mélanges [eau-(solvant polaire)] ou [eau-(solvant apolaire)] est une donnée clé. Par ailleurs, le CTAB cristallise dans l'eau lorsque la température de l'échantillon est inférieure à 24°C. On peut donc filtrer la solution pour enlever une première masse non négligeable de surfactant. Par la suite, le choix du solvant d'extraction doit être fait avec soin.

Purification, concentration et fonctionnalisation par phospholipides :

Cette voie de purification des échantillons consiste à utiliser un mélange chloroforme/phosphatidylcholine, afin d'effectuer un échange de ligands à la surface des particules d'or.

Le chloroforme a une densité de 1,483 g/ml, un LogP de 1,97 et une solubilité dans l'eau de 0,8g/100ml. Il solubilise le CTAB par formation de micelles mixtes avec la phosphatidylcholine. La solubilité maximale de la phosphatidylcholine (seule) dans le chloroforme est de 100 mg/ml.

La phosphatidylcholine (figure A-30) possède une structure très proche du CTAB, avec une extrémité similaire, sous forme d'un cation ammonium quaternaire, chargé de manière permanente.

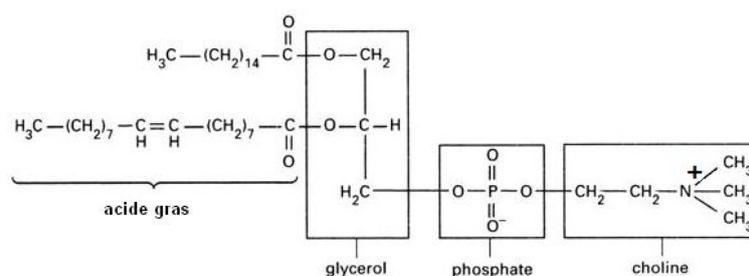


Fig A-30 : Molécule de Phosphatidylcholine.

Une fois fonctionnalisées, les particules peuvent être récupérées et concentrées à l'aide d'une ampoule à décanter. Cependant, elles sont dans un mélange (solvant/eau), qu'il faut purifier à l'évaporateur rotatif. On peut aussi obtenir une réversibilité complète entre solubilité dans l'eau et solubilité dans le chloroforme, mais les contraintes d'élimination complète de l'une des phases sont plus exigeantes²⁵⁹.

iii. Fonctionnalisation des échantillons

La couche de fonctionnalisation doit être efficace pour limiter l'agrégation, tout en restant biocompatible, afin que les particules d'or ne soient pas immédiatement toxiques²⁶⁰.

➤ Composés thiolés :

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une unique fonction thiol :

Nous avons utilisé cette méthode. Une extraction par agitation avec barreau magnétique est réalisée, puis le volume du solvant peut être réduit à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse peut être légèrement basifiée (pH=8,5 au maximum) par ajout de NaOH pour faciliter la réaction, ou il est possible d'ajouter de l'acétone, afin de réduire la tension de surface entre le milieu aqueux et le milieu organique.

- ✓ Chaînes aliphatiques possédant une fonction thiol à une extrémité, et une fonction amine ou acide carboxylique à l'autre extrémité :

Ici aussi l'ajout de NaOH facilite la réaction. On peut ensuite effectuer une concentration des particules par l'ajout de quantités successives de chlorure de sodium à la solution, jusqu'au point de flocculation. Une centrifugation lente (2000 RPM, 60 sec) permet de récupérer les particules sans mener à une agrégation irréversible, et les particules peuvent être re-suspendues dans un volume d'eau plus faible.

❖ Contrôle par Microscopie électronique à Balayage

Les images de nos particules ont été prises au microscope électronique à balayage, après évaporation des gouttes de solution sur des wafers de silicium. Fréquemment, il a fallu se contenter d'imager le bord des gouttes comme le montre la figure A-31 suivante.



Fig A-31 : Image MEB du bord d'une goutte de solution séchée sur un wafer de silicium.

En effet l'intérieur séché des gouttes contenait souvent des résidus carbonés qui parasitaient l'imagerie en MEB (figure A-32), et ce malgré des centrifugations et lavages successifs des échantillons.



Fig A-32 : Aspect des gouttes séchées sur wafer de silicium. La couleur blanchâtre est due aux résidus carbonés de CTAB.

L'observation des arrangements de particules selon les prédictions de la théorie des cristaux liquides (figure A-33 ci-dessous²⁶¹) a été possible dans la majorité des cas. Quelques exemples sont présentés ci-dessous (figures A-34 à A-36).

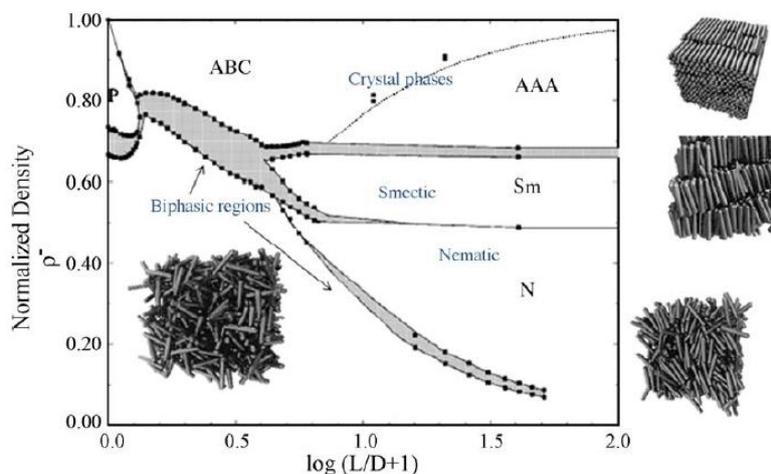


Fig A-33 : Phases d'orientation des cristaux liquides (Extrait de l'article de Sharma *et al.*²⁷¹).

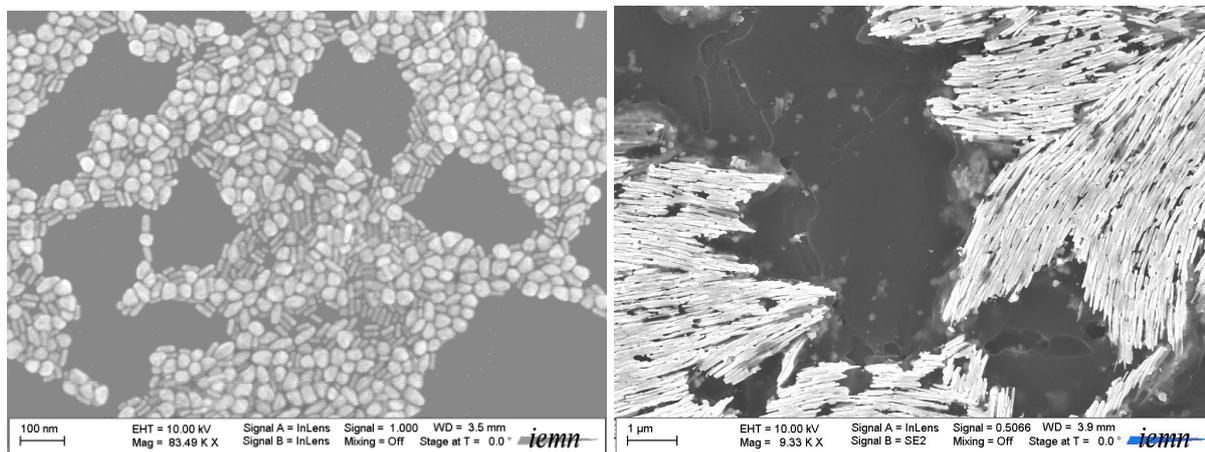


Fig A-34 : Particules d'or issues de nos synthèses : à gauche : réseau cellulaire, à droite : phase nématique.

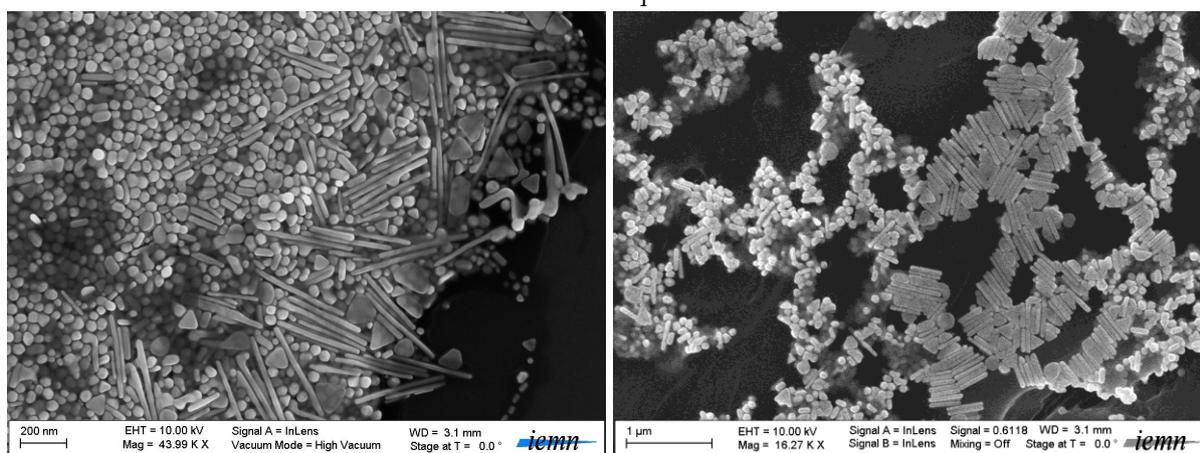


Fig A-35 : Séparation naturelle de formes, les nanofils sont en phase isotropique.

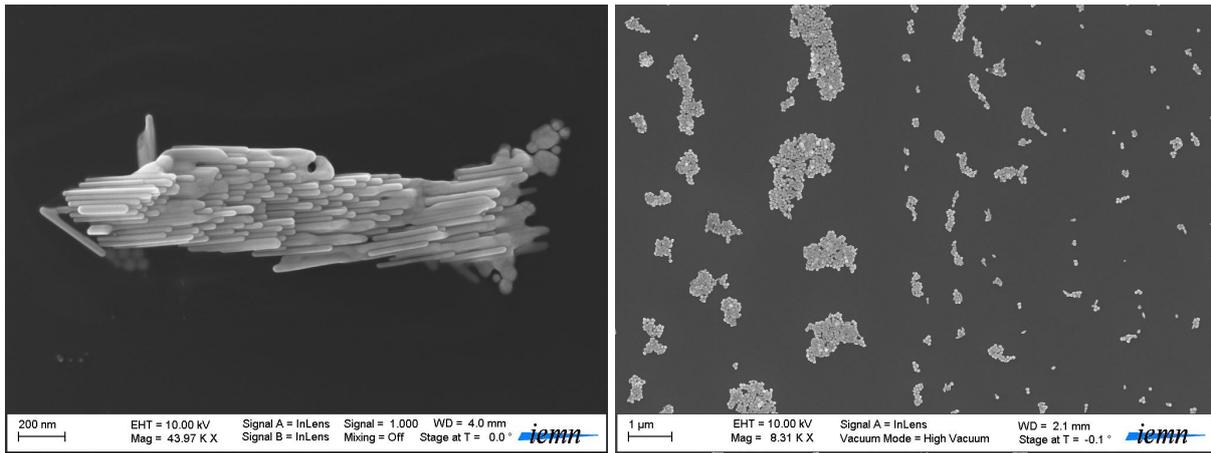


Fig A-36 : A gauche, phase smectique/cristalline, à droite : évaporation à vitesse non constante

Annexe 11

➤ Principe de fonctionnement, reconstruction et analyse d'une image scanner

Schématiquement (figure A-37), un équipement scanner est constitué de deux éléments : une source de rayons X et un détecteur. Ceux-ci sont placés l'un en face de l'autre, et de part et d'autre de l'objet à imager. Les photons, émis par la source, qui n'interagissent pas avec la matière, atteignent directement le détecteur.

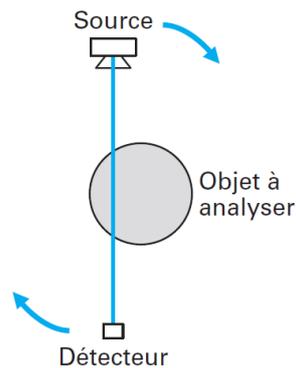


Fig A-37 : Schéma de principe d'un équipement scanner.

Lors de l'acquisition d'un scanogramme, les deux composants du système effectuent une rotation autour de l'objet, et en acquièrent de multiples images 2D sous différents angles (on nomme ces images « projections »). Ces projections P (figure A-38) sont gérées informatiquement (on parle de « Computed Tomography »), afin de « reconstruire » une image 3D :

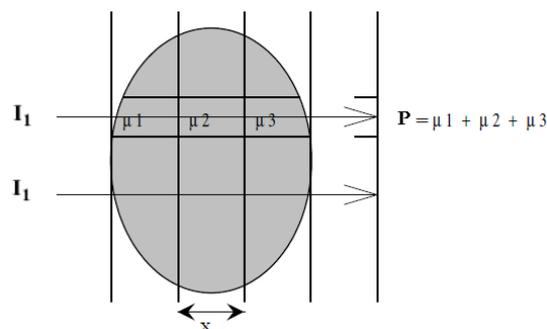


Fig A-38 : Principe de calcul des projections scanner.

L'idée de base du processus de reconstruction est au départ assez simple : une fois toutes les projections enregistrées, on peut remonter aux coefficients μ en inversant un système d'équations simples (figure A-39):

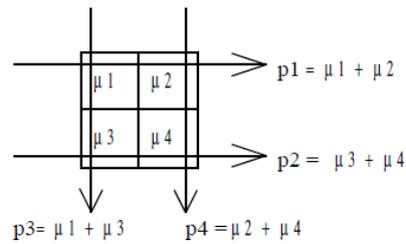


Fig A-39 : Matrice des coefficients μ , matrice des projections.

Cependant, les difficultés arrivent très vite, pour deux raisons pratiques :

- le nombre de projections nécessaires à la reconstitution d'une image 3D est très élevé, ce qui amène à un temps de calcul informatique très lent ;
- les angles selon lesquels sont prises les projections induisent des difficultés et des erreurs (par nécessité d'approximation) dans l'établissement du système d'équations (figure A-40) :

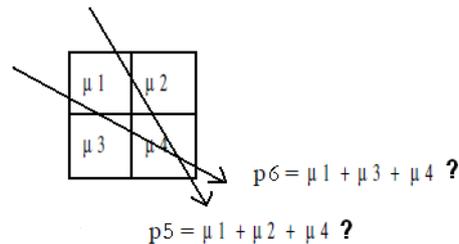


Fig A-40 : Difficultés d'évaluation des valeurs des projections dues aux angles de prise de vue.

Pour remédier à ce dernier point, la « technique de reconstruction algébrique » (ART) a tout d'abord été mise en place. Elle consiste à estimer, non plus à la toute fin, mais après chaque enregistrement d'une projection P , les valeurs μ des couches traversées. Cependant, ce système de boucle est infini et ne parviendra jamais à reconstituer une image parfaite du système étudié.

L'évolution des techniques implique désormais l'utilisation d'algorithmes et de filtres mathématiques toujours plus complexes²⁶², et la technique la plus utilisée actuellement est basée sur le principe de « rétroprojection filtrée » (« Backprojection ») :

L'inconvénient majeur de cette technique est l'introduction d'un flou dans l'image, avec une perte d'information pour les hautes fréquences.

L'opération de rétroprojection consiste à associer, à chaque pixel de la coupe à reconstruire, les valeurs des projections, divisées par le nombre de pixels traversé.

Exemple :

- Coupe réelle (ce que l'on devrait retrouver, mais qui est totalement inconnu) :

10	25	10
25	40	25
10	25	10

- Données acquise par le scanner (seules les projections en bleu sont connues) :

Nombre de pixels traversés $n = 3$

Quantités à répartir calculées: $q_i = p_i / n$ (en jaune)

μ_1	μ_4	μ_7	$p_4 = 45$	$q_4 = 15$
μ_2	μ_5	μ_8	$p_5 = 90$	$q_5 = 30$
μ_3	μ_6	μ_9	$p_6 = 45$	$q_6 = 15$
$p_1 = 45$	$p_2 = 90$	$p_3 = 45$		
$q_1 = 15$	$q_2 = 30$	$q_3 = 15$		

- Répartition équi-pondérée menée par l'opérateur de rétroprojection :

q_1+q_4	q_2+q_4	q_3+q_4
q_1+q_5	q_2+q_5	q_3+q_5
q_1+q_6	q_2+q_6	q_3+q_6

Au final, les valeurs déterminées sont bien différentes de ce que l'on aurait dû retrouver !

30	45	30	\neq	10	25	10
45	60	45		25	40	25
30	45	30		10	25	10

Cette répartition équi-pondérée n'étant que peu fiable, on peut l'améliorer, en utilisant une filtration mathématique appliquée à chaque projection en amont de la rétroprojection.

L'un des filtres actuellement utilisés est le filtre de Shepp-Logan (de plus amples informations sur le filtrage sont accessibles via les articles de A.K. Pandey *et al.*²⁶³, et M. Lyra *et al.*²⁶⁴).

Par suite, afin de présenter les images de manière plus conviviale, on remplace les valeurs des coefficients d'atténuation μ_c qui ont été calculées, en appliquant une normalisation par rapport au fluide biologique de référence, c'est-à-dire l'eau.

Les valeurs obtenues sont appelées « nombres CT » ou encore « nombres Hounsfield » :

$$CT = 1000 \times \frac{\mu_c - \mu_{eau}}{\mu_{eau}}$$

On pose par définition $\mu_{eau} = 0$ et $\mu_{air} = -1000$.

Annexe 12

➤ Définition et choix des paramètres du μ -scanner en vue de la création du protocole d'étude

Le paramètre « Rotation Steps » permet de définir le nombre de projections de rayons X acquises au cours de l'analyse. En entrant la valeur 180, on définit l'analyse pour une couverture de 2° par pas.

Le paramètre « FOV Overlap » reste par défaut à la valeur de 20%. Une valeur plus faible engendrerait l'apparition d'artéfacts du faisceau dans l'image finale, tandis qu'une valeur plus élevée exposerait l'échantillon à une dose de rayons X plus importante que nécessaire, sans amélioration de l'image finale.

Le paramètre « Downsample factor » permet d'alléger le temps de calcul, puisqu'il s'agit de réduire le taux d'échantillonnage, et donc le nombre de données enregistrées.

Annexe 13

➤ Paramètres de calibration pour un échantillon au μ -scanner

- Echantillon blanc : permettant la calibration du « 0 HU » (voir protocole page 86)

Dans la fenêtre de reconstruction du logiciel IAW, dans la section « COBRA Setup », entrer les valeurs suivantes :

Proj Scale : 700
Image Scale : 1.000
Image Offset : 0

- Echantillon classique :

Dans la fenêtre de reconstruction du logiciel IAW, dans la section « COBRA Setup », entrer les valeurs suivantes :

Proj Scale : 700
Image Scale : valeur calculée grâce au logiciel ASIPro (cf page)
Image Offset : -1.000

Annexe 14

➤ Synthèse du DTDTPA

On dissoud 2 g de DTPA-BA dans 40 mL de diméthylformamide (DMF) et on chauffe à 70 °C.

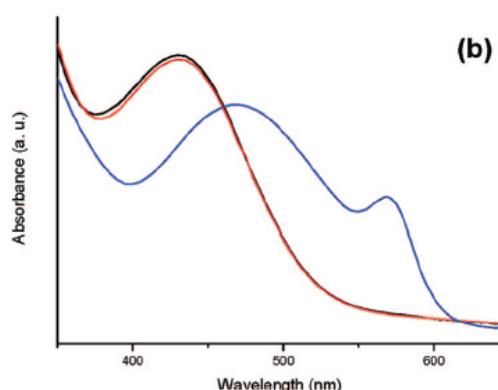
Dans un autre bécher, on dissoud 1,4 g d' aminoéthanthiol dans 30 mL de DMF puis on ajoute 1,74 mL de triéthylamine. Cette seconde solution est ajoutée à la première et agitée magnétiquement pendant 12h.

La solution est ensuite refroidie à température ambiante puis placée sur un lit de glace. On observe alors la précipitation d'une poudre blanche (NEt_3 , HCl) qui est filtrée sur un verre fritté.

Le filtrat est récupéré et réduit à l'évaporateur rotatif (étape réalisée sur un autre site de la faculté, où un évaporateur rotatif dispose d'une pompe assez puissante pour évaporer le DMF). Cette solution est alors ajoutée goutte à goutte à une solution de 100 mL de chloroforme agitée magnétiquement

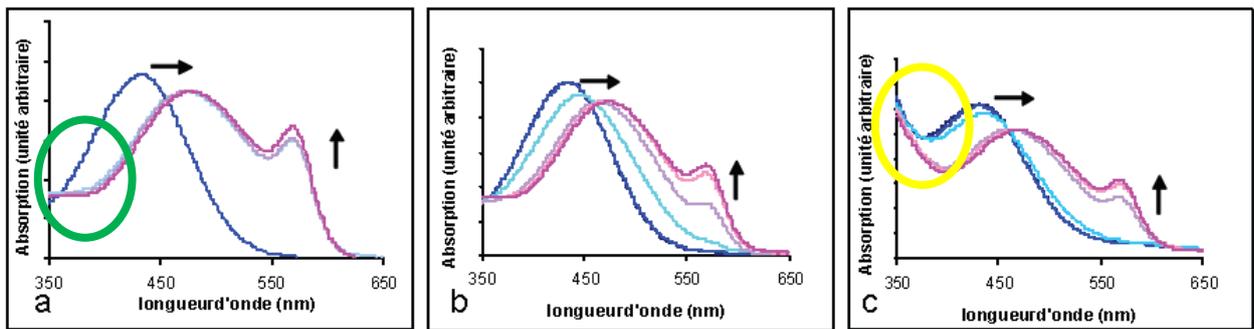
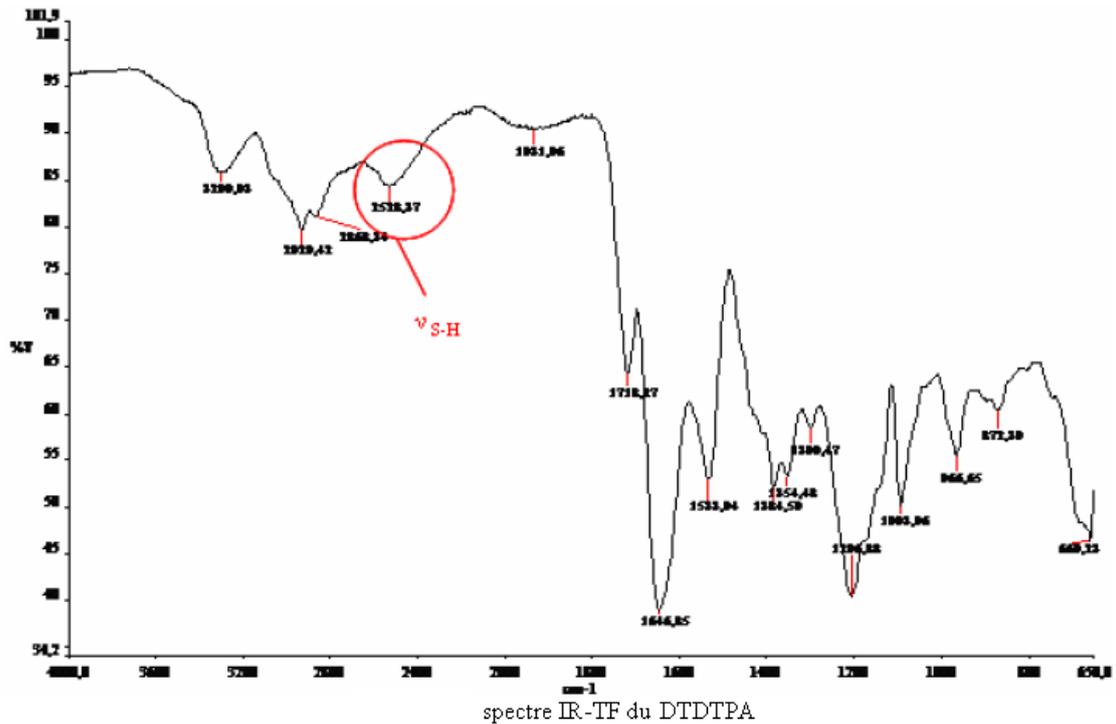
Un précipité blanc apparaît. Ce précipité est lui-même filtré sur verre fritté (entouré de glace) et lavé avec 50 mL de chloroforme. Le produit doit être maintenu en permanence à une température très basse afin d'éviter sa dégradation (si le précipité est filtré à température ambiante cela suffit à rendre le mélange jaunâtre et collant, signe de formation de ponts disulfures et d'un composé inutilisable par la suite). Nous ne disposons pas au laboratoire d'équipement permettant de sécher le produit afin d'obtenir une poudre et d'éliminer le DMF et les autres solvants résiduels. C'est donc sous cette forme que le DTDTPA sera ajouté aux particules d'or.

Les figures ci-dessous (A-41 et A-42) sont extraites des articles d'Alric et al.¹⁰⁸ et de Deboutiere et al.²⁰⁹. Nos résultats expérimentaux sont conformes à ceux obtenus dans ces études, bien que notre synthèse du composé DTDTPA ne soit pas la plus « pure » possible :



(a) Transmission electron micrograph of Au@DTDTPA nanoparticles. Inset: high resolution TEM of Au@DTDTPA nanoparticles. (b) UV-vis spectra of a solution of xlenol orange in the presence of Au@DTDTPA-Gd_x nanoparticles with $x = 0$ (black curve), 50 (red curve), and >157 (blue curve).

Fig A-41 : spectres UV-Visibles extraits de l'article de Alric et al.



évolution de l'absorption en fonction de l'ajout en Gd^{3+} . Sur une solution aqueuse (a), sur une solution de DTDTPA (b) et sur une solution Au@DTDTPA (c).

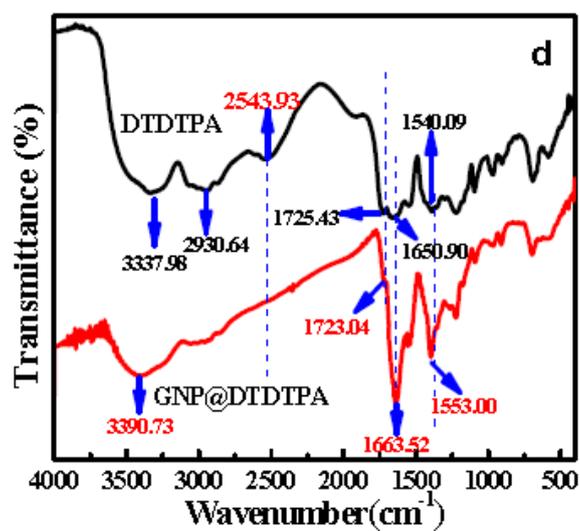
Fig A-42 : spectres extraits et adaptés (cercles vert et jaune) de Deboutière et al.

En étant très vigilant, il est possible de distinguer une caractéristique particulière sur les spectres UV-Visible présentés ci-dessus :



- > Lorsqu'il s'agit d'une solution de DTDTPA seule, le spectre débute « bas » (cercle vert)
- > Lorsqu'il s'agit d'une solution où le couplage DTDTPA-particules d'or a eu lieu, le spectre débute « haut » (cercle jaune)

Enfin, le spectre FTIR ci-dessous (figure A-43) est extrait de l'article de Xiao et al.²⁶⁵ :



(d) FTIR spectrum

comparison of DTDTPA and GNP@DTDTPA. IR: 2930.64 cm^{-1} (ν CH-alkyl), 2543.93 cm^{-1} (ν -SH), 1725.43 cm^{-1} (ν C=O, COOH), 1650.90 cm^{-1} (ν C=O, RCONR'R''), 1540.09 cm^{-1} (ν C=O, RCONHR') for DTDTPA, (e) UV-vis absorption spectrum and (f) TG result of GNP@DTDTPA.

Fig A-43 : spectres FTIR extraits de l'article de Xiao et al.

Annexe 15

➤ Tableau de données

La machine ne peut contenir que 16 tubes à la fois, et un set d'expérimentation requiert 80 tubes (effectué trois fois, avec des solutions différentes, pour obtenir nos graphiques).

Par ailleurs, entre chaque passage de tubes en machine, une déviation de 50 HU maximum peut se produire. De ce fait, des barres d'erreur de 50 HU sont acceptables.

Les figures 3-102 et 4-11 ainsi que les graphiques détaillés sont issus des données suivantes :

	POINTS	erreur haute	erreur basse	amplitude d'erreur
Omnipaque	26	13	9	22
	48	5	5	10
	70	9	3	12
	77	12	7	19
Triodobenzene	44	15	9	24
	71	31	12	43
	140	17	26	43
	167	20	17	37
capsules vides	23	6	4	10
	21	3	5	8
	28	5	7	12
	25	5	3	8
capsules + triodobenzene	133	19	26	45
	147	15	25	40
	289	59	42	101
	312	46	29	75
capsules + omnipaque	104	20	19	39
	123	20	15	35
	201	20	33	53
	245	11	13	24

	POINTS	erreur haute	erreur basse	amplitude d'erreur
SB (solution de nucléation)	25	10	6	16
	46	9	13	22
	92	20	14	34
	100	22	12	34
GP (Pyramides fabriquées par lithographie)	59	18	14	32
	147	24	27	51
	159	16	23	39
	170	31	11	42
MP (particules commerciales 800 nm)	48	7	4	11
	97	30	21	51
	110	36	31	67
	164	19	15	34
H (dendrites)	32	9	6	15
	56	12	15	27
	77	16	18	34
	132	52	37	89
RC (nanofils courts)	32	10	13	23
	52	8	6	14
	62	4	3	7
	68	3	5	8
P + RC (nanofils courts encapsulés)	143	7	5	12
	173	7	7	14
	195	15	23	38
	239	7	9	16
GdCl ₃	150	6	9	15
	175	13	16	29
	225	16	22	38
	275	25	19	44

POINTS	erreur haute	erreur basse	amplitude d'erreur
--------	--------------	--------------	--------------------

Gd + DTDTPA

142	22	15	37
164	15	14	29
221	17	23	40
242	25	19	44

Gd + triodobenzene

211	55	89	144
319	39	29	68
565	41	62	103
623	148	112	260

Gd + omnipaue

173	68	70	138
302	19	24	43
315	16	22	38
377	37	56	93

Gd + DTDTPA + Au

166	5	7	12
246	5	8	13
351	22	30	52
398	10	18	28

RL (nanofils longs)

4	6	4	10
27	6	10	16
41	3	6	9
46	4	6	10

BSA (triangles)

71	45	26	71
81	65	81	146
227	112	72	184
256	14	10	24

C (Polygones en présence de Citronnelle)

130	8	9	17
170	12	6	18
260	37	47	84
307	33	26	59

Bibliographie

- ¹ Terry, S. C., J. H. Jerman and J. B. Angell (1979). "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer." Electron Devices, IEEE Transactions on **26**(12): 1880-1886.
- ² Réglementation > Les autorisations d'expérimenter (CNRS-SDV)
- ³ Bruus, H (2006). Theoretical microfluidics. Lecture notes third edition, 27-32.
- ⁴ Bruus, H (2006). Theoretical microfluidics. Lecture notes third edition, 47.
- ⁵ Rumpfer, M., A. Woesz, J. W. C. Dunlop, et al. (2008). "The effect of geometry on three-dimensional tissue growth." Journal of The Royal Society Interface **5**(27): 1173-1180.
- ⁶ Ratner, B. B. D. and A. S. Hoffman (1996). Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press.
- ⁷ Vert, M (2000). La nécessité d'une terminologie pour les macromolécules et les matériaux polymères dégradables. Les polymères naturels : structure, modifications, applications, Editor : GFP, 453-456.
- ⁸ Wang, G.-J., K.-H. Ho, S.-h. Hsu, et al. (2007). "Microvessel scaffold with circular microchannels by photoresist melting." Biomedical Microdevices **9**(5): 657-663.
- ⁹ Yun, K.-S. and E. Yoon (2008). "Fabrication of complex multilevel microchannels in PDMS by using three-dimensional photoresist masters." Lab on a Chip **8**(2): 245-250.
- ¹⁰ Qu, X., F. Sang and J. Ren (2006). "Fabrication of PDMS/glass microchips by twofold replication of PDMS and its application in genetic analysis." Journal of Separation Science **29**(15): 2390-2394.
- ¹¹ Peterson, K. E (1982), "Silicon as a mechanical material", Proc. IEEE 70 n° 5, 420-456. / Seidel, H., L. Csepregi, A. Heuberger, et al. (1990). "Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions: I. Orientation Dependence and Behavior of Passivation Layers." Journal of The Electrochemical Society **137**(11): 3612-3626. / Tabeling, P. (2003). Introduction à la microfluidique, Belin.
- ¹² Giang, U.-B. T., D. Lee, M. R. King, et al. (2007). "Microfabrication of cavities in polydimethylsiloxane using DRIE silicon molds." Lab on a Chip **7**(12): 1660-1662.
- ¹³ Fiorini, G. S. and D. T. Chiu (2005). "Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application." Biotechniques **38**(3): 429-446.
- ¹⁴ Koerner, T., L. Brown, R. Xie, et al. (2005). "Epoxy resins as stamps for hot embossing of microstructures and microfluidic channels." Sensors and Actuators B: Chemical **107**(2): 632-639.
- ¹⁵ Attia, U., S. Marson and J. Alcock (2009). "Micro-injection moulding of polymer microfluidic devices." Microfluidics and Nanofluidics **7**(1): 1-28.
- ¹⁶ Jeon, J., S. Chung, R. Kamm, et al. (2011). "Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform." Biomedical Microdevices **13**(2): 325-333.
- ¹⁷ Luo, L. W., C. Y. Teo, W. L. Ong, et al. (2007). "Rapid prototyping of microfluidic systems using a laser-patterned tape." Journal of Micromechanics and Microengineering **17**(12): N107.
- ¹⁸ Hua, F., Y. Sun, A. Gaur, et al. (2004). "Polymer Imprint Lithography with Molecular-Scale Resolution." Nano Letters **4**(12): 2467-2471.
- ¹⁹ Ganachaud, F., S. Boileau and B. Boury (2008). Silicon Based Polymers: Advances in Synthesis and Supramolecular Organization, Springer Science+Business Media B.V.

- ²⁰ J.C. McDonald and G.M. Whitesides (2002). "Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices" Accounts of Chemical Research **35**(7):491-499
- ²¹ Tan, A., K. Rodgers, J. P. Murrighy, et al. (2001). "Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying." Lab on a Chip **1**(1): 7-9.
- ²² Grimes, A., D. N. Breslauer, M. Long, et al. (2008). "Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns." Lab on a Chip **8**(1): 170-172.
- ²³ Juchniewicz, M., D. Stadnik, K. Biesiada, et al. (2007). "Porous crosslinked PDMS-microchannels coatings." Sensors and Actuators B: Chemical **126**(1): 68-72.
- ²⁴ Wang, H. Y., T. Kobayashi, H. Saitoh, et al. (1996). "Porous polydimethylsiloxane membranes for enzyme immobilization." Journal of Applied Polymer Science **60**(13): 2339-2346.
- ²⁵ Kobayashi, T., H. Saitoh, N. Fujii, et al. (1993). "Porous membrane of polydimethylsiloxane by hydrosilylation cure: Characteristics of membranes having pores formed by hydrogen foams." Journal of Applied Polymer Science **50**(6): 971-979.
- ²⁶ Lee, J. N., C. Park and G. M. Whitesides (2003). "Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices." Analytical Chemistry **75**(23): 6544-6554.
- ²⁷ Zhang, W. Y., G. S. Ferguson and S. Tatic-Lucic (2004). Elastomer-supported cold welding for room temperature wafer-level bonding. Micro Electro Mechanical Systems, 2004. 17th IEEE International Conference on MEMS.
- ²⁸ Hongbin, Y., Z. Guangya, C. F. Siong, et al. (2009). "Novel polydimethylsiloxane (PDMS) based microchannel fabrication method for lab-on-a-chip application." Sensors and Actuators B: Chemical **137**(2): 754-761.
- ²⁹ Stuart Bondurant et al. (1999) Safety of Silicone Breast Implants, The National Academies Press.
- ³⁰ Lykissa, E. D. and S. V. M. Maharaj (2006). "Total Platinum Concentration and Platinum Oxidation States in Body Fluids, Tissue, and Explants from Women Exposed to Silicone and Saline Breast Implants by IC-ICPMS." Analytical Chemistry **78**(9): 2925-2933.
- ³¹ Efimenko, K., W. E. Wallace and J. Genzer (2002). "Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethylsiloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment." Journal of Colloid and Interface Science **254**(2): 306-315, Graubner, V.-M., R. Jordan, O. Nuyken, et al. (2003). "Wettability and surface composition of poly (dimethylsiloxane) irradiated at 172 nm." Polymeric Materials Science and Engineering **88**: 488-489.
- ³² Lee, L., K. Choong, S. Kyeong Sik, et al. (2007). "Fabrication of round channels using the surface tension of PDMS and its application to a 3D serpentine mixer." Journal of Micromechanics and Microengineering **17**(8): 1533.
- ³³ Chao, S.-h., R. Carlson and D. R. Meldrum (2007). "Rapid fabrication of microchannels using microscale plasma activated templating ([small mu]PLAT) generated water molds." Lab on a Chip **7**(5): 641-643.
- ³⁴ Park, J., C. Hwang and S.-H. Lee (2009). "Ice-lithographic fabrication of concave microwells and a microfluidic network." Biomedical Microdevices **11**(1): 129-133.
- ³⁵ Golden, A. P. and J. Tien (2007). "Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element." Lab on a Chip **7**(6): 720-725.

- ³⁶ Wong, I., S. Atsumi, W.-C. Huang, et al. (2010). "An agar gel membrane-PDMS hybrid microfluidic device for long term single cell dynamic study." Lab on a Chip **10**(20): 2710-2719.
- ³⁷ Smidsrød, O. and G. Skjak-Brik (1990). "Alginate as immobilization matrix for cells." Trends in Biotechnology **8**(0): 71-78.
- ³⁸ Godbey, W. T. and A. Atala (2002). "In Vitro Systems for Tissue Engineering." Annals of the New York Academy of Sciences **961**(1): 10-26.
- ³⁹ McIntire, L. V. (2003). WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research, Elsevier Science.
- ⁴⁰ Wang, L., R. M. Shelton, P. R. Cooper, et al. (2003). "Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering." Biomaterials **24**(20): 3475-3481.
- ⁴¹ Orive, G., R. M. Hernández, A. R. Gascón, et al. (2003). "Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules." European Journal of Pharmaceutical Sciences **18**(1): 23-30.
- et
- Ghidoni, I., T. Chlapanidas, M. Bucco, et al. (2008). "Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine." Cytotechnology **58**(1): 49-56.
- ⁴² Segal, H. C., B. J. Hunt and K. Gilding (1998). "The Effects of Alginate and Non-Alginate Wound Dressings on Blood Coagulation and Platelet Activation." Journal of Biomaterials Applications **12**(3): 249-257.
- ⁴³ Davis, T. A., B. Volesky and A. Mucci (2003). "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae." Water Research **37**(18): 4311-4330.
- ⁴⁴ Wu, Y., H. Mimura and Y. Niibori (2009). "Selective uptake of plutonium (IV) on calcium alginate gel polymer and TBP microcapsule." Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry **281**(3): 513-520.
- ⁴⁵ Mimura, H., H. Ohta, K. Akiba, et al. (2002). "Uptake and Recovery of Platinum Group Metals Ions by Alginate Microcapsules Immobilizing Cyanex 302 Emulsions." Journal of Nuclear Science and Technology **39**(9): 1008-1012.
- ⁴⁶ Moon, S., B.-Y. Ryu, J. Choi, et al. (2009). "The morphology and mechanical properties of sodium alginate based electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers." Polymer Engineering & Science **49**(1): 52-59.
- ⁴⁷ Protan (1986). "Alginates" Chilton's Food Eng.Int., **11**(2):60
- ⁴⁸ Gau, H., S. Herminghaus, P. Lenz, et al. (1999). "Liquid morphologies on structured surfaces: from microchannels to microchips." Science **283**(5398): 46-49.
- ⁴⁹ Darhuber, A. A., S. M. Troian, S. M. Miller, et al. (2000). "Morphology of liquid microstructures on chemically patterned surfaces." Journal of Applied Physics **87**(11): 7768-7775.
- ⁵⁰ Brinkmann, M. and R. Lipowsky (2002). "Wetting morphologies on substrates with striped surface domains." Journal of Applied Physics **92**(8): 4296-4306.
- ⁵¹ Liu, X., Q. Wang, J. Qin, et al. (2009). "A facile "liquid-molding" method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography." Lab on a Chip **9**(9): 1200-1205.
- ⁵² Brinkmann, M. and R. Blossey (2004). "Blobs, channels and "cigars": Morphologies of liquids at a step." The European Physical Journal E **14**(1): 79-89.

- ⁵³ Seemann, R., M. Brinkmann, E. J. Kramer, et al. (2005). "Wetting morphologies at microstructured surfaces." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(6): 1848-1852.
- ⁵⁴ Raymond, L. S. and L. Eric (2009). "Capillary instability on a hydrophilic stripe." New Journal of Physics **11**(7): 075024.
- ⁵⁵ Park, J. C., M. J. Song, Y. S. Hwang, et al. (2001). "Calcification comparison of polymers for vascular graft." Yonsei Med J **42**(3): 304-310.
- ⁵⁶ Ryu, D., K. J. Loh, R. Ireland, et al. (2011). "In situ reduction of gold nanoparticles in PDMS matrices and applications for large strain sensing." Smart Structures and Systems **8**(5): 471-486.
- ⁵⁷ Lee, K. Y., D. W. Kim, J. Heo, et al. (2006). "Novel Colorimetric Sensing of Anion with Gold Nanoparticles-Embedded Plasticised Polymer Membrane." Bulletin-Korean Chemical Society **27**(12): 2081.
- ⁵⁸ Fang, C., W. Chungang, W. Tingting, et al. (2010). "L-cysteine functionalized gold nanoparticles for the colorimetric detection of Hg 2+ induced by ultraviolet light." Nanotechnology **21**(2): 025501.
- ⁵⁹ Javier, D. J., A. Castellanos-Gonzalez, S. E. Weigum, et al. (2009). "Oligonucleotide-Gold Nanoparticle Networks for Detection of Cryptosporidium parvum Heat Shock Protein 70 mRNA." Journal of Clinical Microbiology **47**(12): 4060-4066.
- ⁶⁰ Bonnin, A., G. Dautin, F. Dalle, et al. (2001). "Cryptosporidiose : risque sanitaire individuel et collectif." La Lettre de l'Infectiologue **16**(10): 310-316.
- ⁶¹ Wang, L., X. Liu, X. Hu, et al. (2006). "Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers." Chemical Communications **0**(36): 3780-3782.
- ⁶² Wu, W.-Y., Z.-P. Bian, W. Wang, et al. (2010). "PDMS gold nanoparticle composite film-based silver enhanced colorimetric detection of cardiac troponin I." Sensors and Actuators B: Chemical **147**(1): 298-303.
- ⁶³ Saha, K., S. S. Agasti, C. Kim, et al. (2012). "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing." Chemical Reviews **112**(5): 2739-2779.
- ⁶⁴ Daniel, M.-C. and D. Astruc (2003). "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology." Chemical Reviews **104**(1): 293-346.
- ⁶⁵ Ghosh, S. K. and T. Pal (2007). "Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications." Chemical Reviews **107**(11): 4797-4862.
- ⁶⁶ Hainfeld, J. F., N. S. Daniel and M. S. Henry (2004). "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice." Physics in Medicine and Biology **49**(18): N309.
- ⁶⁷ Hahn, M., A. Singh, P. Sharma, et al. (2011). "Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives." Analytical Bioanalytical Chemistry, **399**: 3.
- ⁶⁸ Kim, D., S. Park, J. H. Lee, et al. (2007). "Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging." Journal of the American Chemical Society **129**(24): 7661-7665.
- ⁶⁹ Kojima C, Umeda Y, Ogawa M, et al. (2010) "X-ray computed tomography contrast agents prepared by seeded growth of gold nanoparticles in PEGylated dendrimer." Nanotechnology **21**(24):245104

- ⁷⁰ Popovtzer, R., A. Agrawal, N. A. Kotov, et al. (2008). "Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer." Nano Letters **8**(12): 4593-4596
- ⁷¹ Xiao, M., J. Nyagilo, V. Arora, et al. (2010). "Gold nanotags for combined multi-colored Raman spectroscopy and x-ray computed tomography." Nanotechnology **21**: 1.
- ⁷² Aydogan B, Li J, Rajh T, et al. (2010) "AuNP-DG: Deoxyglucose-labeled gold nanoparticles as x-ray computed tomography contrast agents for cancer imaging." Molecular Imaging and Biology **12**(5):463-470
- ⁷³ Boote E, Fent G, Kattumuri V, et al. (2010) "Gold nanoparticle contrast in a phantom and juvenile swine: models for molecular imaging of human organs using x-ray computed tomography." Academic Radiology **17**(4):410-417
- ⁷⁴ Cai, Q.-Y., S. H. Kim, K. S. Choi, et al. (2007). "Colloidal Gold Nanoparticles as a Blood-Pool Contrast Agent for X-ray Computed Tomography in Mice." Investigative Radiology **42**(12): 797-806
- ⁷⁵ Sun IC, Eun DK, Na JH, et al. (2009) "Heparin-coated gold nanoparticles for liver-specific CT imaging." Chemistry **15**(48):13341-13347
- ⁷⁶ Guo, R., H. Wang, C. Peng, et al. (2009). "X-ray Attenuation Property of Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles." The Journal of Physical Chemistry C **114**(1): 50-56
- ⁷⁷ Xu CJ, Tung GA, Sun SH (2008) "Size and concentration effect of gold nanoparticles on x-ray attenuation as measured on computed tomography." Chemistry of Material **20**(13):4167-4169
- ⁷⁸ McMahon SJ, Mendenhall MH, Jain S, et al. (2008) "Radiotherapy in the presence of contrast agents: a general figure of merit and its application to gold nanoparticles." Physics in Medicine and Biology **53**(20):5635-5651
- ⁷⁹ Kattumuri, V., K. Katti, S. Bhaskaran, et al. (2007). "Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: in vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies." Small **3**(2): 333-341.
- ⁸⁰ Kim, D., Y. Y. Jeong and S. Jon (2010). "A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer." ACS Nano **4**(7): 3689-3696
- ⁸¹ Mettler C.C. (1947). "History of Medicine", Toronto
- ⁸² Slikkerveer, A. and F. Wolff (1989). "Pharmacokinetics and Toxicity of Bismuth Compounds." Medical Toxicology and Adverse Drug Experience **4**(5): 303-323.
- ⁸³ Becker, N., D. Liebermann, H. Wesch, et al. (2008). "Mortality among Thorotrast-exposed patients and an unexposed comparison group in the German Thorotrast study." European Journal of Cancer **44**(9): 1259-1268.
- ⁸⁴ de Marcillac, P., N. Coron, G. Dambier, et al. (2003). "Experimental detection of [alpha]-particles from the radioactive decay of natural bismuth." Nature **422**(6934): 876-878.
- ⁸⁵ Staszewski, J. M., D. Kopyto, K. Becker, et al. (2008). "The X-ray activated reduction of silver (I) solutions as a method for nanoparticles manufacturing." Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering **28**(1): 23-26.
- ⁸⁶ Darier, A. (1906). Des nouveaux sels d'argent en thérapeutique oculaire, éditeur : Paris : Bureaux de la Clinique Ophthalmologique.
- ⁸⁷ Ip, M., S. L. Lui, V. K. M. Poon, et al. (2006). "Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison." Journal of Medical Microbiology **55**(1): 59-63.

- ⁸⁸ Fass, L. (2008). "Imaging and cancer: A review." Molecular Oncology **2**(2): 115-152.
- ⁸⁹ Pommier, M. Etat de l'art en imagerie médicale. rsna 2010 : 96th assembly and annual meeting, Groupe d'Experts Afib.
- ⁹⁰ Smith, L. and Z. Kuncic (2012). "Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy." Journal of Nanomaterials **2012**: 7, Article ID 891318, doi:10.1155/2012/891318
- ⁹¹ Rosen, J. E. and S. Yoffe (2011). "Nanotechnology and Diagnostic Imaging: New Advances in Contrast Agent Technology." Journal of Nanomedicine and Nanotechnology **2**(5).
- ⁹² Chen, P. C. and S. C. Mwakwari (2008). "Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing." Nanotechnology, Science and Applications **1**: 45 - 66.
- ⁹³ Jain, S., D. G. Hirst and J. M. O'Sullivan (2012). "Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy." British Journal of Radiology **85**(1010): 101-113
- ⁹⁴ Seibert, J. A. (2004). "X-Ray Imaging Physics for Nuclear Medicine Technologists. Part 1: Basic Principles of X-Ray Production." Journal of Nuclear Medicine Technology **32**(3): 139-147.
- ⁹⁵ Dion, A. M., F. Berger, O. Hélie, et al. (2004). "Diminuer la dose en tomodensitométrie abdominale : baisser la tension (kV) ou la charge (mAs) ?" Journal de Radiologie **85**(4, Part 1): 375-380.
- ⁹⁶ Bitar, R., G. Leung, R. Perng, et al. (2006). "MR Pulse Sequences: What Every Radiologist Wants to Know but Is Afraid to Ask1." Radiographics **26**(2): 513-537.
- ⁹⁷ Barnett, B. P., A. Arepally, M. Stuber, et al. (2011). "Synthesis of magnetic resonance-, X-ray- and ultrasound-visible alginate microcapsules for immunoisolation and noninvasive imaging of cellular therapeutics." Nature Protocols **6**(8): 1754-2189.
- ⁹⁸ Tamer, U., D. Cetin, Z. Suludere, et al. (2013). "Gold-Coated Iron Composite Nanospheres Targeted the Detection of Escherichia coli." International Journal of Molecular Sciences **14**(3): 6223-6240
- ⁹⁹ Melancon, M. P., W. Lu and C. Li (2009). "Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy." MRS Bulletin **34**(6): 415-421.
- ¹⁰⁰ Dahal, N. and V. Chikan (2011). "Synthesis of Hafnium Oxide-Gold Core-Shell Nanoparticles." Inorganic Chemistry **51**(1): 518-522
- ¹⁰¹ Warsi, M. F. and V. Chechik (2011). "Strategies for increasing relaxivity of gold nanoparticle based MRI contrast agents." Physical Chemistry Chemical Physics **13**(20): 9812-9817
- ¹⁰² Alric, C., J. Taleb, G. L. Duc, et al. (2008). "Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging." Journal of the American Chemical Society **130**(18): 5908-5915.
- ¹⁰³ MD, N. S., K. Hee-Kyung, P. Ji-Ae, et al. (2010). "Gold Nanoparticles Coated with Gd-Chelate as a Potential CT/MRI Bimodal Contrast Agent." Bulletin of the Korean Chemical Society **31**(5): 1177-1181.
- ¹⁰⁴ Weissig, V., J. Babich and V. Torchilin (2000). "Long-circulating gadolinium-loaded liposomes: potential use for magnetic resonance imaging of the blood pool." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **18**(3-4): 293-299.
- ¹⁰⁵ Ruiz-Cabello, J., B. P. Barnett, P. A. Bottomley, et al. (2011). "Fluorine (¹⁹F) MRS and MRI in biomedicine." NMR in Biomedicine **24**(2): 114-129.
- ¹⁰⁶ Janjic, J. M. and E. T. Ahrens (2009). "Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking." Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology **1**(5): 492-501.

- ¹⁰⁷ Rabin, O., J. Manuel Perez, J. Grimm, et al. (2006). "An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles." Nature Materials **5**(2): 118-122.
- ¹⁰⁸ Oh, M. H., N. Lee, H. Kim, et al. (2011). "Large-Scale Synthesis of Bioinert Tantalum Oxide Nanoparticles for X-ray Computed Tomography Imaging and Bimodal Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping." Journal of the American Chemical Society **133**(14): 5508-5515.
- ¹⁰⁹ Winchell. H.S. (1978), "Method of preparing X-Ray contrast media containing ores of hafnium, tantalum and tungsten", US4079124 (brevet).
- ¹¹⁰ B. Banga and N. Gnory (2012) "Nanotechnologies, Un avenir prometteur" Pharmaceutiques p68
- ¹¹¹ Chicoskie, C. and R. Tello (2005). "Gadolinium-Enhanced MDCT Angiography of the Abdomen: Feasibility and Limitations." American Journal of Roentgenology **184**(6): 1821-1828.
- ¹¹² Albrecht, T. and P. Dawson (2000). "Gadolinium-DTPA as X-ray contrast medium in clinical studies." British Journal of Radiology **73**(872): 878-882.
- ¹¹³ Luboldt, W., M. De Santis, A. Von Smekal, et al. (1997). "Attenuation Characteristics and Application of Gadolinium-DTPA in Fast Helical Computed Tomography." Investigative Radiology **32**(11): 690-695.
- ¹¹⁴ Standard Reference Database : Hubbell J. H. and S. M. Seltzer, Radiation Physics Division, Physical Measurement Laboratory, National Institute of Standards and Technology
- ¹¹⁵ Cormode, D. P., E. Roessl, A. Thran, et al. (2010). "Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles1." Radiology **256**(3): 774-782.
- ¹¹⁶ Geckeler, K. E. and H. Nishide (2009). Advanced Nanomaterials, p 250, Wiley, ISBN: 978-3-527-31794-3
- ¹¹⁷ Haruta, M. (2004). "Gold as a novel catalyst in the 21st century: Preparation, working mechanism and applications." Gold Bulletin **37**(1-2): 27-36.
- ¹¹⁸ Elghanian, R., J. J. Storhoff, R. C. Mucic, et al. (1997). "Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles." Science **277**(5329): 1078-1081.
- ¹¹⁹ Saha, K., S. S. Agasti, C. Kim, et al. (2012). "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing." Chemical Reviews **112**(5): 2739-2779.
- ¹²⁰ Dvir, Y., O. Dan, T. Stephan, et al. (2003). "Multiphoton plasmon-resonance microscopy." Optics Express **11**(12): 1385 - 1391.
- ¹²¹ El-Sayed, I. H., X. Huang and M. A. El-Sayed (2005). "Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer." Nano Letters **5**(5): 829-834.
- ¹²² Hainfeld, J. F., M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, et al. (2011). "Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions." British Journal of Radiology **84**(1002): 526-533.
- ¹²³ Hainfeld, J. F., D. N. Slatkin, T. M. Focella, et al. (2006). "Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent." British Journal of Radiology **79**(939): 248-253.
- ¹²⁴ Xu, C., G. A. Tung and S. Sun (2008). "Size and Concentration Effect of Gold Nanoparticles on X-ray Attenuation As Measured on Computed Tomography." Chemistry of Materials **20**(13): 4167-4169.

- ¹²⁵ Chithrani, B. D., A. A. Ghazani and W. C. W. Chan (2006). "Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells." Nano Letters **6**(4): 662-668.
- ¹²⁶ Chithrani, B. D. and W. C. W. Chan (2007). "Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes." Nano Letters **7**(6): 1542-1550.
- ¹²⁷ Jelveh, S. and D. B. Chithrani (2011). "Gold Nanostructures as a Platform for Combinational Therapy in Future Cancer Therapeutics." Cancers **3**(1): 1081-1110
- ¹²⁸ Alkilany, A. M., L. B. Thompson, S. P. Boulos, et al. (2012). "Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions." Advanced Drug Delivery Reviews **64**(2): 190-199.
- ¹²⁹ Jackson, P., S. Periasamy, V. Bansal, et al. (2011). "Evaluation of the effects of gold nanoparticle shape and size on contrast enhancement in radiological imaging." Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine **34**(2): 243-249 et Jackson, P. A., W. N. W. A. Rahman, C. J. Wong, et al. (2010). "Potential dependent superiority of gold nanoparticles in comparison to iodinated contrast agents." European Journal of Radiology **75**(1): 104-109.
- ¹³⁰ Nasiruzzaman Sk, H.K Kim, J.A Park et al. (2010). "Gold Nanoparticles Coated with Gd-Chelate as a Potential CT/MRI Bimodal Contrast Agent", Bulletin of Korean Chemistry Society, **31**(5): 1177
- ¹³¹ Yusa, N., M. Jiang, K. Mizuno, et al. (2009). "Numerical evaluation of the effectiveness of colloidal gold as a contrast agent." Radiological Physics and Technology **2**(1): 33-39
- ¹³² Schirra, C. O., A. Senpan, E. Roessl, et al. (2012). "Second generation gold nanobeacons for robust K-edge imaging with multi-energy CT." Journal of Materials Chemistry **22**(43): 23071-23077.
- ¹³³ Ducote, J. L., Y. Alivov and S. Molloi (2011). "Imaging of nanoparticles with dual-energy computed tomography." Physics in Medicine and Biology **56**(7): 2031.
- ¹³⁴ Darin, P. C., G. Ketan, J. M. Everett, et al. (2013). "In vivo characterization of tumor vasculature using iodine and gold nanoparticles and dual energy micro-CT." Physics in Medicine and Biology **58**(6): 1683.
- ¹³⁵ He, P., B. Wei, W. Cong, et al. (2012). "Optimization of K-edge imaging with spectral CT." Medical Physics **39**(11): 6572-6579.
- ¹³⁶ Dilmanian, F. A., X. Y. Wu, E. C. Parsons, et al. (1997). "Single- and dual-energy CT with monochromatic synchrotron X-rays." Physics in Medicine and Biology **42**(2): 371.
- ¹³⁷ Chien, C.-C., H.-H. Chen, S.-F. Lai, et al. (2012). "Gold nanoparticles as high-resolution X-ray imaging contrast agents for the analysis of tumor-related micro-vasculature." Journal of Nanobiotechnology **10**(1): 10.
- ¹³⁸ Wu, H.Y., W.L. Huang, and M.H. Huang (2007) "direct high yield synthesis of high aspect ratio gold nanorods" Crystal Growth & Design **7**(4): 831-835
- ¹³⁹ Jiang, X.C., and M.P. Pileni (2007) "Gold nanorods influence of various parameters as seed solvent surfactant on shape control" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **295**(1-3): 228-232
- ¹⁴⁰ Seo, S.S., X. Wang and D. Murray (2009) "Direct monitoring of gold nanorod growth" Ionics **15**(1):67-71

- ¹⁴¹ Grzelczak M., A. Sanchez-Iglesias, B. Rodriguez-Gonzalez et al. (2008) "Influence of iodide ions on the growth of gold nanorods: tuning tip curvature and surface plasmon resonance" Advanced Functional Materials 18(23):3780-3786
- ¹⁴² Guo, Z., X. Fan, L. Liu et al. (2010) "Achieving high purity colloidal gold nanoprisms and their application as biosensing platforms" Journal of Colloid and Interface Science 348(1): 29–36
- ¹⁴³ Ahmed, W., E.S. Kooji, A. Van-Silfhout et al. (2010) "Controlling the morphology of multibranched gold nanoparticles" Nanotechnology 21(12):125605
- ¹⁴⁴ Jain, P. K., K. S. Lee, I. H. El-Sayed, et al. (2006). "Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine." The Journal of Physical Chemistry B 110(14): 7238-7248.
- ¹⁴⁵ Kumar C.S.S.R. (ed.) Mixed Metal Nanomaterials (Wiley, 2009)(ISBN 3527321535)
- ¹⁴⁶ Liu, X., M. Atwater, J. Wang, et al. (2007). "Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 58(1): 3-7.
- ¹⁴⁷ Nehl, C. L. and J. H. Hafner (2008). "Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles." Journal of Materials Chemistry 18(21): 2415-2419.
- ¹⁴⁸ Tréguer-Delapierre, M., J. Majimel, S. Mornet, et al. (2008). "Synthesis of non-spherical gold nanoparticles." Gold Bulletin 41(2): 195-207.
- ¹⁴⁹ Sau, T. K. and C. J. Murphy (2004). "Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution." Journal of the American Chemical Society 126(28): 8648-8649
- ¹⁵⁰ Cao, C., S. Park and S. J. Sim (2008). "Seedless synthesis of octahedral gold nanoparticles in condensed surfactant phase." Journal of Colloid and Interface Science 322(1): 152-157.
- ¹⁵¹ Kathryn, M. M., H. Feng, L. Seunghyun, et al. (2010). "A single molecule immunoassay by localized surface plasmon resonance." Nanotechnology 21 : 255503
- ¹⁵² Jana, N. R. (2003). "Nanorod shape separation using surfactant assisted self-assembly." Chemical Communications (15): 1950-1951
- ¹⁵³ Xiang, Y., X. Wu, D. Liu, et al. (2008). "Gold Nanorod-Seeded Growth of Silver Nanostructures: From Homogeneous Coating to Anisotropic Coating." Langmuir 24(7): 3465-3470
- ¹⁵⁴ Hsiangkuo, Y., G. K. Christopher, H. Hanjun, et al. (2012). "Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging." Nanotechnology 23(7): 075102
- ¹⁵⁵ Seo, D., C. I. Yoo, J. C. Park, et al. (2008). "Directed Surface Overgrowth and Morphology Control of Polyhedral Gold Nanocrystals." Angewandte Chemie International Edition 47(4): 763-767.
- ¹⁵⁶ Tang, T. and I. W. Hamley (2009). "Multiple morphologies of gold nano-plates by high-temperature polyol syntheses." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 336(1–3): 1-7.
- ¹⁵⁷ Sajanalal, P. R., T. S. Sreerasad, A. K. Samal, et al. (2011). "Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions." Nano Reviews 2011, 2:5883
- ¹⁵⁸ Khee Chaw, N. and C. Wenlong (2012). "Fine-tuning longitudinal plasmon resonances of nanorods by thermal reshaping in aqueous media." Nanotechnology 23(10): 105602.
- ¹⁵⁹ Grzelczak, M., J. Perez-Juste, P. Mulvaney, et al. (2008). "Shape control in gold nanoparticle synthesis." Chemical Society Reviews 37(9): 1783-1791.

- ¹⁶⁰ Sau, T. K. and C. J. Murphy (2007). "Role of ions in the colloidal synthesis of gold nanowires." Philosophical Magazine **87**(14-15): 2143-2158
- ¹⁶¹ Wei, Q., J. Ji and J. Shen (2008). "pH Controlled Synthesis of High Aspect-Ratio Gold Nanorods." Journal of Nanoscience and Nanotechnology **8**(11): 5708-5714.
- ¹⁶² Cheng, J., L. Ge, B. Xiong, et al. (2011). "Investigation of pH Effect on Gold Nanorod Synthesis." Journal of the Chinese Chemical Society **58**(6): 822-827.
- ¹⁶³ Sau, T. K. and C. J. Murphy (2004). "Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution." Langmuir **20**(15): 6414-6420.
- ¹⁶⁴ Zhu J Fau - Yong, K.-T., I. Yong Kt Fau - Roy, R. Roy I Fau - Hu, et al. "Additive controlled synthesis of gold nanorods (GNRs) for two-photon luminescence imaging of cancer cells." Nanotechnology **21**(28): 285106
- ¹⁶⁵ Zijlstra, P., C. Bullen, J. W. M. Chon, et al. (2006). "High-Temperature Seedless Synthesis of Gold Nanorods." The Journal of Physical Chemistry B **110**(39): 19315-19318
- ¹⁶⁶ Wu, H.-Y., H.-C. Chu, T.-J. Kuo, et al. (2005). "Seed-Mediated Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods with Nitric Acid." Chemistry of Materials **17**(25): 6447-6451.
- ¹⁶⁷ Altansukh, B, Yao, J., and Wang, D. (2009) "Synthesis and characterization of gold nanorods by a seeding growth method." Journal Nanoscience Nanotechnology **9**(2):1300-3.
- ¹⁶⁸ Kim, F., K. Sohn, J. Wu, et al. (2008). "Chemical Synthesis of Gold Nanowires in Acidic Solutions." Journal of the American Chemical Society **130**(44): 14442-14443.
- ¹⁶⁹ Kawasaki, H., K. Nishimura and R. Arakawa (2007). "Influence of the Counterions of Cetyltrimethylammonium Salts on the Surfactant Adsorption onto Gold Surfaces and the Formation of Gold Nanoparticles." The Journal of Physical Chemistry C **111**(6): 2683-2690
- ¹⁷⁰ Suber, L. and W. R. Plunkett (2010). "Formation mechanism of silver nanoparticle 1D microstructures and their hierarchical assembly into 3D superstructures." Nanoscale **2**(1): 128-133
- ¹⁷¹ Smith, D. K. and B. A. Korgel (2008). "The Importance of the CTAB Surfactant on the Colloidal Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods." Langmuir **24**(3): 644-649.
- ¹⁷² Smith, D. K., N. R. Miller and B. A. Korgel (2009). "Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation." Langmuir **25**(16): 9518-9524
- ¹⁷³ Rayavarapu, R. G., C. Ungureanu, P. Krystek, et al. (2010). "Iodide Impurities in Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) Products: Lot–Lot Variations and Influence on Gold Nanorod Synthesis." Langmuir **26**(7): 5050-5055
- ¹⁷⁴ Millstone, J. E., W. Wei, M. R. Jones, et al. (2008). "Iodide Ions Control Seed-Mediated Growth of Anisotropic Gold Nanoparticles." Nano Letters **8**(8): 2526-2529
- ¹⁷⁵ Balazs, D. A. and W. Godbey (2011). Liposomes for Use in Gene Delivery, Journal Drug Delivery **2011**:326497
- ¹⁷⁶ Raman, N. K., M. T. Anderson and C. J. Brinker (1996). "Template-Based Approaches to the Preparation of Amorphous, Nanoporous Silicas." Chemistry of Materials **8**(8): 1682-1701.
- ¹⁷⁷ Choudhury, S. R., R. Yadav, A. N. Maitra, et al. (1994). "Structural transformations in CTAB aggregated systems investigated by positron lifetime spectroscopy 1. Binary systems." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **82**(1): 49-58.

- ¹⁷⁸ Liu and P. Guyot-Sionnest (2005). "Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids." The Journal of Physical Chemistry B **109**(47): 22192-22200.
- ¹⁷⁹ Liu and P. Guyot-Sionnest (2004). "Synthesis and Optical Characterization of Au/Ag Core/Shell Nanorods." The Journal of Physical Chemistry B **108**(19): 5882-5888.
- ¹⁸⁰ Orendorff, C. J. and C. J. Murphy (2006). "Quantitation of Metal Content in the Silver-Assisted Growth of Gold Nanorods." The Journal of Physical Chemistry B **110**(9): 3990-3994.
- ¹⁸¹ Liu, X.-H., X.-H. Luo, S.-X. Lu, et al. (2007). "A novel cetyltrimethyl ammonium silver bromide complex and silver bromide nanoparticles obtained by the surfactant counterion." Journal of Colloid and Interface Science **307**(1): 94-100.
- ¹⁸² Hubert, F., F. Testard and O. Spalla (2008). "Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Bromide Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods." Langmuir **24**(17): 9219-9222.
- ¹⁸³ Chakraborty, M., F.-W. Hsiao, B. Naskar, et al. (2012). "Surfactant-Assisted Synthesis and Characterization of Stable Silver Bromide Nanoparticles in Aqueous Media." Langmuir **28**(18): 7282-7290.
- ¹⁸⁴ Jain, T., R. Roodbeen, N. E. A. Reeler, et al. (2012). "End-to-end assembly of gold nanorods via oligopeptide linking and surfactant control." Journal of Colloid and Interface Science **376**(1): 83-90.
- ¹⁸⁵ Aiello, C., P. Andreozzi, C. La Mesa, et al. (2010). "Biological activity of SDS-CTAB cat-anionic vesicles in cultured cells and assessment of their cytotoxicity ending in apoptosis." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **78**(2): 149-154.
- ¹⁸⁶ Alkilany, A. M., P. K. Nagaria, C. R. Hexel, et al. (2009). "Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects." Small **5**(6): 701-708.
- ¹⁸⁷ Tarantola, M. et al. (2010). "Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells." Nanotoxicology **5**(2): 254-268.
- ¹⁸⁸ Niidome, Y. and T. Niidome (2009). Spectroscopy and Photoreactions of Gold Nanorods in Living Cells and Organisms. Molecular Nano Dynamics, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 669-687.
- ¹⁸⁹ Niidome, Y., K. Honda, K. Higashimoto, et al. (2007). "Surface modification of gold nanorods with synthetic cationic lipids." Chemical Communications(36): 3777-3779.
- ¹⁹⁰ Brust, M. et al. (1994). "Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System", Journal of the Chemical Society, Chemical Communication **1994**(7) : 801-802
- ¹⁹¹ Thierry, B., J. Ng, T. Krieg, et al. (2009). "A robust procedure for the functionalization of gold nanorods and noble metal nanoparticles." Chemical Communications(13): 1724-1726.
- ¹⁹² Wijaya, A. and K. Hamad-Schifferli (2008). "Ligand Customization and DNA Functionalization of Gold Nanorods via Round-Trip Phase Transfer Ligand Exchange." Langmuir **24**(18): 9966-9969.
- ¹⁹³ Wang, Z. L., R. P. Gao, B. Nikoobakht, et al. (2000). "Surface Reconstruction of the Unstable {110} Surface in Gold Nanorods." The Journal of Physical Chemistry B **104**(23): 5417-5420.
- ¹⁹⁴ Busbee, B. D., S. O. Obare and C. J. Murphy (2003). "An Improved Synthesis of High-Aspect-Ratio Gold Nanorods." Advanced Materials **15**(5): 414-416.
- ¹⁹⁵ Jana, N. R., L. Gearheart and C. J. Murphy (2001). "Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods." The Journal of Physical Chemistry B **105**(19): 4065-4067.

- ¹⁹⁶ Xie, J., J. Y. Lee and D. I. C. Wang (2007). "Synthesis of Single-Crystalline Gold Nanoplates in Aqueous Solutions through Biomineralization by Serum Albumin Protein." The Journal of Physical Chemistry C **111**(28): 10226-10232.
- ¹⁹⁷ Radziuk, D., D. Grigoriev, W. Zhang, et al. (2010). "Ultrasound-Assisted Fusion of Preformed Gold Nanoparticles." The Journal of Physical Chemistry C **114**(4): 1835-1843.
- ¹⁹⁸ Wall, J. F. and C. F. Zukoski (1999). "Alcohol-Induced Structural Transformations of Surfactant Aggregates." Langmuir **15**(22): 7432-7437.
- ¹⁹⁹ Pollard, J. M., A. J. Shi and K. E. Göklen (2005). "Solubility and Partitioning Behavior of Surfactants and Additives Used in Bioprocesses." Journal of Chemical & Engineering Data **51**(1): 230-236.
- ²⁰⁰ Mitra, R. K., B. K. Paul and S. P. Moulik (2006). "Phase behavior, interfacial composition and thermodynamic properties of mixed surfactant (CTAB and Brij-58) derived w/o microemulsions with 1-butanol and 1-pentanol as cosurfactants and n-heptane and n-decane as oils." Journal of Colloid and Interface Science **300**(2): 755-764.
- ²⁰¹ Debouttière, P. J., S. Roux, F. Vocanson, et al. (2006). "Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging." Advanced Functional Materials **16**(18): 2330-2339.
- ²⁰² Vanpouille-Box, C., F. Lacoëuille, J. Roux, et al. (2011). "Lipid Nanocapsules Loaded with Rhenium-188 Reduce Tumor Progression in a Rat Hepatocellular Carcinoma Model." PLoS ONE **6**(3): e16926.
- ²⁰³ Mukundan, S. et al. (2006). "A Liposomal Nanoscale Contrast Agent for Preclinical CT in Mice." American Journal of Roentgenology **186**(2): 300-307.
- ²⁰⁴ Elrod, D. B., Partha, R., Danila, D. et al. (2009). "An iodinated liposomal computed tomographic contrast agent prepared from a diiodophosphatidylcholine lipid." Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine **5**(1): 42-45.
- ²⁰⁵ Hallouard, F., Anton, N., Zuber, G. et al. (2011). "Radiopaque iodinated nano-emulsions for preclinical X-ray imaging." RSC Advances **1**(5): 792-801.
- ²⁰⁶ WO2011/061542 A1, Liposome nanoparticles for tumor magnetic resonance imaging (Brevet)
- ²⁰⁷ Huynh, N. T., C. Passirani, P. Saulnier, et al. (2009). "Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine." International Journal of Pharmaceutics **379**(2): 201-209.
- ²⁰⁸ Regev, O., R. Backov and C. Faure (2004). "Gold Nanoparticles Spontaneously Generated in Onion-Type Multilamellar Vesicles. Bilayers-Particle Coupling Imaged by Cryo-TEM." Chemistry of Materials **16**(25): 5280-5285.
- ²⁰⁹ Brevet WO2011/061541 A1 avec numéro d'application internationale PCT/GB2010/051925
- ²¹⁰ Bonnemain, B. (2000). "L'huile iodée (lipiodol) en radiologie. Les premières années d'expérience : 1921-1931." Revue d'histoire de la pharmacie: 493-508.
- ²¹¹ Willekens, I., T. Lahoutte, N. Buls, et al. (2009). "Time-Course of Contrast Enhancement in Spleen and Liver with Exia 160, Fenestra LC, and VC." Molecular Imaging and Biology **11**(2): 128-135.
- ²¹² Torres, M. J., C. Mayorga, J. A. Cornejo-Garcia, et al. (2008). "Monitoring non-immediate allergic reactions to iodine contrast media." Clinical & Experimental Immunology **152**(2): 233-238.
- ²¹³ Dewachter, P. et al. (2009). « Allergie immédiate aux produits de contraste iodés et prévention des réactions », Revue de médecine interne, **30**, 872-881.

- ²¹⁴ Namasivayam, S., M. Kalra, W. Torres, et al. (2006). "Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: a primer for radiologists." Emergency Radiology **12**(5): 210-215.
- ²¹⁵ Meyre, M.E, L. Olivier, D. Bernard, et al. (2006). "Synthesis of stable, gold-particle-containing onion-type multilamellar vesicles. Influence of particle size on the onions' internal structure." Nanotechnology **17**(5): 1193.
- ²¹⁶ Mackiewicz, R. M., R. A. Benjamin and M. R. Scott (2008). "Reversible, reagentless solubility changes in phosphatidylcholine-stabilized gold nanoparticles." Nanotechnology **19**(11): 115607.
- ²¹⁷ Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B. et al. (2002). "A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers." Pharmaceutical Research **19**(6): 875-880.
- ²¹⁸ Henrichsen, T., P. H. H. Lindenskov, T. H. Shaffer, et al. (2012). "Perfluorodecalin lavage of a longstanding lung atelectasis in a child with spinal muscle atrophy." Pediatric Pulmonology **47**(4): 415-419.
- ²¹⁹ Price, C.D. et al. (2008). "The Evaluation of the Efficacy of Oxygen® as an Oxygen-Carrying Substitute on Cerebral Blood Flow", The Open Hematology Journal, **2**, 62-66
- ²²⁰ Spahn, D. R. (1999). "Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions." Critical Care **3**(5): R93 - R97.
- ²²¹ Research Imaging Institute, University of Texas Health Science
- ²²² Hall, E. J. and A. J. Giaccia (2006). Radiobiology For The Radiologist, Lippincott Williams & Wilkins.
- ²²³ R. Nagarajan, T. Alan Hatton, (2008). "Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization", American Chemical Society, symposium series. 996: i-v, p4 et p5 (ISBN 978-0-8412-6969-9)
- ²²⁴ Afsset (2008). "Nanomatériaux et sécurité au travail"
- ²²⁵ d'Azyr, V. (1827). Encyclopédie méthodique ou par ordre de matières: médecine, volume 12, Panckoucke.
- ²²⁶ A. Soret (1903). Le tube de Crookes: applications médicales et chirurgicales des rayons de Roentgen; de la précision dans les méthodes radiographiques, Imprimerie du Journal Le Havre (O. Randolet, Imprimeur)
- ²²⁷ Villard, P. (1900). Les rayons cathodiques, C. Naud.
- ²²⁸ Orschall, J. C. (1742). Sol sine veste oder: 30 Experimenta dem Gold seinen Pupur auszuziehen.
- ²²⁹ Faraday, M. (1857). "The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light." Philosophical Transactions of the Royal Society **147**: 145-181.
- ²³⁰ Turkevich, J., P. C. Stevenson and J. Hillier (1951). "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold." Discussions of the Faraday Society **11**(0): 55-75.
- ²³¹ Frens, G. (1973). "Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions." Nature Physical Science **241**: 20 - 22.
- ²³² Rodríguez-Fernández, J., J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, et al. (2005). "Spatially-Directed Oxidation of Gold Nanoparticles by Au(III)–CTAB Complexes." The Journal of Physical Chemistry B **109**(30): 14257-14261.
- ²³³ Samal, A., T. Sreepasad and T. Pradeep (2010). "Investigation of the role of NaBH₄ in the chemical synthesis of gold nanorods." Journal of Nanoparticle Research **12**(5): 1777-1786.

- ²³⁴ Sharma, V., K. Park and M. Srinivasarao (2009). "Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly." Materials Science and Engineering: R: Reports **65**(1–3): 1-38.
- ²³⁵ Lee, J.-H., K. Kamada, N. Enomoto, et al. (2007). "Morphology-selective synthesis of polyhedral gold nanoparticles: What factors control the size and morphology of gold nanoparticles in a wet-chemical process." Journal of Colloid and Interface Science **316**(2): 887-892.
- ²³⁶ Nikoobakht, B. and M. A. El-Sayed (2003). "Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method." Chemistry of Materials **15**(10): 1957-1962.
- ²³⁷ Habib, A. and M. Tabata (2004). "Oxidative DNA damage induced by HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) buffer in the presence of Au(III)." Journal of Inorganic Biochemistry **98**(11): 1696-1702.
- ²³⁸ Habib, A., M. Tabata and Y. G. Wu (2005). "Formation of Gold Nanoparticles by Goods Buffers." Bulletin of the Chemical Society of Japan **78**(2): 262-269
- ²³⁹ Xie, J., J. Y. Lee and D. I. C. Wang (2007). "Seedless, Surfactantless, High-Yield Synthesis of Branched Gold Nanocrystals in HEPES Buffer Solution." Chemistry of Materials **19**(11): 2823-2830.
- ²⁴⁰ Chen, R., J. Wu, H. Li, et al. (2010). "Fabrication of gold nanoparticles with different morphologies in HEPES buffer." Rare Metals **29**(2): 180-186.
- ²⁴¹ Kumar, V. and S. K. Yadav (2009). "Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **84**(2): 151-157.
- ²⁴² Anaruma, N. D., F. L. Schmidt, M. C. T. Duarte, et al. (2010). "Control of Colletotrichum gloeosporioides (penz.) Sacc. In yellow passion fruit using Cymbopogon citratus essential oil." Brazilian Journal of Microbiology **41**: 66-73.
- ²⁴³ Shankar, S. S., A. Rai, A. Ahmad, et al. (2005). "Controlling the Optical Properties of Lemongrass Extract Synthesized Gold Nanotriangles and Potential Application in Infrared-Absorbing Optical Coatings." Chemistry of Materials **17**(3): 566-572.
- ²⁴⁴ Shankar, S. S., A. Rai, B. Ankamwar, et al. (2004). "Biological synthesis of triangular gold nanoprisms." Nature Materials **3**(7): 482-488.
- ²⁴⁵ Smith, D. K. and B. A. Korgel (2008). "The Importance of the CTAB Surfactant on the Colloidal Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods." Langmuir **24**(3): 644-649.
- ²⁴⁶ Smith, D. K., N. R. Miller and B. A. Korgel (2009). "Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation." Langmuir **25**(16): 9518-9524, doi: 10.1021/la900757s
- ²⁴⁷ Rayavarapu, R. G., C. Ungureanu, P. Krystek, et al. (2010). "Iodide Impurities in Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) Products: Lot–Lot Variations and Influence on Gold Nanorod Synthesis." Langmuir **26**(7): 5050-5055, doi: 10.1021/la100166f
- ²⁴⁸ Millstone, J. E., W. Wei, M. R. Jones, et al. (2008). "Iodide Ions Control Seed-Mediated Growth of Anisotropic Gold Nanoparticles." Nano Letters **8**(8): 2526-2529, doi: 10.1021/nl8016253
- ²⁴⁹ Krimm, S. (1980). "The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 pp. price: \$18.50." Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition **18**(10): 687-687.

- ²⁵⁰ Mata, J., D. Varade and P. Bahadur (2005). "Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants." Thermochimica Acta **428**(1–2): 147-155.
- ²⁵¹ Candau, S. J., E. Hirsch and R. Zana (1984). "New aspects of the behaviour of alkyltrimethylammonium bromide micelles : light scattering and viscosimetric studies." Journal de Physique France **45**(7): 1263-1270.
- ²⁵² Modaressi, A., H. Sifaoui, B. Grzesiak, et al. (2007). "CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **296**(1–3): 104-108.
- ²⁵³ Pérez-Juste, J., L. M. Liz-Marzán, S. Carnie, et al. (2004). "Electric-Field-Directed Growth of Gold Nanorods in Aqueous Surfactant Solutions." Advanced Functional Materials **14**(6): 571-579
- ²⁵⁴ Murphy, C. J., L. B. Thompson, D. J. Chernak, et al. (2011). "Gold nanorod crystal growth: From seed-mediated synthesis to nanoscale sculpting." Current Opinion in Colloid & Interface Science **16**(2): 128-134.
- ²⁵⁵ Niu, W. and G. Xu (2011). "Crystallographic control of noble metal nanocrystals." Nano Today **6**(3): 265-285.
- ²⁵⁶ Niidome, Y., Y. Nakamura, K. Honda, et al. (2009). "Characterization of silver ions adsorbed on gold nanorods: surface analysis by using surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Chemical Communications(13): 1754-1756.
- ²⁵⁷ Chen, H. M., R.-S. Liu and D. P. Tsai (2009). "A Versatile Route to the Controlled Synthesis of Gold Nanostructures." Crystal Growth & Design **9**(5): 2079-2087.
- ²⁵⁸ Elding, L. and A. GRQNING (1978). "Kinetics, Mechanism and Equilibria for Halide Substitution Processes of Chloro Bromo Complexes of Gold (III)." Acta Chemica Scandinavia A **32**(9) : 867-877.
- ²⁵⁹ Marilyn, R. M., R. A. Benjamin and M. R. Scott (2008). "Reversible, reagentless solubility changes in phosphatidylcholine-stabilized gold nanoparticles." Nanotechnology **19**(11): 115607.
- ²⁶⁰ Alkilany, A. and C. Murphy (2010). "Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?" Journal of Nanoparticle Research **12**(7): 2313-2333.
- ²⁶¹ Sharma, V., K. Park and M. Srinivasarao (2009). "Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly." Materials Science and Engineering: R: Reports **65**(1–3): 1-38.
- ²⁶² Bloch, I. "Reconstruction d'images de tomographie", cours dispensé depuis 2007 à Telecom ParisTech
- ²⁶³ A Pandey, A. K. and G. S. Pant (2004). "Standardization of SPECT filter parameters." Indian Journal of Nuclear Medicine **19**: 30-35.
- ²⁶⁴ Lyra, M. and A. Ploussi (2011). "Filtering in SPECT Image Reconstruction." International Journal of Biomedical Imaging 2011, Article ID 693795, 14 pages
- ²⁶⁵ Xiao, F., F. Wang, , X. Fu et al. (2012) "A green and facile self assembly preparation of gold nanoparticles ZnO nanocomposite for photocatalytic and photoelectrochemical applications" Journal of Materials Chemistry **22**(7): 2868-2877