

INK-JET PRINTED MESOPOROUS SILICA MICRODOTS ON OPTICAL FIBER: TOWARDS ENDOSCOPIC DEVICES FOR EARLY DETECTION AND THERAPY OF CANCER

ACHRAF NOUREDDINE¹, JULIEN GRAFFION¹, ROMAIN TRIHAN¹, OLIVIA DE LOS COBOS¹,
MARTINE LEJEUNE¹¹, FABRICE ROSSIGNOL¹, CLAIRE LEFORT², LUDOVIC MICALLEF³,
HUSSEIN AKIL², FABRICE LALLOUÉ³, JÉRÔME DESROCHES⁴, OLIVIER BAUDET⁴,
MARION PONCELET⁵

¹*Ecole Nationale Supérieure de Céramique Industrielle ENSCI, Laboratoire Sciences et
Procédés Céramiques et Traitement de Surface SPCTS UMR 7315. 12, Rue Atlantis 87068
Limoges, France*

²*Institut de Recherche XLim-UMR CNRS 7252. 123, Avenue Albert Thomas 87060
Limoges, France*

³*Université de Limoges, Faculté de Pharmacie, Laboratoire Homéostasie Cellulaire et
Pathologie HCP- EA 3842. 2, Rue du Dr. Marcland 87025 Limoges, France*

⁴*KamaxInnovative Systems. 12, Rue de Gémini 87280 Limoges, France*

⁵*Ceradrop, 32 rue de Soyouz, Parc d'ESTER, 87068 Limoges, France*

Abstract: In the present work, the objective is to develop a biosensor on the tip of optical fiber-based endoscopic device capable to detect the presence of tumors at an early stage. The innovative approach is to use the flexibility and the resolution of the inkjet printing process combined to Evaporation-Induced Self-Assembly (EISA) to achieve appropriate mesoporous silica microdots arrays functionalized by click chemistry for detection of cancers. As for this specific application, bio-receptors labeled with fluorophores are anchored to the surface of the mesoporous silica. Thus, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) is induced when bio-receptors interact with the tumor cells' biomarker of interest. The preliminary results are obtained on glass substrates. Currently, the work is ongoing to transpose the concept on optical fibers and to be ready for non-invasive clinical tests.

Keywords: cancer diagnosis, endoscopic probe, optical fiber, ink-jet printing, functional silica microdots, FRET

1. INTRODUCTION

La détection et le traitement précoce des cancers présentent un intérêt sociétal majeur à la fois pour l'identification de la pathologie en elle-même et pour l'orientation du traitement et l'optimisation de son efficacité de façon rapide, fiable, faiblement invasive et applicable à grande échelle. Dans ce contexte, un système endoscopique utilisable en clinique et viable à long terme est en cours de développement destinés au diagnostic et à la thérapie de cancers colorectaux (CCR) et des voies aérodigestives supérieures (VADS). Le

¹ Corresponding author e-mail : martine.lejeune@unilim.fr

principe général développé ici réside sur la combinaison des atouts des techniques endoscopiques connues en optique avec celle de l'impression jet d'encre et de la physico-chimie de la silice mésoporeuse biofonctionnalisée^[1] et compatible vis-à-vis du vivant. L'originalité du travail présenté ici porte donc principalement sur la biofonctionnalisation de la fibre endoscopique. Ainsi, le dépôt de microplots biofonctionnalisés en son extrémité distale permettra la détection immédiate de cellules tumorales *in vivo* sur des zones préalablement identifiées lors d'un examen endoscopique classique maîtrisé par les chirurgiens. L'aspect diagnostique de cette sonde permet donc d'éviter une biopsie classique invasive qui allonge la durée entre l'examen et la pose du diagnostic. Le travail présenté ici concerne l'optimisation de la détection de tumeurs par des microplots biofonctionnalisés. Le principe global réside sur l'interaction entre des antigènes recombinants TrkB et l'anticorps anti-TrkB spécifique aux cellules cancéreuses (CCR et VADS) qui produit un effet FRET dont la caractérisation spectrale, largement maîtrisée, cible la présence de cellules tumorales. Une étude systématique sur l'optimisation des microplots biofonctionnalisés est réalisée. Des microplots de silice mésoporeuse sont déposés par une imprimante 3D sur un substrat de verre (fig.1.a). La silice est ensuite fonctionnalisée par une molécule (NHS) active pour la bio-fonctionnalisation. Le complexe protéine G-Anticorps anti-TrkB marqué par deux fluorophores est ensuite greffé. Le concept de détection des cellules cancéreuses exprimant l'antigène TrkB, caractéristique des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS), est basé sur une modification de la conformation de l'anticorps anti-TrkB en rapprochant les fluorophores et induisant un phénomène de FRET^[2] détecté par microscopie confocale (fig.1.b).

2. MONTAGE EXPÉRIMENTAL

La figure 1 illustre les dispositifs utilisés dans a) l'impression des microplots sur substrats (lamelles de verre ou fibre optique) et dans b) la détection de la fluorescence à la surface des plots après biofonctionnalisation.

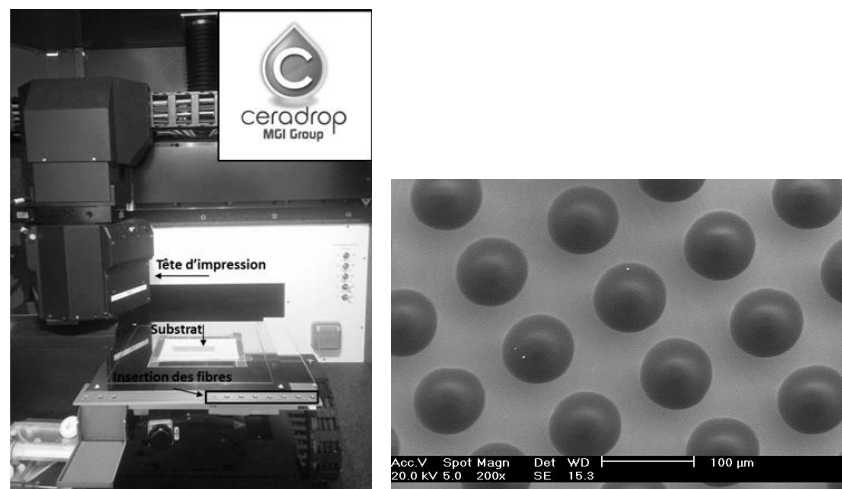


Fig.1.a : Le dispositif d'impression utilisé pour le dépôt des microplots (Ceraprinter X-Série M070002L, Ceradrop, Limoges, France) et un exemple (droite) de réseaux imprimés de microplots de silice mésoporeuse

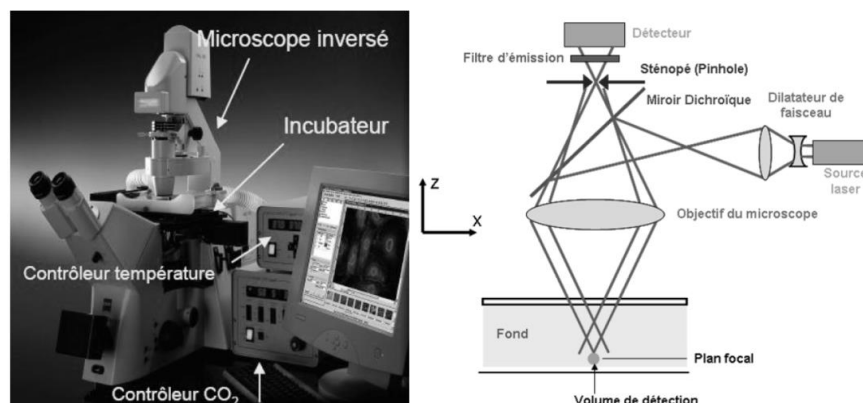


Fig.1.b : Le microscope confocal de type Zeiss LSM 510 META utilisé et son principe de fonctionnement.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Bien que le dispositif final fasse appel à une fibre optique, l'optimisation du procédé a été réalisée dans une première étape sur des lamelles de verre de microscope possédant une surface avec des caractéristiques similaires à celles de la fibre, puis la phase de transfert sur fibres optiques a été amorcée.

La première étape de greffage sur la silice mésoporeuse des fonctions actives (NHS) pour la biofonctionnalisation a été démontrée par spectroscopie infrarouge (IR) à transmission (fig. 2).

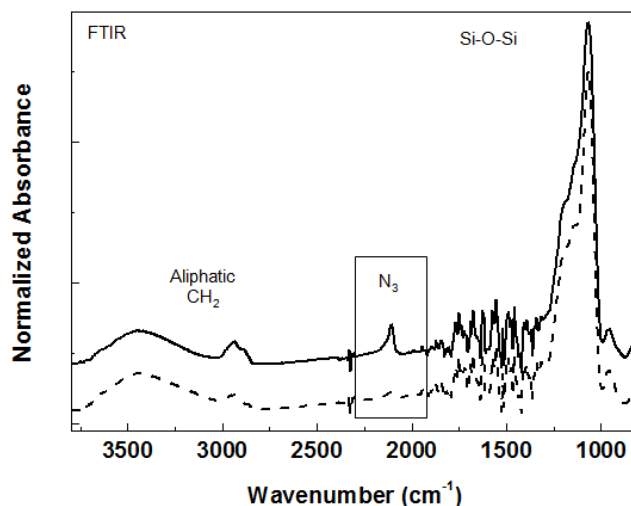


Fig.2: Spectres IR des microplots (ligne continue) avant et (ligne pointillée) après greffage des fonctions NHS. L'incorporation de NHS est montrée par l'extinction de la bande de N_3 à 2100 cm^{-1}

La phase de biofonctionnalisation par des protéines G puis des anticorps a été ensuite validée par microscopie à force atomique (AFM) qui indique une nette augmentation de la rugosité de surface induite par la présence de plusieurs îlots de complexes protéine G-anticorps (fig.3).

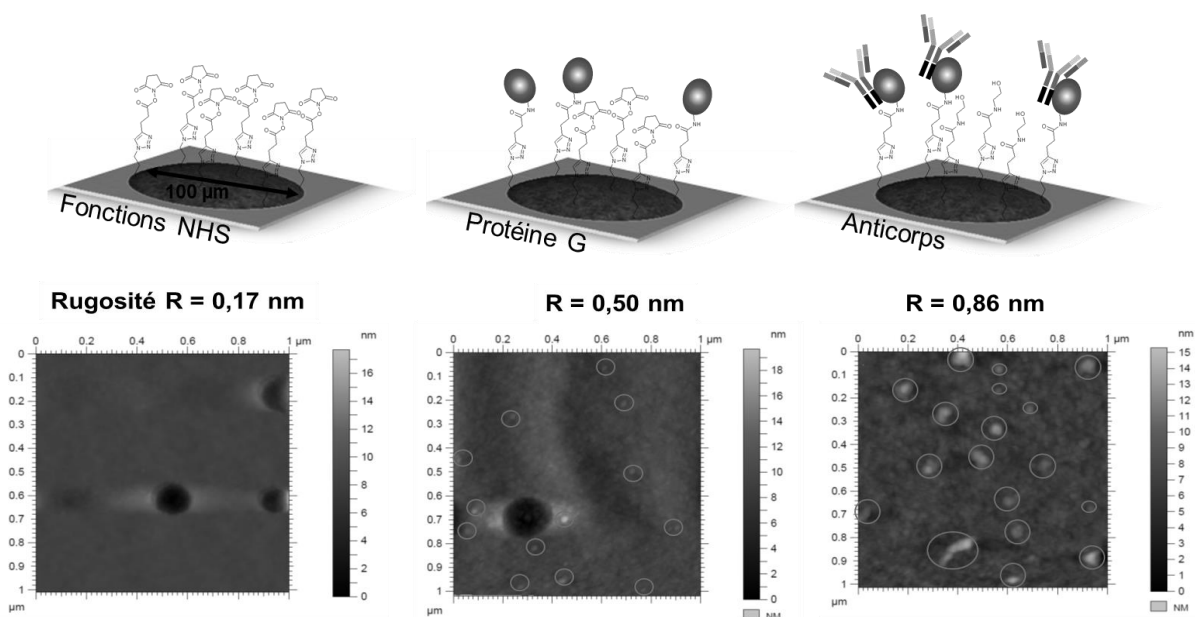


Fig.3 : Evolution de la rugosité à la surface des microplots suite aux greffages successifs

Dans cette procédure et à chaque étape de bio-fonctionnalisation, les spectres obtenus en microscopie confocale valident la présence de l'entité marquée et que le transfert d'énergie (FRET) n'est induit qu'en présence de l'antigène spécifique qui change la conformation de l'anticorps en rapprochant les deux

fluorophores vers leur distance de Förster (7 nm) (Fig4). Ceci permet de valider le mode de détection par effet FRET sur lamelles de verre et ouvre la voie sur les potentialités d'utilisation d'une fibre optique fonctionnalisée comme sonde endoscopique de diagnostic pour les organismes vivants.

L'impression de microplots sur une fibre optique a été réalisée avec succès. Les fibres optiques ont ensuite subi les différents traitements préalables à la bio-fonctionnalisation sans subir de dégradation.

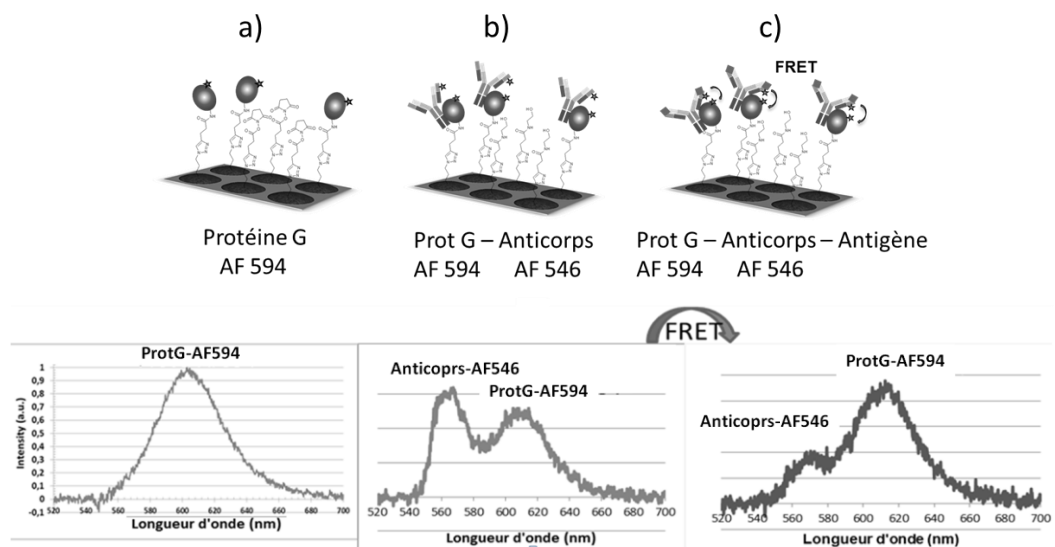


Fig.4 : Evolution de la fluorescence des microplots suite aux greffages successifs de la protéine G-AF594 (a), complexe Protéine G AF594 – Anticorps AF 546 avant (b) et après (c) interaction avec l'antigène.

4. CONCLUSIONS

Le développement d'une sonde endoscopique pour le dépistage précoce de tumeurs des VADS est en cours de développement. L'originalité de cette sonde réside sur le rapprochement entre une technique d'endoscopie optique bien connue par fibre optique avec une technique de biofonctionnalisation de surface permettant le dépistage de cellules tumorales par l'identification spectrale de l'effet FRET.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence que le dépôt sur lamelles de verre par impression jet d'encre de microplots de silice mésoporeuse suivi d'une étape de bio-fonctionnalisation par un complexe Protéine G marquée AF594 – Anticorps anti-TrkB marqué AF 546 permettait de détecter des antigènes recombinant TrkB par un phénomène de FRET en présence de cellules tumorales. Cela constitue un résultat préliminaire majeur et incontournable dans la poursuite du développement de cette méthode. Le transfert de cette technique sur fibres optiques est en cours.

RÉFÉRENCES :

- [1] O. De Los Cobos, B. Fousseret, M. Lejeune, F. Rossignol, M. Dutreilh-Colas, C. Carrion, C. Boissière, F. Ribot, C. Sanchez, X. Cattoën, M. Wong Chi Man, and J.-O. Durand, TunableMultifunctional Mesoporous SilicaMicrodotsArrays by Combination of Inkjet Printing, EISA, and Click Chemistry, *Chemistry ofMaterials*, **24**, 4337 (2012).
- [2] O. De Los Cobos, M. Lejeune, F. Rossignol, J. Graffion, P. Faugeras, J. Vincent, F. Lalloué, and H. Akil, Dispositif photoactif permettant la détection et la transformation d'éléments chimiques à son contact, Brevet N°13/01417.