



HAL
open science

Nanoparticules multimodales à base de lanthanides pour l'imagerie biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses

Julien Santelli

► To cite this version:

Julien Santelli. Nanoparticules multimodales à base de lanthanides pour l'imagerie biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses. Biotechnologies. UPS Toulouse - Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2018. Français. NNT : . tel-01808556

HAL Id: tel-01808556

<https://hal.science/tel-01808556v1>

Submitted on 5 Jun 2018

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Julien Santelli

Le jeudi 12 avril 2018

Titre :

Nanoparticules multimodales à base de lanthanides pour l'imagerie
biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses

ED SDM : Chimie, Biologie, Santé - CO 042

Unité de recherche :

CEMES - CNRS UPR8011 | I2MC Equipe 6 - INSERM U1048

Directeur(s) de Thèse :

Pr. Marc Verelst
Dr. Robert Mauricot

Rapporteurs :

Dr. Rachid Mahiou
Pr. Florence Sabatier

Autre(s) membre(s) du jury :

Dr. Frédéric Deschaseaux (examineur et président du jury)
Pr. Laurence Motte (examineur)
Pr. Daniel Cussac (invité)

à Patrick

à Anne Catherine

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés en collaboration avec le Centre d'Élaboration de Matériaux et d'Études Structurales (CEMES) sous la direction du Pr. Marc Verelst et du Dr. Robert Mauricot, l'équipe microenvironnement stromal et insuffisance cardiaque (équipe 6) de l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) dirigée par le Pr. Angelo Parini et le Pr. Daniel Cussac ainsi que la société Chromalys dirigée par le Pr. Marc Verelst. Je tiens à les remercier de m'avoir accueilli dans leurs équipes.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux membres du jury : le Dr. Rachid Mahiou et le Pr. Florence Sabatier pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs ainsi que le Dr. Frédéric Deschaseaux en qualité d'examineur et président du jury et le Pr Laurence Motte en qualité d'examinatrice.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, le Pr. Marc Verelst et le Dr. Robert Mauricot, pour m'avoir permis de mener à bien ces travaux, pour avoir cru en moi et pour m'avoir laissé une grande liberté d'action. Je tiens également à remercier chaleureusement le Pr. Daniel Cussac, mon directeur de thèse non-officiel, qui a su m'épauler au quotidien, me prêter une oreille attentive, me prodiguer ses précieux conseils et me recentrer lors de mes moments d'égarement avec son tact et sa diplomatie renommés.

Mes travaux ayant été en partie financés par la région Midi-Pyrénées, je tiens à adresser mes remerciements pour ce soutien considérable.

Je remercie tous les membres de l'équipe 6 de l'I2MC où j'ai passé la majorité de mes années de thèse :

Le Dr. Victorine Douin pour ses conseils, ses blagues et son chocolat. Le Dr. Nathalie Pizzinat et le Dr. Lise Lefèvre pour leur bonne humeur et leur disponibilité. Dimitri Marsal pour sa joie de vivre mais également son savoir-faire, sa technicité et son travail exceptionnel sans lequel je n'aurais pas pu mener à bien toutes mes expériences. Marianne Dutaur qui nous manque énormément et qui gère avec brio beaucoup d'aspects de l'équipe avec une rigueur sans pareil, reviens-nous vite. Raya Bushkalova pour son infinie gentillesse. Caroline Ceccaldi pour des conseils professionnels et pour m'avoir formé à l'isolement des MSCs. Marine Vincent pour avoir été une stagiaire exemplaire, toujours motivée et curieuse et qui a su

apporter sa pierre à l'édifice par ses questionnements et ses résultats. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de t'encadrer, ce fut pour moi une expérience grandissante. Et enfin les copains Damien Maggiorani, Hélène Martini et Mathilde Bizou. Sans vous, ces années auraient été bien mornes. Merci pour ces soirées endiablées, ces rigolades et ces discussions. Une mention particulière à Damien pour avoir été présent dans les moments difficiles, pour m'avoir soutenu moralement, pour avoir su m'écouter et pour toutes les discussions philosophiques et filmiques qu'on a pu avoir.

Bien évidemment je tiens à remercier les membres de Chromalys :

Séverine Lechevallier pour toutes ces synthèses (de dernière minute), ces explications de mécanismes, ces calculs qui m'ont fait vriller les neurones, ces expériences à rallonge (ICP toi-même tu sais) mais aussi et surtout pour la correction de cette thèse. Je ne sais pas si je m'en serais sorti sans toi. Cyril Martinez pour sa gentillesse, ses synthèses (qui ont pu te faire rager) et pour m'avoir toujours proposé son aide dès qu'il le pouvait. Houda Baaziz que je n'ai jamais rencontrée mais qui a ouvert la voie de cette aventure.

Les copains du CEMES Barthélémy Pradines, Thomas Garandel et Xavier Fenouillet pour nos discussions sur la physique quantique et pour avoir essayé de m'éclairer sur le côté obscur de vos modélisations. Xavier, ce voyage en Irlande et cette randonnée dans le Connemara jusqu'au bout de nos forces fût pour moi une expérience unique.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont participé aux aspects techniques de ces travaux :

Denis Calise pour son expérience inestimable en microchirurgie sans qui nous n'aurions tout simplement pas pu obtenir ces résultats, pour son humour qui a rendu toutes ces séances d'imagerie bien moins pénible mais également pour nos discussions sur des domaines divers et variés.

Madjid Zanoun pour son aide précieuse en microscopie(s) et pour ses conseils sur le traitement des images.

Franck Desmoulin et Carine Pestourie qui se sont démenés pour mener à bien l'imagerie IRM et TDM.

Aurore siegfried pour son aide pour l'analyse de coupes histologiques.

Merci également à Dina Arvanitis pour sa gentillesse et pour m'avoir fait prendre conscience de l'importance de voir la science comme un domaine collaboratif.

Pour finir, un immense merci à ma famille pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles, pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin et pour avoir tenté de comprendre en quoi consistait mon travail. Helena, Romain vous êtes un modèle pour moi. Lia et Ornéla vous êtes mes rayons de soleil. Vous voir grandir et évoluer est pour moi une fierté. Maman, je crois que ne pourrais jamais exprimer l'ampleur de ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi (pour nous).

Papa, tu me donnes la force d'avancer, toujours au-dessus de mon épaule à veiller sur moi.



Table des matières

I.	Introduction générale	1
II.	Etat de l'art.....	4
A.	Applications des nanotechnologies en biologie et santé.....	4
1.	Thérapie.....	5
2.	Analyse.....	6
3.	Imagerie.....	6
B.	Principes et applications des méthodes d'imagerie biomédicale.....	7
1.	La fluorescence	7
2.	L'imagerie par résonance magnétique.....	10
3.	La tomodensitométrie	13
4.	Imagerie nucléaire (Tomographie par émission de positons et tomographie par émission monophotonique).....	15
5.	L'échographie	16
6.	La multimodalité.....	17
C.	Les nanoparticules à base de lanthanides : apports et avantages pour l'imagerie biologique	19
1.	Généralités sur les lanthanides	19
2.	Applications en imagerie	21
D.	La thérapie cellulaire	23
1.	Origines des cellules utilisées en thérapie	23
2.	Les cellules stromales mésenchymateuses	25
E.	Traceurs cellulaires et thérapie.....	27
1.	Gènes rapporteurs.....	27
2.	Nanoparticules.....	27
F.	Projet de thèse	28
1.	Cahier des charges pour le développement d'un nouveau traceur pour la biologie	29
2.	Présentation des candidats	31
III.	Développement d'outils pour l'imagerie biologique	33
A.	Introduction.....	33
B.	Synthèse des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium (Gd_2O_2S)	34
C.	Caractérisation physico-chimique.....	35
1.	Matrice d'oxysulfure de gadolinium.....	35
2.	Propriétés optiques des dopants.....	38
D.	Système d'imagerie proche infrarouge personnalisé	43
1.	Mise au point de l'imageur.....	43
2.	Développement de la méthode d'injection dans un organe solide	47
E.	Conclusion	52
IV.	Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique	53
A.	Introduction.....	53
B.	Oxysulfures de gadolinium dopés europium ($Gd_2O_2S:Eu^{3+}$)	53
1.	Suivi de la biodistribution par imagerie par résonance magnétique	53
2.	Métabolisme et effets secondaires	55

C.	Oxysulfures de gadolinium dopés ytterbium thulium ($Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$)	58
1.	Suivi de la biodistribution par imagerie proche infrarouge	58
2.	Impact sur la santé des animaux	69
D.	Conclusion	70
V.	Marquage et suivi cellulaire	73
A.	Introduction.....	73
B.	Mise au point du marquage cellulaire <i>in vitro</i> : $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$	73
1.	Marquage cellulaire polyvalent	73
2.	Marquage des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse	76
3.	Fiabilité du marquage	81
4.	Vieillessement des nanoparticules	83
5.	Imagerie cellulaire multimodale.....	85
C.	Suivi des cellules stromales mésenchymateuses <i>in vivo</i> : $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$	87
1.	Suivi des MSCs au cours du temps par fluorescence proche infrarouge	88
2.	Imagerie multimodale	92
D.	Conclusion	98
VI.	Conclusion générale	99
VII.	Perspectives.....	101
A.	Améliorations du système d'imagerie proche infrarouge	101
B.	Améliorations de la tolérance des NPs	102
C.	Améliorations du marquage cellulaire	102
D.	Améliorations du suivi des cellules injectées.....	103
E.	Applications biomédicales.....	103
VIII.	Valorisation des travaux.....	104
A.	Publications scientifiques	104
B.	Brevets.....	104
C.	Communications orales.....	104
IX.	Techniques de caractérisation	106
A.	Diffraction des rayons X	106
B.	Spectrophotométrie	106
C.	Microscopie électronique	107
1.	Microscopie électronique à transmission	107
2.	Microscopie électronique à balayage.....	108
D.	Spectrométrie à plasma induit	108
1.	Spectrométrie à Emission Optique couplée à l'ICP (ICP-OES)	108
2.	Spectrométrie de Masse couplée à l'ICP (ICP-MS)	108
X.	Procédures expérimentales	109
A.	Réactifs	109
B.	Préparation des nanoparticules	109
1.	Synthèse des carbonates de gadolinium	109
2.	PEGylation pour injection <i>in vivo</i>	110
C.	Système d'imagerie proche infrarouge personnalisé	111
D.	Représentation visuelle des clichés d'imagerie proche infrarouge	113

E.	Animaux.....	114
F.	Utilisation des NPs PEG- Gd ₂ O ₂ S :Eu ³⁺ <i>in vivo</i>	115
1.	Suivi de la biodistribution par IRM chez la souris.....	115
2.	Etude de l'excrétion et des effets secondaires chez le lapin	115
G.	Utilisation des NPs PEG- Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ /Tm ³⁺ <i>in vivo</i>	117
1.	Suivi de la biodistribution par fluorescence proche-infrarouge chez le rat.....	117
2.	Etude de l'excrétion et des effets secondaires chez le rat.....	117
H.	Coupes histologiques	117
I.	Préparation des échantillons pour dosage ICP	117
J.	Culture cellulaire	118
K.	Marquage cellulaire <i>in vitro</i> avec nanoparticules.....	119
L.	Etude du marquage cellulaire	120
1.	Vidéomicroscopie	120
2.	Microscopie de fluorescence.....	120
3.	Microscopie électronique.....	120
4.	Marquage des lysosomes	120
5.	Etude de la rétention cellulaire	120
6.	Phantoms cellulaires pour IRM.....	121
M.	Evaluation de la toxicité cellulaire des NPs Gd ₂ O ₂ S :Eu ³⁺	121
1.	MTT.....	121
2.	Rouge neutre	121
3.	Wound healing.....	122
4.	Différenciation	122
N.	Suivi des MSCs <i>in vivo</i> avec NPs Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ /Tm ³⁺	124
1.	Préparation et injection des cellules	124
2.	Injection de cellules dans le parenchyme rénal	124
3.	Imagerie multimodale	124
O.	Analyse statistique.....	125
XI.	Analyses semi-automatique des images avec imageJ/FIJI	126
A.	Diamètre des nanoparticules	126
B.	Segmentation du contraste de phase	127
1.	Marquage cellulaire.....	128
2.	Wound healing.....	129
XII.	Références bibliographiques.....	131

Liste des figures

Figure I.1. L'échelle nanométrique.....	1
Figure II.1. Compositions des nano-objets utilisés en biologie et médecine.....	4
Figure II.2. Mécanisme classique de fluorescence.....	8
Figure II.3. Coefficients d'absorption optique des composants des tissus biologiques	9
Figure II.4. Fluorescence par conversion ascendante de photons.....	10
Figure II.5. Principe de l'imagerie par résonance magnétique	11
Figure II.6. Fonctionnement de la tomodensitométrie.....	14
Figure II.7. Capacité d'atténuation des rayons X des tissus biologique.....	14
Figure II.8. Coefficients d'atténuation des rayons X des différents éléments.....	15
Figure II.9. Principe de l'échographie.....	17
Figure II.10. Le groupe des lanthanides dans la classification périodique des éléments.	19
Figure II.11. Diagrammes d'énergie partielle des ions lanthanides.....	20
Figure II.12. Origine des cellules souches embryonnaires.....	24
Figure II.13. Types cellulaires utilisés lors d'essais cliniques de thérapie cellulaires.....	25
Figure II.14. Arbre décisionnel pour l'évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules .	31
Figure III.1. Diffractogramme de rayons X de poudres de NPs.....	36
Figure III.2. Représentation de la structure Gd ₂ O ₂ S	37
Figure III.3. Morphologie et taille des nanoparticules	37
Figure III.4. Propriétés des nanoparticules en imagerie	38
Figure III.5. Spectres de luminescence de Gd ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	39
Figure III.6. Spectre d'émission de fluorescence des Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ (2 ; 4 ; 10%)/Tm ³⁺ (0,1%).	41
Figure III.7. Spectre d'émission de fluorescence des Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ (4%)/Tm ³⁺ (0,05 ; 0,1 ; 0,5%)	42
Figure III.8. Diagramme des niveaux énergétiques au sein du couple de dopants ytterbium/thulium.....	43
Figure III.9. Système d'imagerie personnalisé	45
Figure III.10. Détection de fluorescence des Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ /Tm ³⁺ inclus en « phantoms »	46
Figure III.11. Détection des Gd ₂ O ₂ S :Yb ³⁺ /Tm ³⁺ <i>in vivo</i>	47
Figure III.12. Contraintes rencontrées lors de la mise au point du protocole	49

Figure III.13. Mise au point du protocole expérimental d'injection des $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ dans le cortex rénal	50
Figure III.14. Suivi au cours du temps des $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ <i>in vivo</i>	51
Figure III.15. Détection ponctuelle des MSCs marquées aux $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ <i>in vivo</i>	51
Figure IV.1. Distribution des PEG- $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ chez la souris C57BL/6J suivi par IRM	55
Figure IV.2. Coupes histologiques des principaux organes.....	56
Figure IV.3. Effet des Nanoparticules PEG- $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ chez le lapin Crl:KBL(NZW).....	56
Figure IV.4. Stabilité des nanoparticules en milieu biologique.....	58
Figure IV.5. Chronologie du protocole d'étude du métabolisme des PEG- $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$	59
Figure IV.6. Injection intraveineuse de NPs PEG- $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$	60
Figure IV.7. Distribution des PEG- $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ au cours de l'injection intraveineuse..	61
Figure IV.8. Zones d'acquisition du signal au cours du temps	62
Figure IV.9. Suivi de la distribution des NPs par fluorescence	63
Figure IV.10. Evolution du signal de fluorescence au cours du temps	64
Figure IV.11. Distribution et excrétion des NPs	65
Figure IV.12. Extrapolation de l'élimination de gadolinium chez les animaux traités aux NPs	66
Figure IV.13. Quantification du ratio signal/bruit en surface des organes prélevés	67
Figure IV.14. Signal de fluorescence sur organes prélevé après sacrifices.....	68
Figure IV.15. Quantité totale de Gd dans chaque organe prélevé	68
Figure IV.16. Impact des NPs sur la santé des animaux.....	70
Figure IV.17. Métabolisme des NPs Gd_2O_2S au sein de l'organisme	72
Figure V.1. Marquage de différents types cellulaires avec $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$	75
Figure V.2. Diamètres des différents lots de nanoparticules.....	76
Figure V.3. Impact de la taille et de la concentration des NPs sur le marquage cellulaire.....	77
Figure V.4. Viabilité des MSCs après 24h de marquage aux $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$	78
Figure V.5. Test de « Wound healing »	80
Figure V.6. Différenciation des MSCs	81
Figure V.7. Marquage des MSCs aux $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$	82
Figure V.8. Images de fluorescence de co-culture des MSCs.....	83
Figure V.9. Vieillessement des nanoparticules en milieux aqueux et/ou acide	84
Figure V.10. Relargage du Gd ionique dosé dans le surnageant de nanoparticules	84

Figure V.11. Schéma de la préparation des « phantoms »	86
Figure V.12. « Phantoms » visualisés en IRM pondéré T_2	86
Figure V.13. Chronologie du protocole de suivi des cellules injectées.....	88
Figure V.14. Diamètres du lot de NPs $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ utilisé pour le marquage des MSCs	88
Figure V.15. Cellules en culture avant injection.....	89
Figure V.16. Suivi du signal de fluorescence après injection dans le parenchyme rénal gauche.	90
Figure V.17. Différentes zones d'injection dans le parenchyme rénal	90
Figure V.18. Signal de fluorescence au niveau du foie 14 jours après injection.....	91
Figure V.19 Signal de fluorescence en surface des organes	92
Figure V.20. Visualisation des cellules injectées par tomodynamométrie	94
Figure V.21. Reconstruction 3D après acquisition en tomodynamométrie.....	95
Figure V.22. Visualisation des cellules injectées par IRM pondérée T_2	96
Figure V.23. Coupe histologique du rein gauche injecté dans la zone sous-capsulaire	97
Figure V.24. Evolution des poids corporels au cours de l'étude.....	97
Figure VI.1. Schéma bilan de l'utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique et le suivi cellulaire.....	100
Figure VII.1. Impact de la diffusion des photons en imagerie de fluorescence	101
Figure X.1. Spectres de transmission des filtres utilisés	112
Figure X.2. Mesures de puissance laser délivrées.....	113
Figure X.3. Représentation visuelle en fausses couleurs de l'intensité de fluorescence.....	114
Figure XI.1. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du diamètre des nanoparticules.....	127
Figure XI.2. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du marquage cellulaire	129
Figure XI.3. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du wound	130

Liste des tableaux

Tableau II.1 Agents de contraste à base de Gadolinium.....	12
Tableau II.2. Caractéristiques des principales modalités d'imagerie biomédicale	18

Liste des abréviations

ACs : agents de contraste

Eu : europium

Gd : gadolinium

Gd₂O₂S : oxysulfure de gadolinium

Gd₂O₂S:Eu³⁺ : oxysulfure de gadolinium dopé europium

Gd₂O₂S:Yb³⁺/Tm³⁺ : oxysulfure de gadolinium dopé ytterbium et thulium

HU : unité hounsfield

ICP-MS : spectrométrie de masse couplée à la spectrométrie à plasma induit

ICP-OES : spectrométrie à émission optique couplée à la spectrométrie à plasma induit

IR : infrarouge

IRM : imagerie par résonance magnétique

Ln : lanthanide

LNPs : nanoparticules à base de lanthanides

MSCs : cellules stromales mésenchymateuses

NIR : proche infrarouge

NPs : nanoparticules

p : significativité statistique

PEG : polyéthylène glycol

PET : tomographie par émission de positons

QDs : quantum dots

SPECT : tomographie par émission monophotonique

T_1 : relaxivité longitudinale

T_2 : relaxivité transverse

TDM : tomodensitométrie

Tm : thulium

UC : conversion ascendante de photons (Up-conversion)

Yb : ytterbium

Introduction

I. Introduction générale

Les objets de taille nanométrique sont utilisés depuis l'antiquité dans tous types de matériaux pour leur conférer différentes propriétés, notamment de résistance ou de coloration¹. Cependant, leur étude n'a réellement débuté qu'à partir du milieu du 20^e siècle, avec un essor croissant depuis lors, notamment grâce aux évolutions technologiques des techniques d'imagerie (microscopie électronique et à effet tunnel entre autres). Aujourd'hui, les nanomatériaux sont globalement définis comme des matériaux dont au moins une des dimensions externes est comprise entre 1 et 100 nanomètres. Il est important de noter cependant que les définitions diffèrent selon les organismes (loi française, européenne, norme ISO...). On distingue les nanomatériaux manufacturés, produits intentionnellement, des matériaux naturels. Ainsi, à titre d'exemple, les éléments du vivants tels que l'ADN, les protéines simples ou encore les virus répondent à la définition de nanomatériaux, à l'inverse des cellules eucaryotes ou des bactéries.

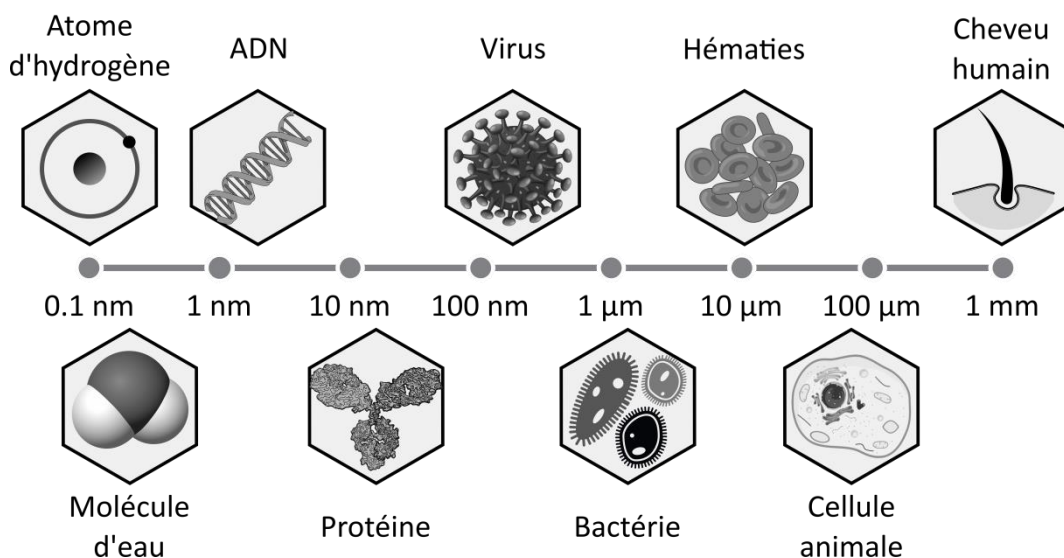


Figure I.1. L'échelle nanométrique.

Les nanotechnologies ont d'abord suscité un grand intérêt industriel avant de trouver de nombreuses applications en biologie et en médecine incluant trois grands domaines complémentaires : la thérapie avec par exemple la délivrance ciblée de médicaments ou

Introduction générale

l'ingénierie tissulaire, l'analyse avec des outils de séquençage et de détection moléculaire et enfin l'imagerie avec de nouveaux agents améliorant la détection et le suivi de mécanismes biologiques^{2,3}. Ce dernier secteur constitue aujourd'hui celui pour lequel les avancées sont les plus évidentes et dont les applications pratiques sont à notre porte⁴. En effet, le développement de nouveaux agents d'imagerie (traceurs et/ou agents de contraste) fiables et performant est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques notamment en recherche préclinique. Il est ainsi indispensable de pouvoir réaliser le suivi en temps réel du devenir des cellules *in vitro* comme *in vivo*, notamment en thérapie cellulaire car les cellules utilisées peuvent présenter des propriétés de migration.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. La caractérisation et les applications de **nanoparticules multimodales à base de lanthanides pour l'imagerie biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses** sont ici présentées. Cette thématique est à l'interface entre la chimie des nanomatériaux, l'imagerie biomédicale, la thérapie cellulaire et le suivi de cellules en particulier.

Nous introduirons tout d'abord brièvement les différentes applications des nanotechnologies en biologie et médecine avant de se focaliser sur l'imagerie biomédicale. Nous présenterons ensuite l'intérêt des nanoparticules multimodales dans ce domaine et la place qu'y tiennent les lanthanides. Nous dresserons ensuite l'inventaire des prérequis nécessaires au développement de tels outils avant d'exposer le principe de la thérapie cellulaire et pourquoi il est nécessaire de développer des outils de suivi cellulaire.

Par la suite nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse.

La première étude est consacrée à la validation des outils nécessaires à la conduite de ces travaux de thèse, à savoir la synthèse et la caractérisation physico-chimique des NPs utilisées ainsi que la mise au point d'un système d'imagerie dédié.

La deuxième étude présente l'application de ces NPs en tant qu'agent d'imagerie multimodale *in vivo* et se penche sur leur biocompatibilité à l'échelle de l'organisme ainsi que sur leurs voies d'élimination.

Introduction générale

La troisième et dernière étude tire parti des deux précédentes et expose le potentiel des NPs en tant que traceur cellulaire généraliste et son application pour le marquage et le suivi multimodal *in vivo* de cellules mésenchymateuses dans un contexte de thérapie cellulaire.

Pour finir, nous dresserons le bilan de ces travaux et présentons les perspectives.

II. Etat de l'art

A. Applications des nanotechnologies en biologie et santé

L'avantage indéniable des nanotechnologies dans ce domaine est dû à une combinaison de facteurs. Tout d'abord, la faible taille des objets, et par conséquent leur large ratio surface/volume, permet une interaction plus importante avec le milieu environnant. D'autre part, le large panel de leur composition multiplie leurs applications possibles. En nanomédecine, plusieurs stratégies de fabrication sont adoptées. En effet, la composition initiale peut varier énormément en fonction de l'application. Une base organique permet une meilleure biocompatibilité mais une plus faible stabilité en milieu biologique notamment *in vivo*. A l'inverse, une base inorganique présentera une plus forte stabilité mais avec des risques de toxicité potentielle. Les différents types de nano-objets ainsi que leurs utilisations principales sont présentés ci-dessous.

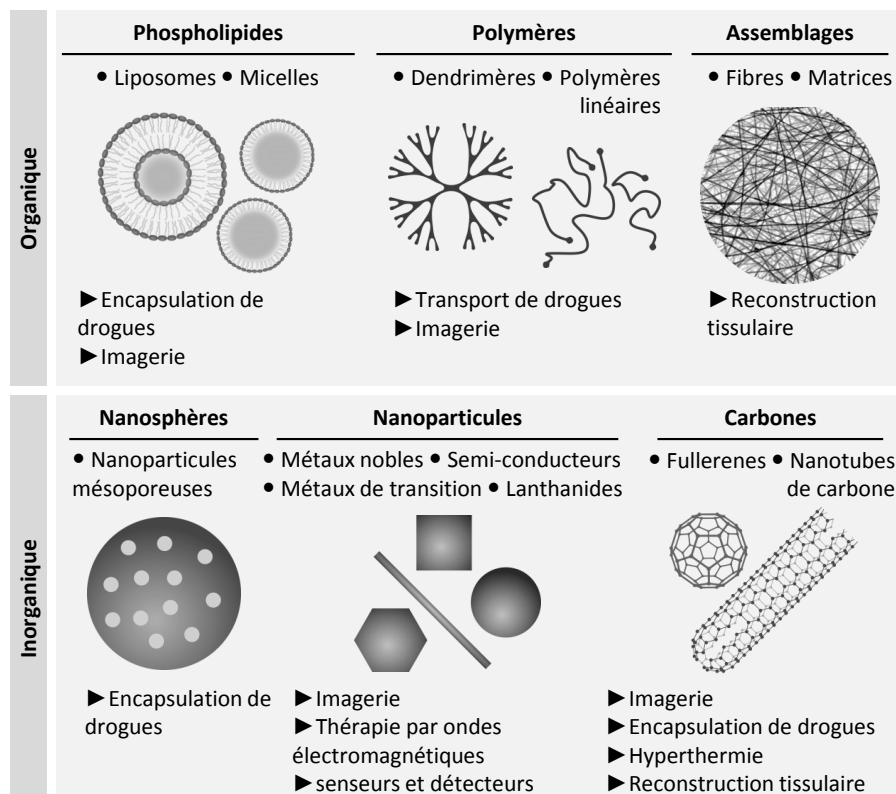


Figure II.1. Compositions des nano-objets utilisés en biologie et médecine et leurs principales applications

Etat de l'art

Afin d'améliorer les propriétés biologiques des objets manufacturés, certaines modifications de surface peuvent ensuite être apportées⁵ :

Le revêtement par le Polyéthylène glycol (PEG) est très utilisé⁶ car ce polymère hydrosoluble permet une furtivité immunitaire ainsi qu'une stabilisation des colloïdes. Ces deux facteurs sont d'une importance capitale pour des applications nécessitant l'introduction dans la circulation sanguine car le temps de demi-vie s'en trouve largement augmenté. L'utilisation de molécules organiques endogènes (acide folique⁷, transferrine^{8,9}, Poly(L)Lysine¹⁰) ou exogènes (peptide TAT issu du VIH^{11,12}) permet d'améliorer l'internalisation des nano-objets pour le marquage cellulaire par exemple. Le revêtement de polymères naturels (chitosan^{13,14}, dextran¹⁵⁻¹⁷) ou synthétiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire permet de diminuer la toxicité. Enfin, le ciblage cellulaire, notamment de cellules cancéreuses peut être réalisé par ajout de molécules organiques endogènes (anticorps...¹⁸).

La combinaison de différents agents de revêtement est également une stratégie largement adoptée notamment en thérapie anticancéreuse pour profiter d'un temps de circulation plus long et d'un ciblage cellulaire efficace.

Ainsi, comme mentionné précédemment, les nanotechnologies trouvent de nombreuses applications en biologie et médecine.

1. Thérapie

Historiquement, la première application médicale des nanotechnologies fût la thérapie anticancéreuse. En effet, le premier médicament sur le marché (approuvé en 1995) utilisant des nanotechnologies fut le Doxil[®], un liposome encapsulant de la doxorubicine et recouvert d'un dérivé de polyéthylène glycol. Depuis lors, la vectorisation des principes actifs n'a cessé de prendre de l'ampleur jusqu'à atteindre 43 composés pharmaceutiques approuvés en 2014¹⁹. Ce type de formulation permet une délivrance plus ciblée et plus spécifique tout en limitant les dommages aux tissus sains. Si la majorité des médicaments approuvés repose sur l'utilisation de liposomes ou de polymères²⁰, d'autres stratégies d'encapsulation sont à l'étude, notamment par l'utilisation de dendrimères ou de nanoparticules inorganiques de silice mésoporeuses ou d'or²¹.

Etat de l'art

Par la suite, d'autres applications thérapeutiques ont vu le jour, notamment via l'ingénierie tissulaire et la production de biomatériaux assemblables sous forme de réseaux de fibres de collagène, d'hydroxyapatite ou bien de nanotubes de carbone. Les applications principales de ce types de matériaux sont de fournir un support mécanique (matrice extracellulaire par exemple) pour la prolifération cellulaire et la reconstruction tissulaire (osseuse, dentaire...) ou la guérison de plaies²²⁻²⁴.

Enfin, les propriétés intrinsèques de certains matériaux combinées à leur taille nanométrique ont donné lieux à l'apparition de nouvelles formes de thérapies ou à l'amélioration de thérapies existantes. Ceux-ci sont par exemple capables d'emmagasiner de l'énergie reçue par onde(s) électromagnétique(s) et de la restituer localement sous d'autres formes induisant des lésions tissulaires (principalement la destruction tumorale). Les exemples les plus marquants sont la radiosensibilisation, consistant en la potentialisation de la radiothérapie anticancéreuse via l'utilisation de nanomatériaux comme les nanoparticules d'or^{25,26} ou l'hyperthermie locale pour destruction tumorale via l'utilisation de différents matériaux et différentes ondes adaptées (magnétique, micro-onde, infrarouge)²⁷.

2. Analyse

La médecine moderne tendant de plus en plus vers une thérapie personnalisée, la détection précoce et fiable d'un grand nombre de marqueurs spécifiques de pathologies est essentielle afin d'établir un diagnostic. Les nanotechnologies permettent d'atteindre de tels résultats notamment via le développement et l'utilisation de nanocapteurs (« nanosensors ») améliorant grandement la vitesse et la sensibilité de détection simultanée, et à large échelle, de nombreux biomarqueurs. Ces technologies reposent principalement sur la variation de courant électrique le long de nanofils de silice auxquels sont liés des molécules biologiques (anticorps, sonde ADN, protéine...) ^{28,29}. A terme, les évolutions dans ce secteur permettront la création de « Lab-on-a-chip », véritables laboratoires miniatures permettant l'extraction de plasma sanguin suivi de la détection de nombreux biomarqueurs.

3. Imagerie

Les applications en imagerie préclinique et clinique sont variées : Imagerie par résonance magnétique, imagerie optique, tomodensitométrie, imagerie nucléaire et par ultrasons³⁰. La taille, les propriétés intrinsèques et la chimie de surface des nanomatériaux permettent

Etat de l'art

d'outrepasser les limitations existantes des agents de contraste classiquement utilisés (voir II.B).

La chimie de synthèse des nanomatériaux permet de combiner plusieurs fonctionnalités au sein d'un même objet. Ainsi, imagerie et analyse peuvent être regroupées sous une thématique commune de diagnostic car elles permettent dans la majorité des cas d'identifier des marqueurs ou des zones spécifiques de pathologies. Thérapie et imagerie font l'objet d'une association qui prends son sens avec les nanosciences : le théranostic. Il est ainsi possible de combiner, par exemple, la délivrance de médicaments au site tumoral et l'imagerie associée permettant une resection ultérieure et donc une élimination des cellules cancéreuses plus drastique ou encore l'imagerie préclinique et la radiosensibilisation.

B. Principes et applications des méthodes d'imagerie biomédicale

Les travaux effectués au cours de cette thèse étant axés sur l'imagerie biologique, nous développerons plus en détails ci-après les différentes méthodes d'imagerie biomédicale et les principaux nanomatériaux couramment utilisés. Chacune des méthodes présente des avantages et des inconvénients reposant principalement sur une différence entre sensibilité et résolution^{31,32}. En imagerie, la sensibilité se réfère à la plus faible variation de signal détectable. Ainsi, plus une technique est sensible, plus il sera possible de détecter et de quantifier précisément un signal émis. La résolution quant à elle se réfère avant tout à la capacité à localiser spatialement le signal émis.

1. La fluorescence

La fluorescence est la méthode la plus couramment utilisée en recherche biomédicale car elle permet de détecter, avec une grande sensibilité, des cibles réduites (en faibles quantités) au sein d'échantillons biologiques, que ce soit en microscopie ou en cytométrie de flux. Un matériau est dit fluorescent lorsqu'il est capable d'émettre un rayonnement lumineux après excitation par un (ou plusieurs) photon(s). Aujourd'hui, la grande majorité des matériaux fluorescents utilisés en recherche sont des fluorochromes organiques comme le DAPI ou la GFP (green fluorescent protein). Ceux-ci présentent un mécanisme de fluorescence dit conventionnel, l'émission ayant lieu à une longueur d'onde plus élevée que l'excitation accompagnée d'une perte d'énergie donnant lieu à un déplacement de Stokes (Figure II.2).

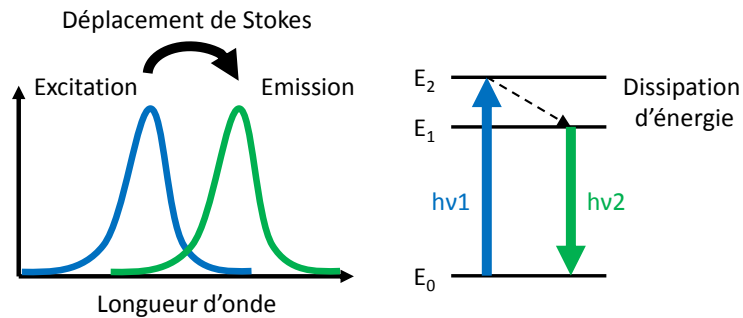


Figure II.2. Mécanisme classique de fluorescence (adapté de Liu et al.³³).

Ce type de produits a permis la caractérisation de nombreux mécanismes biologiques mais reste cependant limité dans ses performances. En effet, ceux-ci sont sensibles à la dégradation, soit par photoblanchiment consécutif à une exposition prolongée à une source lumineuse, soit par oxydation cellulaire³⁴. Afin de pallier ces déficiences, différentes stratégies ont été développées.

Afin de contourner le problème d'oxydation des fluorophores organiques et de concentrer la source de fluorescence, il est possible d'incorporer ces derniers à l'intérieur de particules à base de silice ou de polymère³⁵. Un autre facteur de limitation à l'utilisation des fluorochromes classiques, notamment pour le suivi de mécanismes *in vivo*, est la faible pénétration de la lumière visible dans les tissus biologiques³⁶. L'amélioration des technologies de microscopie intravitale (incluant la microscopie à champ large, confocale ou multiphotonique) permet, d'outrepasser en partie les limitations de profondeur notamment via l'utilisation d'excitation multiphotonique³⁷. En outre, l'utilisation de nanomatériaux inorganiques permet de s'affranchir des problèmes d'instabilité lumineuse ou de dégradation. Les premiers représentants à avoir été employés sont les Quantum Dots (QDs). Il s'agit de nanocristaux semi-conducteurs de quelques nanomètres de diamètre et dont la taille impacte directement la longueur d'onde d'émission. Leurs propriétés optiques remarquables ont été à l'origine d'un fort engouement à leur égard. En effet, ils présentent une photostabilité et une brillance exceptionnelle permettant le suivi à long terme et la détection de cibles peu abondantes^{38,39}. De plus, ils sont facilement utilisables pour des études de multiplexage (mesure simultanée de plusieurs informations) car ils sont excitable à partir d'une seule longueur d'onde et ont des spectres d'émission très fins ce qui évite le chevauchement spectral⁴⁰. Cependant, leur utilisation dans les laboratoires de recherche est

limitée, notamment à cause de leur toxicité due à leur composition (Cadmium, Soufre, Zinc...)⁴¹.

D'autre part, les avancées récentes ont mis en évidence l'intérêt indéniable des sondes fluorescentes excitables dans le proche infrarouge (700-2500 nm) permettant l'imagerie non invasive sur animaux vivants⁴¹. En effet, la pénétration des photons dans les tissus y est plus importante, la diffusion de la lumière est réduite et l'autofluorescence des tissus y est minimale⁴². En pratique, il existe une première fenêtre optique entre 650 et 950 nm où les composants les plus « opaques » des tissus biologiques (sang, lipides et mélanine) absorbent moins que dans le domaine visible (Figure II.3). Cependant, l'autofluorescence des tissus y est toujours importante, ce qui conduit à la génération de bruit de fond et la pénétration y est limitée à 1-2 cm. Des études plus récentes ont montré l'existence d'une seconde fenêtre entre 1000 et 1350 nm où le ratio signal/bruit serait grandement amélioré. Cependant, le manque de sondes fluorescentes biocompatibles utilisables dans cette fenêtre limite son exploitation^{36,42}.

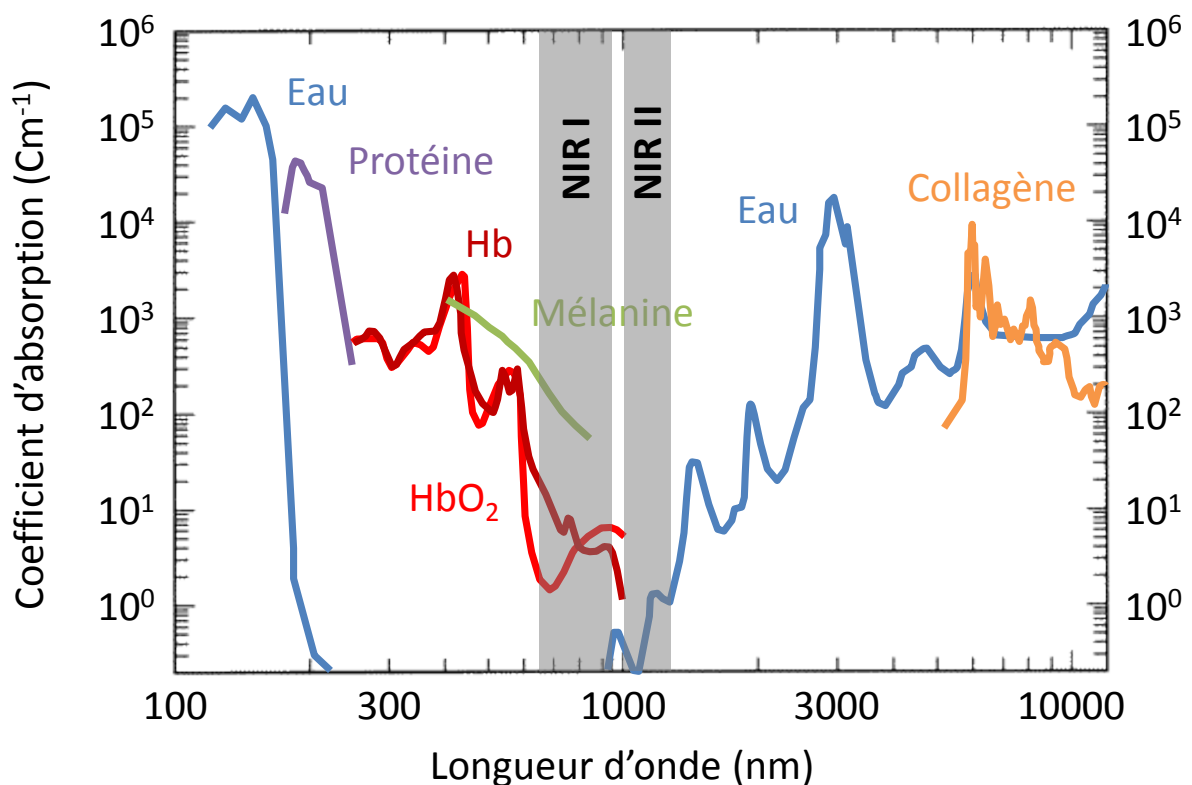


Figure II.3. Coefficients d'absorption optique des composants des tissus biologiques. Adapté de Vogel et Venugopalan⁴³. NIR I : première fenêtre optique (650-950 nm) ; NIR II : seconde fenêtre optique (1000-1350 nm) ; Hb : hémoglobine ; HbO₂ : oxyhémoglobine.

Les nanoparticules à base de lanthanides semblent être de parfaits candidats ici car ils combinent la stabilité physicochimique des nanomatériaux inorganiques à la possibilité d'excitation dans le proche infrarouge en fonction de la composition choisie (voir II.C). Le mécanisme de fluorescence peut cependant différer du mécanisme classique : on parle de conversion ascendante de photon ou « up-conversion » (UC). L'absorption de deux photons (ou plus) de faible énergie par le matériau conduit à l'émission d'un photon de plus haute énergie³³ donnant un lieu à une fluorescence anti-Stokes (Figure II.4a). Plusieurs mécanismes sont regroupés sous le terme d'up-conversion, le plus courant étant le transfert d'énergie. Celui-ci nécessite la présence au sein des nanoparticules d'un couple sensibilisateur/émetteur où le premier (l'ytterbium par exemple) reçoit l'énergie des photons proches infrarouge et la transfère au second (l'erbium ou le thulium) qui émettra un photon de plus faible longueur d'onde⁴⁴ (Figure II.4b).

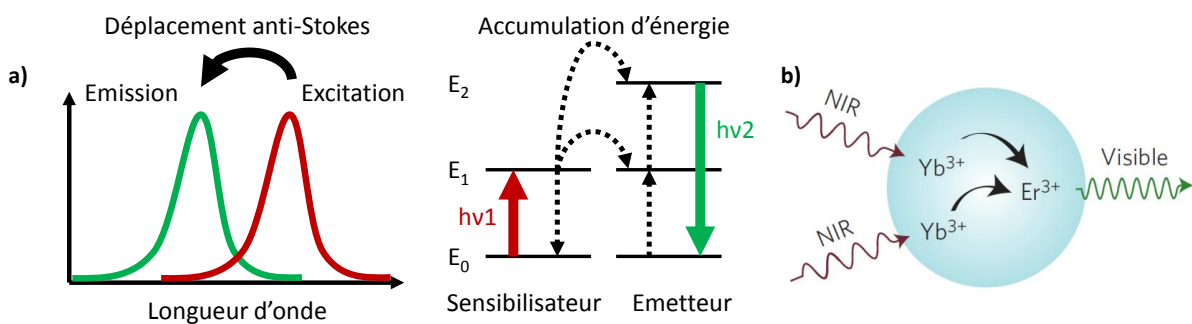


Figure II.4. Fluorescence par conversion ascendante de photons a) Explication du mécanisme simplifié de transfert d'énergie(adapté de Dong et al.⁴⁴). b) Exemple de transfert énergétique au sein d'une nanoparticule à base de lanthanides (adapté de Gargas et al.⁴⁵).

2. L'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est très utilisée en médecine moderne car elle permet de réaliser des diagnostics précis et du monitoring thérapeutique avec une bonne résolution sans risques lésionnels car elle utilise des ondes non ionisantes. En recherche biomédicale, elle est également utilisée pour des études de pharmacocinétique, de libération de molécules actives ou encore de suivi cellulaire⁴⁶. La génération d'un signal IRM est basée sur les propriétés de résonance et de relaxation des noyaux d'atomes lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique⁴⁴. Dans un échantillon biologique, le noyau d'hydrogène est le principal responsable de ce signal car il en est le plus abondant (le corps humain étant composé à 65% d'eau). (Figure II.5).

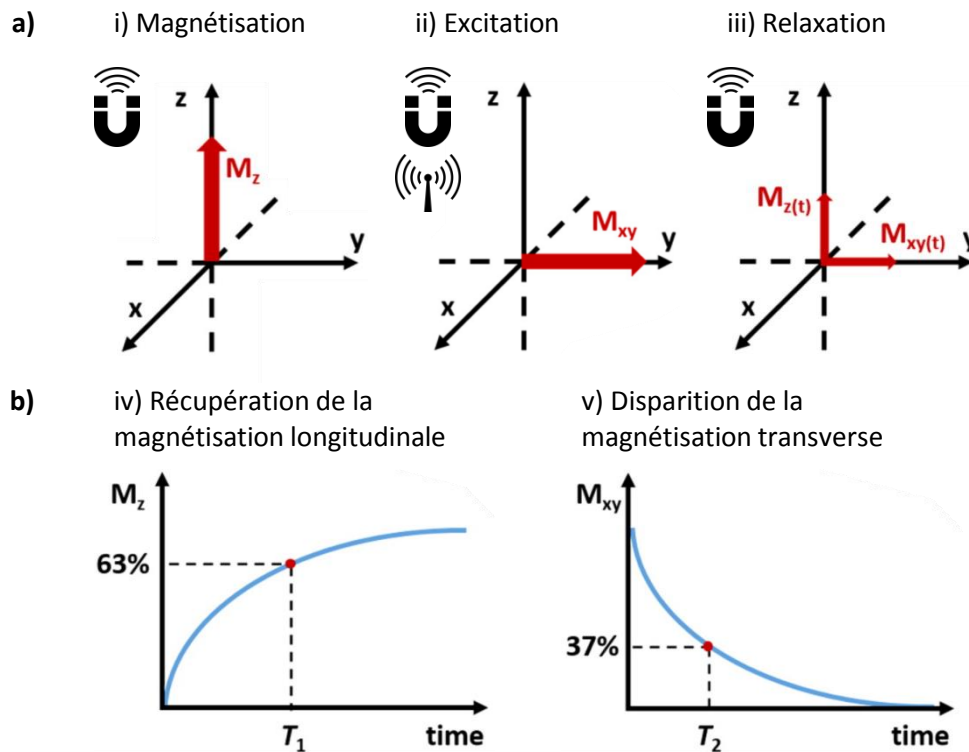


Figure II.5. Principe de l'imagerie par résonance magnétique. a) Etapes de génération du signal. i) Magnétisation par à un champ magnétique constant : alignement des spins sur l'axe longitudinal (z). ii) Excitation par onde radiofréquence : disparition de la composante longitudinale (z) de l'aimantation au profit d'une composante transversale (xy). iii) Relaxation après arrêt de l'impulsion de radiofréquence : le moment magnétique revient progressivement à son état d'équilibre sous l'influence du seul champ restant. La magnétisation longitudinale (T_1) augmente progressivement alors que la magnétisation transverse diminue (T_2). b) Quantification du signal. iv) T_1 correspond au temps nécessaire pour que la magnétisation longitudinale retrouve 63% de son équilibre. v) T_2 correspond au temps nécessaire pour que la magnétisation transverse perde 37% de son intensité maximale. (Adapté de Dong et al.⁴⁴).

Les valeurs T_1 et T_2 permettent alors de rendre compte de l'état de magnétisation d'un tissu ou d'une zone de tissu.

Il est souvent nécessaire d'utiliser des agents de contraste (ACs) (environ 30 millions d'exams avec AC par an dans le monde⁴⁷) pour mieux localiser des zones tumorales ou des lésions ou bien suivre l'évolution d'un mécanisme (comme la migration cellulaire par exemple⁴⁸⁻⁵⁰) car la sensibilité de l'IRM est relativement basse. Ces agents diminueront le temps de relaxation des protons de l'eau se trouvant à proximité directe et par conséquent permettront d'augmenter le contraste comparativement à des zones où l'agent de contraste n'est pas présent.

On peut donc distinguer deux classes d'ACs en fonction de leur effet. Les agents dits positifs ont majoritairement un effet T_1 (diminution de la relaxation longitudinale) et induisent un

éclaircissement de l'image. La vaste majorité d'entre eux sont des agents paramagnétiques à base de gadolinium ionique (Gd^{3+}) chélaté⁵¹. En effet, ce lanthanide possède le plus grand nombre d'électrons non appariés de tous les éléments chimiques (sept), ce qui lui confère des propriétés paramagnétiques significatives. Cependant, le gadolinium ionique libre, comme beaucoup d'autres métaux, est reconnu comme toxique^{52,53} notamment du fait de son rayon ionique similaire au calcium⁵⁴. Les agents commerciaux sur le marché sont donc tous des chélates de gadolinium qui stabilisent l'ion Gd^{3+} et le rendent indisponible pour des réactions métaboliques indésirables. Le premier d'entre eux introduit sur le marché fut le gadopentate dimeglumine (Magnevist®) en 1988. Très rapidement, d'autres agents ont vu le jour comme le gadoterate meglumine (Dotarem®) (Tableau II.1).

Nom générique	gadopentetate dimeglumine	gadoterate meglumine
Nom commercial	Magnevist® (Shering)	Dotarem® (Guerbet)
Agent chélatant	Gd-DTPA	Gd-DOTA
Structure	linéaire	macrocyclique
Date de mise sur le marché	1988	1989

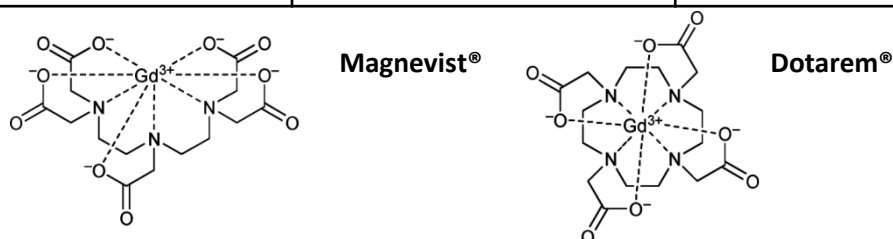


Tableau II.1 Agents de contraste à base de Gadolinium (adapté de Hermann et al⁵¹).

Ces ACs de faible poids moléculaire sont majoritairement non-spécifiques et restent extracellulaire. Après injection intraveineuse, ceux-ci s'échappent rapidement du compartiment sanguin vers l'interstitium (espace extracellulaire)⁵⁵. Ils ont une demi-vie plasmatique de l'ordre de 90 minutes, et sont excrétés par filtration rénale dans les 24 heures après administration⁵².

Jusqu'à très récemment, une dizaine de ces agents étaient validés par l'Agence Européenne des Médicaments⁵⁶, mais un décret de juillet 2017 suspend l'utilisation de la majorité des ACs linéaires⁵⁷. En effet, ceux-ci sont considérés comme trop dangereux à cause du risque de relargage de Gd ionique hors de l'agent chélatant⁵⁸.

Etat de l'art

Le gadolinium libre se fixe alors dans les os, le foie, les poumons et surtout le rein. A terme, cela peut induire de nombreuses complications, notamment chez les patients atteints d'insuffisance rénale qui risquent de déclarer une fibrose néphrogénique systémique induisant une fibrose cutanée pouvant s'étendre aux muscles, poumons, foie et cœur⁵³. Des données récentes mettent également en avant une accumulation de gadolinium notamment dans le cerveau chez des patients non atteints de pathologie rénale suite à des examens IRM avec agent de contraste^{59,60}. Ceci met en avant la possibilité de franchissement de la barrière hémato-encéphalique, bien plus imperméable que les capillaires présentant un épithélium fenêtré au niveau des os et autres tissus. Les agents macrocycliques quant à eux sont considérés comme suffisamment sûrs.

Une stratégie en développement consiste à confiner le gadolinium de façon plus importante au sein de nanoparticules afin d'éviter le relargage de Gd et les risques de complication^{44,61} (voir II.F.2).

Les ACs négatifs ont majoritairement un effet T_2 (diminution de la relaxation transverse) et induisent un obscurcissement de l'image. Développés plus tardivement que les agents positifs, les ACs T_2 validés pour une utilisation chez l'Homme sont constitués de nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIO)⁵¹. Ces nanoparticules sont utilisées principalement pour l'imagerie du foie, de la rate et du tube digestif, ont un diamètre compris entre 20 et 300 nm et présentent un revêtement de surface à base de dextran, de carboxydextran ou de siloxane^{62,63}. Cependant, leur efficacité est limitée par la saturation de leur magnétisation à forts champs magnétiques⁶⁴.

3. La tomodensitométrie

La radiographie (découverte en 1895) est la plus ancienne méthode d'imagerie utilisée dans le milieu médical⁶⁵. Cela consiste à faire traverser un faisceau de rayons X au travers d'un échantillon ou d'un patient pour obtenir un cliché plan des tissus biologiques en fonction de leur densité et de leur coefficient d'absorption des rayons. Plus un tissu est dense électriquement parlant, plus il sera identifiable clairement sur le cliché. Dans les années 1970, les évolutions technologiques ont permis d'apporter des améliorations à cette technique pour créer la tomodensitométrie. Ainsi, la source de rayons X devient mobile pour réaliser des clichés successifs en rotation autour du patient. Un traitement informatique

Etat de l'art

permet ensuite d'effectuer des reconstructions 3D et d'obtenir une très bonne résolution spatiale (Figure II.6).

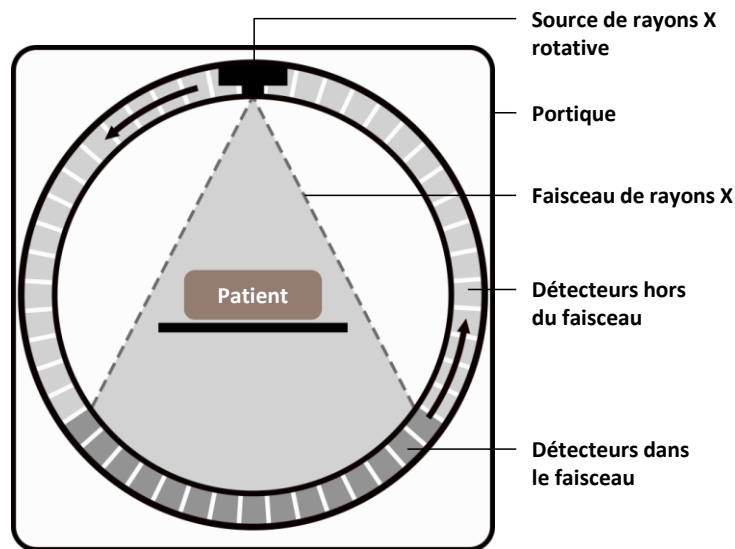


Figure II.6. Fonctionnement de la tomodensitométrie.

En fonction de leur densité, les tissus absorbent et atténuent plus ou moins les rayons X ce qui permet de les visualiser, cette capacité d'atténuation étant mesurée en unités Hounsfield (HU). L'air présente une valeur de -1000 HU car il n'atténue pas les rayons alors que l'os qui les atténue le plus au sein d'un organisme, présente une valeur de +1000 HU⁶⁶.

En l'absence d'AC, cette technique est principalement utilisée pour le diagnostic des tissus denses aux électrons comme les os⁴⁶ (Figure II.7).

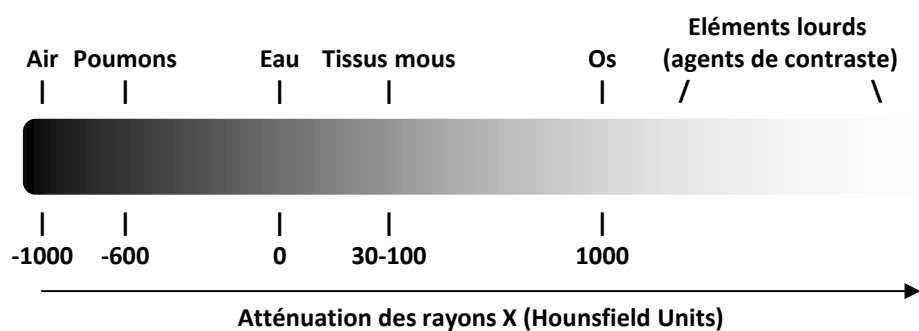


Figure II.7. Capacité d'atténuation des rayons X des tissus biologiques. La différence de contraste (ici en niveau de gris) est proportionnelle à l'atténuation.

Cependant, la différence d'atténuation entre les différents tissus mous reste subtile et la sensibilité de la méthode est très faible. Ainsi, il est souvent nécessaire d'utiliser des éléments extérieurs afin d'améliorer le contraste. En 2010, 55% des examens étaient réalisés

Etat de l'art

avec des ACs⁶⁷. A l'heure actuelle, seuls le baryum (pour le tractus digestif) et l'iode sont utilisés chez l'Homme⁶⁶. Cependant, la faible sensibilité de contraste (dû à leur relativement faible numéro atomique), impose l'utilisation de fortes doses de ces agents de contraste et la potentielle toxicité (rénale⁶⁸) associée soulèvent de nombreuses inquiétudes⁴⁶.

De plus, ces agents sont rapidement excrétés, ce qui ne permet pas d'étude à long terme et leur distribution n'est pas spécifique, empêchant une étude précise.

Tout ceci conduit les recherches à s'orienter vers des éléments plus lourds tels que l'or^{69,70}, le platine⁷¹ ou les lanthanides^{72,73} qui permettent une meilleure atténuation des rayons X (voir Figure II.8) et présentent des propriétés très intéressantes notamment de ciblage.

element	atomic number (Z)	K-edge energy (keV)	X-ray mass attenuation coefficient at 100 keV (cm ² g ⁻¹)	
I	53	33.2	1.94	Utilisation clinique
Ba	56	37.4	2.20	
La	57	38.9	2.32	En cours de développement
Ce	58	40.4	2.44	
Pr	59	42.0	2.59	
Nd	60	43.6	2.69	
Pm	61	45.2	2.84	
Sm	62	46.8	2.90	
Eu	63	48.5	3.04	
Gd	64	50.2	3.11	
Tb	65	52.0	3.25	
Dy	66	53.8	3.36	
Ho	67	55.6	3.49	
Er	68	57.5	3.63	
Tm	69	59.4	3.78	
Yb	70	61.3	3.88	
Lu	71	63.3	4.03	
Ta	73	67.4	4.30	
Pt	78	78.4	4.99	
Au	79	80.7	5.16	
Bi	83	90.5	5.74	

Figure II.8. Coefficients d'atténuation des rayons X des différents éléments utilisés en clinique ou en développement préclinique⁴⁴.

4. Imagerie nucléaire (Tomographie par émission de positons et tomographie par émission monophotonique)

La tomographie par émission de positons (PET) et la tomographie par émission monophotonique (SPECT) sont des méthodes tomographiques où l'image est construite à partir de l'acquisition de rayons γ produits par des radionucléides.

Etat de l'art

La génération de signal en PET est due à l'interaction des positons émis par un radionucléide (^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{124}I et ^{68}Ga) avec un électron. L'annihilation consécutive produit alors deux rayons γ . En SPECT, ce sont les radionucléides ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{123}I et ^{111}In) qui émettent directement des rayons γ .

Ces méthodes utilisent donc classiquement des traceurs incorporant des radionucléides (radiotraceurs). L'une des sondes les plus utilisées est le ^{18}F FDG (fluoro-désoxy-glucose marqué au radioisotope 18 du fluor). Elles sont notamment utilisées en clinique pour le diagnostic, l'étude de processus physiopathologiques et le monitoring thérapeutique grâce à leur très grande sensibilité (de l'ordre du picomolaire de radiotraceur) et leur excellente pénétration tissulaire⁷⁴. Cependant, au même titre que la fluorescence, ces méthodes ne permettent pas à elles seules une localisation anatomique à cause de leur mauvaise résolution, c'est pourquoi elles sont souvent couplées à l'IRM ou la TDM^{75,30}.

Ces méthodes sont également très utilisées pour les études de pharmacocinétique en nanomédecine. En effet, les sondes radioactives classiques peuvent être co-encapsulées à l'intérieur de vecteurs nanométriques contenant soit d'autres agents d'imagerie pour une utilisation multimodale, soit un médicament pour la mesure de son efficacité de ciblage et d'action⁴⁶.

5. L'échographie

L'échographie est la méthode de choix pour l'exploration fonctionnelle dans un cadre clinique car elle est peu coûteuse, facile à mettre en place et à transporter, n'utilise pas de radiations ionisantes et ne nécessite pas de traitement informatique de l'image après acquisition. Lors de l'examen, la sonde émet des ultrasons qui seront transmis différemment selon les organes et les structures rencontrées puis réfléchis et captés sous forme d'échos (Figure II.9).

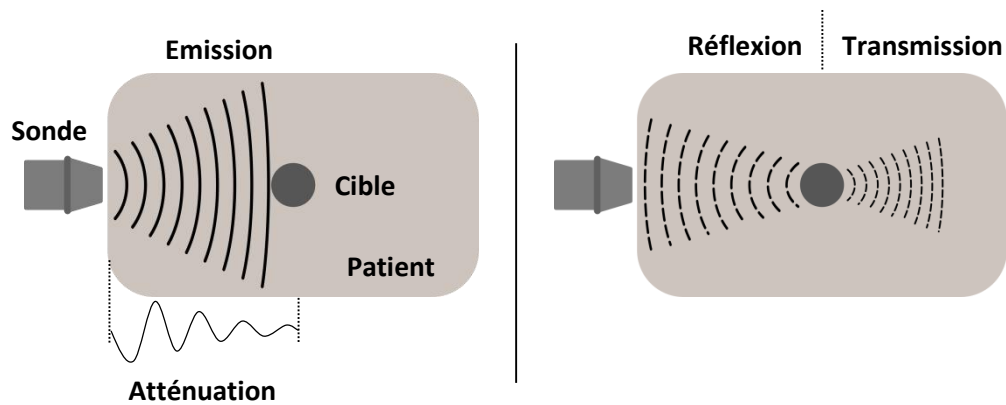


Figure II.9. Principe de l'échographie.

Cette technique est limitée en terme de pénétration dans les tissus mais reste largement utilisée car elle présente une excellente résolution spatiale et temporelle. L'intensité du signal peut être améliorée par l'injection intravasculaire d'ACs composés de microbulles remplies de gaz ou d'air⁷⁶.

Ces dernières années, les études précliniques s'intéressent à l'utilisation de cette méthode d'imagerie pour la délivrance de médicaments et/ou de gènes par combinaisons des agents de contraste sous forme de microbulles avec des molécules encapsulés. Les ultrasons permettent alors la perméabilisation membranaire par sonoporation et/ou l'extravasation (passage du compartiment sanguin vers les tissus) ce qui favorise l'internalisation cellulaire^{77,78}.

6. La multimodalité

L'un des avantages principaux des nanomatériaux est la possibilité de combiner différentes applications dans un seul matériau manufacturé. Il est ainsi possible de combiner la thérapie et l'imagerie ou bien plusieurs techniques d'imagerie en n'utilisant qu'un seul traceur. En effet, comme présenté ci-dessous (Tableau II.2), les méthodes d'imagerie actuelles présentent toutes des avantages et des inconvénients notamment de résolution/sensibilité.

Modalité d'imagerie	Optique	IRM	TDM	PET	SPECT	Echographie
Source du signal	Lumière	Ondes radio	Rayons X	Rayons γ		Ultrasons
Agents de contraste	QDs, sondes proche infrarouge	Chélates de Gd, oxydes de fer	Iode, barium, Or	Molécules radioactives	Radio-isotopes	Microbulles/capsules, Liposomes
Résolution spatiale	15-1000 nm	4-100 μm	50-200 μm	1-2 mm		50-500 μm
Pénétration	< 10 cm	Sans limite				mm-cm
Sensibilité	Elevée	Moyenne		Elevée		Moyenne
Temps d'examen	Sec - min	Min - h	Min	Min - h		Sec - min
Information principale	Moléculaire	Anatomique, physiologique		Métabolique, physiologique, moléculaire		Anatomique
Coût	Faible	Elevé	Modéré	Elevé		Faible
Utilisation clinique	En développement	Oui				

Tableau II.2. Caractéristiques des principales modalités d'imagerie biomédicale. Informations compilées à partir de différentes sources^{31,32,79,80}.

Par exemple, la grande résolution spatiale de l'IRM ou de la TDM combinée à l'excellente sensibilité de l'imagerie optique (fluorescence classique ou up-conversion) permet de localiser anatomiquement une cible d'intérêt et de quantifier le signal émis par celle-ci. La détection par les différentes techniques d'imagerie peut se faire de manière non simultanée (les unes après les autres) ou simultanée. Le développement de ce domaine de recherche a donc conduit à la création d'appareils combinant différentes techniques comme l'IRM et la PET^{81,82} par exemple. L'utilisation d'ACs multimodaux permet donc de combiner les avantages des différentes techniques, soit en combinant plusieurs éléments par liaisons chimiques (comme un fluorophore organique à une nanoparticule magnétique), soit en utilisant des matériaux dont la nature chimique leur confère directement ces fonctionnalités. Les matériaux inorganiques à base de lanthanides s'avèrent d'excellents candidats dans ce domaine car ils présentent un certain nombre d'avantages dans la majorité des techniques.

C. Les nanoparticules à base de lanthanides : apports et avantages pour l'imagerie biologique

1. Généralités sur les lanthanides

Le groupe des lanthanides est constitué de quinze éléments, allant du lanthane (Z=57) au lutécium (Z=71) (Figure II.10). Le Scandium (Z=21) et l'yttrium (Z=39) sont souvent associés aux lanthanides sous le terme de terres rares car ils présentent une remarquable homogénéité de propriétés chimiques.

Le tableau périodique des éléments est présenté, avec le groupe des lanthanides (éléments 57 à 71) et les terres rares (Scandium et Yttrium) mises en évidence. Les éléments sont classés par numéro atomique (Z) et nom.

1 H 1.008 Hydrogène	2 He 4.002602 Hélium																
3 Li 6.94 Lithium	4 Be 9.012182 Béryllium	5 B 10.81 Bore	6 C 12.011 Carbone	7 N 14.007 Azote	8 O 15.999 Oxygène	9 F 18.99840323 Fluorine	10 Ne 20.1797 Neon										
11 Na 22.98976928 Sodium	12 Mg 24.304 Magnésium	13 Al 26.9815385 Aluminium	14 Si 28.0855 Silicium	15 P 30.973761998 Phosphore	16 S 32.06 Sulfure	17 Cl 35.446 Chlore	18 Ar 39.948 Argon										
19 K 39.0983 Potassium	20 Ca 40.078 Calcium	21 Sc 44.955912 Scandium	22 Ti 47.88 Titane	23 V 50.9415 Vanadium	24 Cr 51.9961 Chromium	25 Mn 54.938044 Manganèse	26 Fe 55.845 Fer	27 Co 58.933194 Cobalt	28 Ni 58.6934 Nickel	29 Cu 63.546 Cuivre	30 Zn 65.38 Zinc	31 Ga 69.723 Gallium	32 Ge 72.630 Germanium	33 As 74.921595 Arsenic	34 Se 78.96 Sélénium	35 Br 79.904 Bromine	36 Kr 83.798 Krypton
37 Rb 85.4678 Rubidium	38 Sr 87.62 Strontium	39 Y 88.90584 Yttrium	40 Zr 91.224 Zirconium	41 Nb 92.90637 Niobium	42 Mo 95.94 Molybdène	43 Tc 98 Technetium	44 Ru 101.07 Ruthénium	45 Rh 102.90550 Rhodium	46 Pd 106.42 Paladium	47 Ag 107.8682 Argent	48 Cd 112.414 Cadmium	49 In 114.818 Indium	50 Sn 118.710 Étain	51 Sb 121.760 Antimoine	52 Te 127.46 Tellure	53 I 126.90447 Iode	54 Xe 131.293 Xénon
55 Cs 132.90545196 Césium	56 Ba 137.327 Baryum	57-71 * Lanthanide series	72 Hf 178.49 Hafnium	73 Ta 180.94788 Tantalum	74 W 183.84 Tungstène	75 Re 186.207 Rhenium	76 Os 190.23 Osmium	77 Ir 192.222 Iridium	78 Pt 195.084 Platine	79 Au 196.966569 Or	80 Hg 200.59 Mercure	81 Tl 204.38 Thallium	82 Pb 207.2 Plomb	83 Bi 208.9804 Bismuth	84 Po 209 Polonium	85 At 210 Astatine	86 Rn 222 Radon
87 Fr 223 Francium	88 Ra 226 Radium	89-103 ** Actinide series	104 Rf 261 Rutherfordium	105 Db 262 Dubnium	106 Sg 263 Seaborgium	107 Bh 264 Bohrium	108 Hs 265 Hassium	109 Mt 266 Meitnerium	110 Ds 267 Darmstadtium	111 Rg 268 Roentgenium	112 Cn 269 Copernicium	113 Uut 270 Ununtrium	114 Fl 271 Flerovium	115 Uup 272 Ununpentium	116 Lv 273 Livermorium	117 Uus 274 Ununseptium	118 Uuo 276 Ununoctium

Figure II.10. Le groupe des lanthanides dans la classification périodique des éléments.

Le seul paramètre significatif variant de façon uniforme le long de la série est la taille de l'ion (rayon ionique), qui décroît régulièrement. L'état de valence le plus commun et le plus stable est Ln^{3+} . Initialement utilisés dans l'industrie pour une variété d'applications comme les lasers, les aimants ou les télévisions, ces éléments trouvent maintenant une grande variété d'applications dans le domaine biomédical et notamment en imagerie⁴⁴.

En effet, la singularité de ce type de matériaux est que le siège de la luminescence réside dans les transitions électroniques intra 4f des électrons des ions lanthanides dopants. Ces orbitales atomiques profondes sont perturbées par l'environnement chimique. La Figure II.11 présente les diagrammes d'énergie partielle des cations Ln^{3+} . Les transitions d'absorptions et d'émissions aux seins des cations lanthanides seront identifiées par les labels des niveaux de départ et d'arrivée. Par exemple le cation Eu^{3+} de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^6$ admet comme état fondamental, l'état 7F_0 et comme premier état

excité l'état 5D_0 . Ainsi une transition de luminescence labélisée $^5D_0 - ^7F_0$ correspond à une émission depuis le premier état excité 5D_0 vers l'état fondamental 7F_0 . Certains de ces ions lanthanides autorisent un type d'excitation-fluorescence dont le mécanisme de fluorescence est différent du mécanisme classique (voir II.B.1). Par ailleurs, les lanthanides possèdent des propriétés optiques intéressantes incluant une excellente photostabilité (pas ou peu de photoblanchiment), un grand déplacement de Stokes (fluorescence classique) ou anti-Stokes (fluorescence par up-conversion), une longue durée de vie de la luminescence et des bandes d'émission étroites^{83,84}. La combinaison de ces propriétés fait des matériaux à base de lanthanide d'excellents agents d'imagerie par fluorescence.

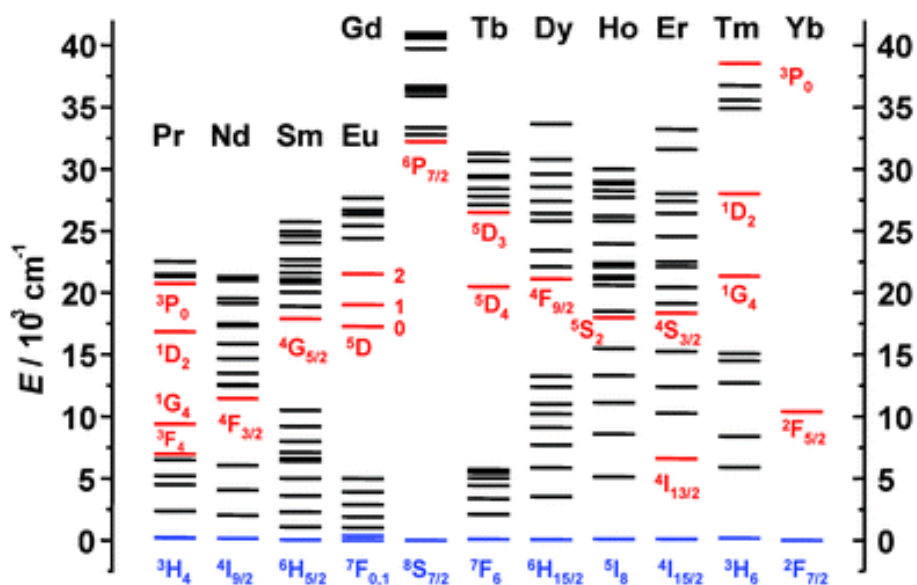


Figure II.11. Diagrammes d'énergie partielle des ions lanthanides. Niveaux luminescents principaux en rouge ; niveaux fondamentaux en bleu⁸⁵.

En outre, le nombre d'électrons non appariés de l'orbitale 4f apporte des propriétés paramagnétiques significatives. L'élément le plus connu en médecine moderne est, comme nous l'avons présenté plus haut, le gadolinium, qui est vastement utilisé pour le diagnostic médical en IRM. Parmi tous les éléments chimiques, celui-ci possède le nombre maximal d'électrons non-appariés sur l'orbitale 4f (sept au total) ce qui lui confère une forte symétrie et un long temps de relaxation.

De plus, comme nous l'avons présenté plus haut, leur numéro atomique élevé permet une atténuation des rayons X et donc une utilisation possible en tomodensitométrie.

Etat de l'art

L'avantage majeur des lanthanides est la possibilité de combiner toutes ces propriétés au sein d'un même agent pour l'imagerie biologique.

2. Applications en imagerie

Ainsi, de nombreux auteurs proposent des applications variées de nanoparticules à base de lanthanides (LNPs) exploitant une ou plusieurs propriétés d'imagerie.

a) Fluorescence

La vaste majorité d'applications des LNPs pour la fluorescence utilise le phénomène d'up-conversion au sein de matériaux par co-dopage avec l'ytterbium (Yb^{3+}) et un autre cation de lanthanide (erbium : Er^{3+} ; thulium : Tm^{3+} ou holmium : Ho^{3+}) où le premier ion lanthanide (sensibilisateur) absorbe l'énergie excitatrice et la transmet au second (émetteur) qui génère l'émission d'une fluorescence plus énergétique que l'excitatrice⁸⁶. Les longueurs d'ondes d'émission dépendent donc du choix de ces éléments dopants, de leurs proportions et également de la matrice dans laquelle ils sont incorporés. Par exemple, après excitation à 980 nm, un co-dopage Yb^{3+} à 18% et Er^{3+} à 2% au sein d'une matrice de NaYF_4 ($\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ (18/2)) produit une fluorescence jaune alors que le même co-dopage en proportions différentes ($\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ (60/2)) produit une fluorescence rouge et qu'une modification d'un élément du couple de dopants ($\text{NaYF}_4 : \text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ (20/0,2)) produit une fluorescence bleu⁸⁷.

Comme présenté précédemment, l'utilisation de ce phénomène permet donc une excitation dans le proche infrarouge diminuant nettement l'absorption et l'autofluorescence des tissus par rapport à une excitation dans le visible pour les quantum dots par exemple⁸⁸. Ces LNPs ont donc été utilisées pour l'imagerie *in vivo* chez le petit animal dans différentes applications : suivi de leur biodistribution, ciblage de cellules tumorales, l'imagerie vasculaire...⁸⁹⁻⁹³. A noter que pour profiter au mieux de la fenêtre de transparence des tissus (voir II.B.1), il est préférable que l'excitation et l'émission se situent toutes deux dans le proche infrarouge pour une meilleure propagation du signal.

b) IRM

De nombreuses LNPs (principalement à base de Gd) ont été caractérisées pour une utilisation en IRM. Parmi elles, on retrouve les NPs de Gd_2O_3 utilisées notamment pour le

Etat de l'art

diagnostic de tumeur cérébrales⁹⁴, les GdS:Eu^{3+} utilisés pour l'imagerie bi-modale (fluorescence et IRM) de cellules cancéreuses⁹⁵ ou les NaGdF_4 montrant un meilleur contraste en angiographie cérébrale que les agents commerciaux utilisés en clinique⁹⁶.

c) TDM

Des NPs de compositions similaires ont également été utilisés comme agent de contraste généraliste en tomodensitométrie ($\text{NaYbF}_4:\text{Er}$)⁹⁷ ou pour l'imagerie bimodale IRM/TDM ($\text{Yb}_2\text{O}_3:\text{Gd}$)⁷³.

d) PET/SPECT

L'incorporation de radionucléides au sein de matrices de lanthanides est souvent réalisée pour suivre avec sensibilité leur distribution en combinaison avec l'IRM et/ou la TDM (voir II.B.4). La majorité des études sur le sujet se focalise sur l'utilisation du samarium (^{153}Sm). Cette méthode est notamment mise en place pour suivre la distribution et évaluer la toxicité dans l'organisme de LNPs utilisées classiquement en IRM⁹⁸.

e) Multimodalité

Pour finir, il existe une multitude d'application de combinaisons des modalités d'imagerie principalement pour combiner les informations anatomiques et quantitative. Parmi les exemples les plus marquants se trouvent la combinaison de la fluorescence par up-conversion (UC) avec l'IRM pour le suivi de cellules tumorales ($\text{NaGdF}_4:\text{Yb,Er}$)⁹⁹ ou le diagnostic et la chirurgie guidée par fluorescence de tumeurs cérébrale ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Gd}$)¹⁰⁰ ou bien encore la combinaisons de l'UC et de la TDM pour le ciblage tumoral ($\text{LaF}_3:\text{Yb,Tm}$)¹⁰¹ ou lymphatique ($\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Tm}$)¹⁰².

La littérature riche sur le sujet a donc mis en avant le potentiel immense de ces nouveaux matériaux à base de lanthanides en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie biomédicale. Ceux-ci permettent de surpasser les performances des agents commerciaux habituellement utilisés en clinique et montrent une excellente biocompatibilité.

D. La thérapie cellulaire

De nombreux domaines de recherche préclinique et clinique peuvent donc bénéficier des avantages de nouveaux traceurs multimodaux à base de lanthanides comme notamment la thérapie cellulaire.

La thérapie cellulaire apparaît comme une évolution majeure de la médecine moderne de par son potentiel thérapeutique dans un large panel de pathologies : cancer, maladies cardiovasculaires, rénales...

Elle consiste en l'injection, ou autres formes de greffes, de cellules aux potentiels thérapeutiques chez un patient dans le but de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe déficient.

Les cellules utilisées peuvent provenir du patient lui-même (autogreffe) ou d'un donneur sain (allogreffe) et présenter un potentiel de différenciation variable. Différents types cellulaires plus ou moins différenciés sont utilisés en fonction de leur facilité d'obtention et/ou de leur application :

- Cellules adultes différenciées pour remplacer des cellules détruites ou non fonctionnelles
- Cellules adultes immatures (mésenchymateuses ou souches)
- Cellules souches embryonnaires
- Cellules souches induites

Ces trois derniers types cellulaires peuvent se différencier sur le site de la lésion ou bien sécréter des facteurs paracrines permettant la diminution de l'inflammation, le recrutement d'autres cellules...

1. Origines des cellules utilisées en thérapie

Les cellules les plus immatures et présentant le plus fort potentiel de différenciation sont les cellules souches embryonnaires. Lors du développement, suite à la fécondation et jusqu'au stade morula (de 16 à 64 cellules) (Figure II.12), les cellules restent indifférenciées et sont totipotentes, c'est-à-dire que chacune d'entre elle est capable de se spécialiser pour former le blastocyste. Cette structure comprend le trophoblaste (à l'origine des annexes

embryonnaire) et les cellules de la masse interne pluripotentes qui à leur tour vont se spécialiser pour donner les lignées/feuillet ectodermiques, mésodermiques et endodermiques. Chacune de ces lignées multipotentes se spécialisera finalement vers des précurseurs unipotents à l'origine des cellules spécialisées et fonctionnelles des différents organes. Chez l'adulte, il persiste des cellules immatures multipotentes permettant le renouvellement cellulaire.

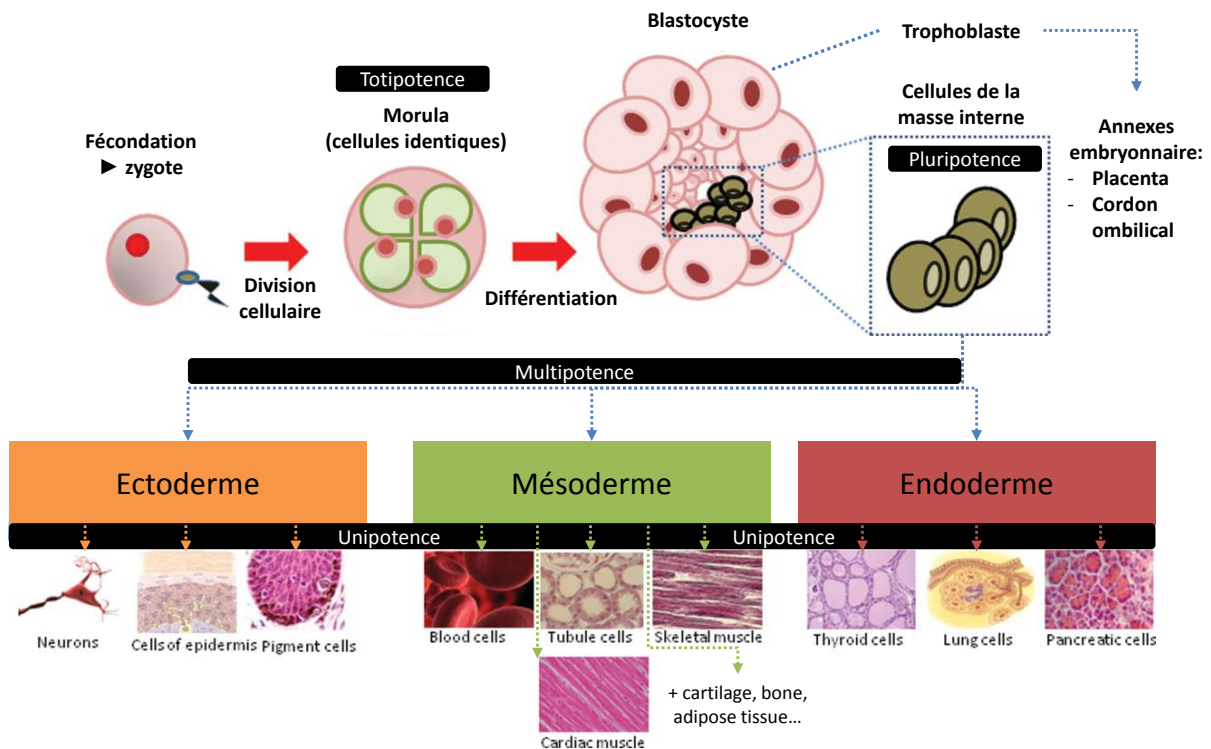


Figure II.12. Origine des cellules souches embryonnaires¹⁰³. Potentiels de différenciation : Totipotence = toutes les cellules de l'organisme + les annexes embryonnaires. Pluripotence = trois lignages ectodermique, mésodermique et endodermique. Multipotence = différents types cellulaires, Unipotence = un seul type cellulaire.

Une cellule souche est donc définie par sa capacité d'autorenouveaulement, c'est-à-dire à de pouvoir se diviser à l'identique indéfiniment, ainsi que par son potentiel de différenciation vers différentes lignées cellulaires¹⁰⁴.

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont en réalité peu utilisées en recherche préclinique et clinique du fait des problèmes éthiques et réglementaires que cela soulève ainsi que du risque de tumorigénicité avéré (développement anarchique de tissus provenant des trois feuilletts embryonnaires (tératomes))¹⁰⁵.

Une avancée majeure dans le domaine a permis en 2006 de créer des cellules souches pluripotentes induites (IPSCs) par reprogrammation de cellules différenciées (fibroblaste) en réactivant l'expression de gènes associés à la pluripotence¹⁰⁶. Ceci permet d'envisager une alternative à l'utilisation de ces ESCs.

Malgré tout, la vaste majorité des cellules utilisées en thérapie est d'origine adulte. Au sein des tissus, se trouvent donc des cellules adultes multipotentes plus ou moins immatures qualifiées de cellules souches ou stromales selon leur potentiel.

2. Les cellules stromales mésenchymateuses

A ce jour, les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) sont les plus utilisées en thérapie cellulaire régénérative : en 2014, elles représentaient 35% des essais cliniques enregistrés de par le monde (Figure II.13).

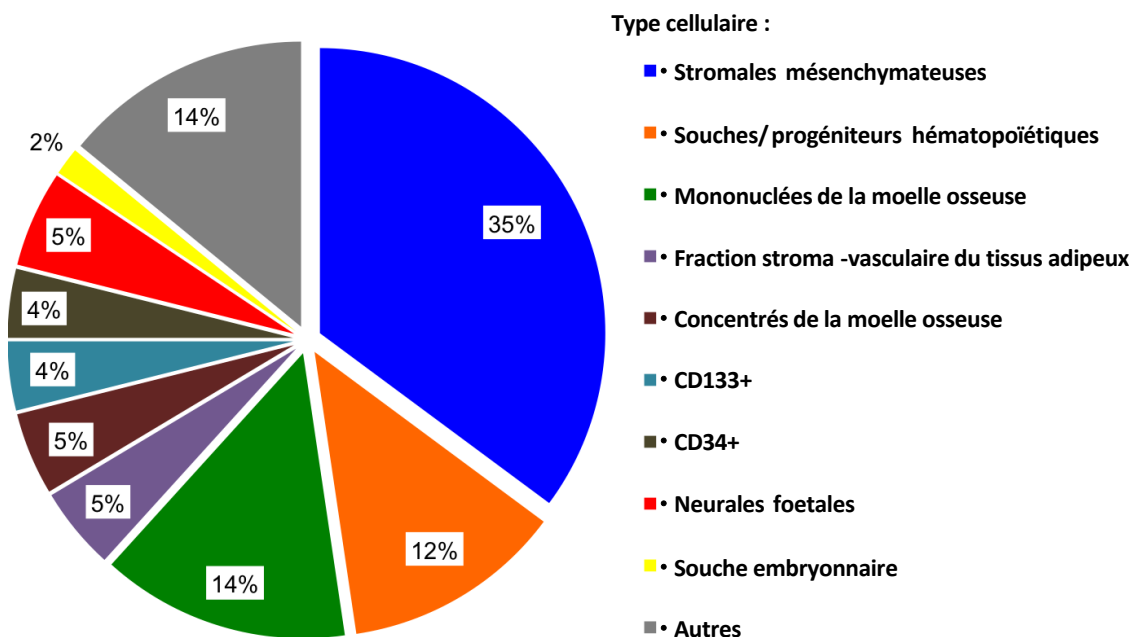


Figure II.13. Types cellulaires utilisés lors d'essais cliniques de thérapie cellulaires en 2014¹⁰⁷.

Le stroma est globalement défini comme le tissu de soutien d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. En effet, ces cellules ont été premièrement isolées à partir de la moelle osseuse et ont montré des capacités régénératives du tissu osseux ainsi que de soutien à l'hématopoïèse *in vivo*¹⁰⁸. Au sein de la moelle osseuse, on retrouve des niches périvasculaires où se trouvent les cellules souches hématopoïétiques, capables de se différencier vers tous les lignages des cellules sanguines (lignées lymphoïdes et myéloïdes)

Etat de l'art

ainsi que les MSCs à proximité directe. Au cours du temps, d'autres sources tissulaires de MSCs ont été identifiées comme par exemple le tissu adipeux¹⁰⁹, le sang de cordon ombilical ou la pulpe dentaire^{103,110}. Cependant, la moelle osseuse reste la première source de MSCs utilisée lors des études précliniques et cliniques.

En 2006, la société internationale de thérapie cellulaire a défini les critères minimum permettant de caractériser les MSCs¹¹¹ :

- Adhérence au plastique en condition normale de culture cellulaire.
- Expression des antigènes de surface (>95%) : CD105 (Endoglin); CD73 (Ecto-5-Nucleotidase); CD90 (Thy-1).
- Absence d'expression des antigènes de surface (<2%) : CD45 (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type C, marqueur leucocytaire); CD34 (progéniteurs hématopoïétiques/cellules endothéliales); CD14 ou CD11b (monocytes et macrophages); CD79α ou CD19 (lymphocytes B); HLA-DR (Récepteur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) en l'absence de stimulation par l'interféron γ.
- Différenciation multipotente *in vitro* vers les lignages ostéoblastiques, chondrogéniques et adipogéniques.

Leur intérêt particulier en thérapie cellulaire provient de leurs nombreuses caractéristiques adaptées à la médecine régénérative :

- Sécrétion d'un large panel de facteurs paracrines (agissant sur les cellules environnantes) aux effets anti-apoptotique, immunomodulateur, anti-fibrotique, pro-angiogénique, trophique et chémo-attractant¹¹².
- Multipotence : différenciation *in vivo* vers différents lignages afin de régénérer des tissus endommagés. Principalement ostéogénique, adipogénique et chondrogénique mais aussi musculaire ou dermique^{113,114}.
- Propriétés migratoires qui leur permettent de coloniser des sites d'inflammation ou de lésion tissulaire^{115,116}.

E. Traceurs cellulaires et thérapie

Le suivi de cellules *in vitro* et *in vivo* est une étape critique en recherche préclinique. En effet, il est souvent nécessaire de devoir réaliser l'examen de coupes histologiques après sacrifice des animaux afin de localiser des cibles d'intérêt à cause de limitations technologiques. C'est pourquoi le développement de nouveaux traceurs cellulaires est une nécessité. Ceci est particulièrement vrai en thérapie cellulaire afin d'apporter la preuve de l'efficacité d'un protocole thérapeutique ou bien de mieux comprendre des mécanismes cellulaires⁴⁹ notamment lors de l'utilisation de cellules mésenchymateuses qui comme nous l'avons présenté plus haut sont capable de migrer.

Ainsi, de nombreux types de traceurs sont régulièrement développés et/ou testés spécifiquement pour le suivi de cellules à potentiel thérapeutique. Deux stratégies sont alors identifiables : le marquage indirect par l'incorporation de gènes rapporteur et le marquage direct à l'aide de nanoparticules ou d'agents chimiques^{32,117}.

1. Gènes rapporteurs

La première stratégie repose principalement sur l'expression de gènes rapporteurs permettant la production de bioluminescence (luciférase) ou de fluorescence (GFP) et a été utilisé chez l'animal de laboratoire pour suivre le devenir de différentes cellules¹¹⁸⁻¹²⁰. Il est également possible d'utiliser la Thymidine Kinase de type 1 du virus Herpès simplex (HSV1-tk) qui permet l'incorporation de sondes radioactives dans les cellules vivantes par phosphorylation permettant la détection ultérieure par PET ou SPECT¹²¹.

Cependant, cette stratégie nécessitant la modification génétique des cellules suivies, l'insertion de gènes rapporteurs peut conduire à l'altération de leurs propriétés biologiques.

2. Nanoparticules

Pour la deuxième stratégie, la méthode la plus classiquement utilisée est l'IRM car elle permet de suivre en temps réel le devenir des cellules de manière non invasive y compris dans les zones anatomiques difficiles d'accès comme le cerveau. Les agents de contraste classiques comme les chélates de gadolinium et les oxydes de fer superparamagnétiques ont été largement utilisés à ces fins y compris lors d'études cliniques^{122,123}. Egalement, le

Etat de l'art

marquage à l'aide de sondes radioactives comme le ^{18}F -fluorodeoxyglucose^{124,125} permet de détecter les cellules de manière sensible par PET.

Par ailleurs, l'utilisation de fluorescence classique étant très répandue en recherche préclinique, de nombreuses études tirent parti des propriétés optiques des Quantum dots afin de marquer et suivre des cellules immatures^{38,40,126-128}. Néanmoins, comme nous l'avons présenté plus haut, l'autofluorescence des tissus limite les possibilités de suivi *in vivo*. Les nanoparticules capables de produire de la fluorescence par up-conversion apparaissent donc comme une alternative pour pallier cette limitation et suivre le devenir des cellules (souches et/ou mésenchymateuses) à moindre coût et de manière sensible. Des nanoparticules à base de lanthanide sont donc utilisées à ces fins depuis quelques années¹²⁹⁻¹³¹. D'après les données de la littérature, ces nouveaux marqueurs ne semblent pas altérer les facultés de prolifération ou de différenciation des cellules et semble produire un marquage stable permettant le suivi *in vivo* au cours du temps. Cependant, l'évaluation de leur toxicité nécessite encore une étude approfondie.

Chacune des méthodes présentant des limitations (résolution ou sensibilité), l'imagerie multimodale permet d'apporter une information plus complète. La combinaison de l'IRM et de la fluorescence apparait comme idéale car elle permet, d'une part la localisation anatomique des cellules marquées, d'autre part l'examen précis par fluorescence.

Ainsi, plusieurs études ont utilisé une combinaison de nanoparticules magnétiques associées à des fluorochromes organiques afin de suivre le devenir de cellules mésenchymateuses *in vivo* puis de corrélérer la localisation anatomique par examen *ex vivo* de coupes histologiques¹³²⁻¹³⁴. A notre connaissance, très peu d'études existent sur l'utilisation d'agents multimodaux combinant IRM et fluorescence par up-conversion pour le suivi de cellules aux potentiels thérapeutiques¹³⁵.

F. Projet de thèse

Mon projet de thèse est né de la volonté de différentes entités de recherche de faire converger les savoirs dans des domaines translationnels. D'une part, le Centre d'Élaboration de Matériaux et d'Études Structurales (CEMES) et sa société dérivée Chromalys ont initiés la transposition des connaissances (et du savoir-faire) acquises sur les nanoparticules

Etat de l'art

inorganiques à base de lanthanides vers la biologie. D'autre part, l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires et plus particulièrement l'équipe microenvironnement stromal et insuffisance cardiaque, possédant une expertise en thérapie cellulaire, cherchait un outil fiable et à coût modéré pour le suivi des cellules après implantation.

Ici, j'ai donc travaillé à l'interface de la chimie, de la physique et de la biologie afin de mettre au point un traceur fiable, moins coûteux et plus performant que ceux déjà sur le marché afin de suivre avec plus de facilité le devenir des cellules stromales mésenchymateuses une fois implantées dans un organisme de manière non invasive et non délétère. Par extension, les MSCs sont ici un outil de validation des NPs servant de tremplin pour une utilisation plus large avec tout type cellulaire et ou organisme.

1. Cahier des charges pour le développement d'un nouveau traceur pour la biologie

Lors du développement d'un nouvel agent d'imagerie (agent de contraste ou traceur cellulaire), tout comme pour un médicament, un certain nombre d'étapes doivent être validées avant son utilisation à large échelle notamment chez l'Homme. Ceci inclue la découverte et le développement de cet agent, les essais précliniques de performance et de toxicité puis les essais cliniques chez l'Homme avant validation pour une utilisation en routine. Ici nous nous focaliserons sur la mise au point préclinique de nanoparticules qui constitue le cœur de ces travaux de thèse.

a) Efficacité

De manière générale, un agent d'imagerie efficace devra produire un contraste suffisant lors de son utilisation dans la ou les (en cas d'agent multimodal) technique(s) d'imagerie appropriée(s). Lors du développement d'agents d'imagerie spécifiquement pour le marquage et le suivi cellulaire, des prérequis supplémentaires viennent s'ajouter en particulier lors de l'utilisation de nanoparticules.

Prasad et al¹³⁶ définissent les critères essentiels que doit remplir un fluorophore idéal pour l'imagerie biologique :

- Dispersabilité/solubilité dans le milieu biologique
- Association spécifique à la molécule, à l'organite ou à la cellule cible

Etat de l'art

- Fort rendement quantique
- Stabilité environnementale
- Absence de photoblanchiment

Autrement dit, un fluorophore, tout comme tout autre type de traceur cellulaire devra être en mesure de diffuser dans la cellule ou d'être internalisé par celle-ci de manière stable et produire un fort signal sans dégradation et/ou relargage de déchets toxiques.

b) Biocompatibilité

Le domaine des nanotechnologies prenant son essor en biomédecine, de nombreux matériaux voient le jour. Avant leur utilisation en recherche clinique, il est donc nécessaire de vérifier leur biocompatibilité et leur toxicité cellulaire que ce soit pour des agents de contraste ou à plus forte raison pour des traceurs cellulaires. L'utilisation de nanoparticules nécessite de prendre en compte un certain nombre de paramètres qui peuvent influencer leur biocompatibilité^{137,138} comme la taille, la forme ou la stabilité physico-chimique en milieu biologique. Un large panel de tests complémentaires existe, mais aucun ne permettant à lui seul d'apporter une réponse absolue sur la toxicité, il est nécessaire de les combiner^{139,140}.

L'utilisation de méthodes simples permet de réaliser un premier screening à large échelle afin de déterminer les meilleures conditions d'utilisation des NPs. L'évaluation de l'intégrité membranaire (bleu trypan, rouge neutre) ainsi que de l'activité métabolique (sels de tetrazolium) des cellules traitées ont été largement utilisés dans la littérature à ces fins¹⁴⁰. L'étude de la biocompatibilité peut ensuite être complétée par différentes méthodes apportant des informations sur la mort cellulaire (LDH, Live/Dead), la production d'espèces réactives de l'oxygène... Soenen et collaborateurs¹³⁷ proposent l'arbre décisionnel suivant (Figure II.14) pour l'évaluation de la biocompatibilité de nanoparticules où la relation entre les propriétés physico-chimiques de celles-ci et l'impact cellulaire permet une adaptation de la stratégie de développement.

Dans l'optique de développer un marqueur cellulaire fiable et polyvalent, nous considérons qu'il est préférable d'effectuer ces travaux sur des cultures primaires plus sensibles aux modifications de leur propriétés biologiques et non phagocytaires afin d'obtenir des résultats préliminaires plus robustes pour une utilisation ultérieure à plus large échelle. Ceci

nécessite également d'intégrer des tests fonctionnels de non atteintes des propriétés biologiques de ces cellules après exposition aux nanoparticules.

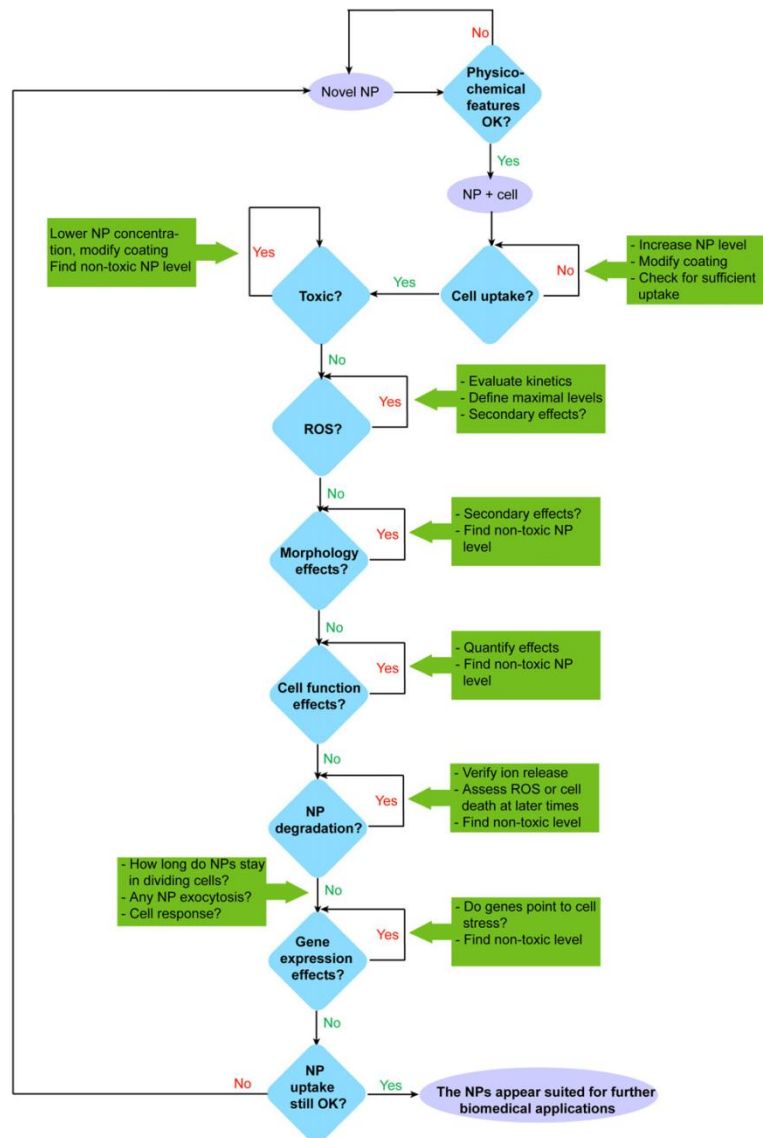


Figure II.14. Arbre décisionnel pour l'évaluation de la biocompatibilité des nanoparticules. Proposé par Soenen et collaborateurs¹³⁷.

L'évaluation de l'impact des NPs à l'échelle de l'organisme devra quant à elle être effectuée par mesure de nombreux paramètres physiologiques (poids, douleur, atteintes tissulaires...).

2. Présentation des candidats

Comme nous l'avons vu précédemment, les matériaux à base de lanthanides présentent des avantages pour un certain nombre de techniques d'imagerie. En ce qui concerne l'IRM, le gadolinium est couramment employé, mais sa forme ionique présente un risque de toxicité non négligeable. Une stratégie en développement consiste à confiner le gadolinium de façon

Etat de l'art

plus importante au sein de nanoparticules afin d'éviter le relargage de Gd et les risques de complication^{44,61}. De plus, leur plus grand poids moléculaire (comparativement aux chélates) permet une élimination plus lente et donc des études sur de plus longues périodes⁵⁶. La structure particulière de ces nouveaux types d'AC facilite également la combinaison de plusieurs modalités d'imagerie au sein d'un même objet (voir II.B.6), ce qui est beaucoup plus complexe à réaliser avec les chélates du fait de leur structure moléculaire¹⁴¹. En outre, comme nous l'avons vu précédemment, le gadolinium, comme tous les autres lanthanides possède des propriétés de contraste aux rayons X. Enfin, l'imagerie de fluorescence étant un outil irremplaçable en recherche préclinique, il est préférable que le matériau choisi présente de telles propriétés. La fluorescence classique, la plus utilisée à ce jour, est plus adaptée à un examen *in vitro* notamment par microscopie. Cependant, elle présente des limitations inhérentes à son fonctionnement physique, notamment dues à l'opacité des tissus biologiques dans le domaine visible. De ce fait, l'imagerie proche infrarouge et les matériaux inorganiques à base de lanthanides doués de conversion ascendante de photons (up-conversion) apparaissent comme une amélioration tel qu'exposé plus haut (II.B.1). La combinaison de plusieurs ions trivalents de lanthanides dans différents matériaux hôtes peut notamment conduire à l'émission de fluorescence dans le visible ou le proche infrarouge après excitation dans le proche infrarouge. L'efficacité d'émission est également dépendante du choix de ces ions dopants, de la structure et des propriétés physiques de la matrice hôte.

Ainsi, je me suis employé à valider la biocompatibilité et apporter la preuve du potentiel d'imagerie biologique multimodale de nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium (Gd_2O_2S) dopés europium ($Gd_2O_2S :Eu^{3+}$) et dopés ytterbium/thulium ($Gd_2O_2S :Yb/Tm^{3+}$) ainsi que de leur application en tant que traceur en thérapie cellulaire. En effet, la matrice de Gd_2O_2S développée par le CEMES/Chromalys a été choisie pour son fort potentiel en IRM et TDM et les dopants pour leurs propriétés de luminescence adaptées à un examen *in vitro* par fluorescence classique (europium) ou *in vivo* par fluorescence à up-conversion (ytterbium/thulium).

Résultats expérimentaux

III. Développement d'outils pour l'imagerie biologique

A. Introduction

Dans le but de développer des outils polyvalents et fiables pour l'imagerie biologique, nous avons testé deux formulations de nanoparticules multimodales à base de lanthanides. Toutes deux présentent une matrice d'oxysulfure de gadolinium (Gd_2O_2S) permettant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie (TDM). L'ajout d'autres lanthanides comme dopant permet d'apporter des propriétés de fluorescence, différentes selon le ou les lanthanide(s) choisi(s).

La première formulation testée, comprenant l'euprimum (Eu) comme élément dopant ($Gd_2O_2S:Eu^{3+}$), a été largement caractérisée lors des travaux antérieurs de l'équipe¹⁴²⁻¹⁴⁵. Ses propriétés d'imagerie de fluorescence classique nous ont permis de poursuivre l'étude de ses champs d'applications notamment pour le marquage cellulaire.

La deuxième formulation, comprenant le couple sensibilisateur/émetteur ytterbium (Yb)/thulium (Tm) comme éléments dopants ($Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$) présente quant à elle des propriétés innovantes. En effet, grâce au phénomène d'up-conversion (UC), il devient alors possible d'étendre les applications au suivi de fluorescence *in vivo*.

Un grand nombre de travaux exploitant les propriétés d'UC de différents fluorophores pour l'imagerie biologique indique la nécessité d'adapter les systèmes d'imagerie *in vivo* traditionnels (Maestro, Caliper Lumina II, IVIS spectrum system...)¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Au cours de ces travaux nous avons développé un système d'imagerie personnalisé dédié à la visualisation de nos NPs $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ chez l'animal de laboratoire.

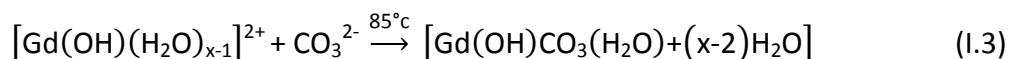
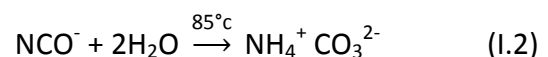
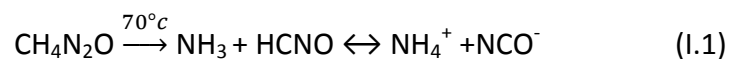
Cette première étude a donc consisté en la caractérisation et le développement des agents d'imagerie que sont les deux types de NPs énoncés plus haut ainsi qu'en la mise au point d'un système d'imagerie proche infrarouge pour le petit animal.

B. Synthèse des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium (Gd₂O₂S)

Les nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium ont été synthétisées à partir de précurseurs nitrates en milieu aqueux. Le protocole mis en place est identique quel que soit le ou les dopants choisis. Seules les proportions des précurseurs de lanthanides varient. La méthode utilisée, basée sur les travaux de Matijevic et Hsu¹⁴⁹ et améliorée par la suite est maintenant bien établie au laboratoire^{142,143,145}. Celle-ci comporte trois étapes principales :

I. Précipitation contrôlée

Les précurseurs de lanthanide (nitrates) sont dissous à $5,6 \cdot 10^{-3}$ M (avec un rapport Gd/Ln dépendant du dopant souhaité) en présence de 0,5 M d'urée (CH₄N₂O) dans un mélange d'eau et de 20% d'éthanol (afin de contrôler la monodispersité). La réaction est maintenue sous agitation et chauffée à 85°C. Dans un premier temps, l'urée se décompose à des températures supérieures à 70°C. Son hydrolyse conduit à la formation de cyanates d'ammonium (I.1) ensuite convertis en carbonates d'ammonium (I.2). Parallèlement, les nitrates de lanthanides sont hydrolysés. Enfin, les carbonates issus de la décomposition de l'urée réagissent avec les lanthanides pour former les carbonates de gadolinium dopés aux lanthanides (I.3), formant alors un précipité blanc. Au cours de cette réaction, les dopants viennent se substituer au gadolinium au sein des carbonates en fonction du rapport Gd/Ln. Il a été montré que durant la phase de précipitation, la taille des NPs formées augmente avec le temps de réaction^{142,143}. Cette croissance est accompagnée d'une augmentation de la turbidité de la solution. La taille des NPs peut alors être contrôlée par mesure de ce paramètre.

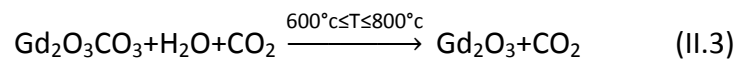
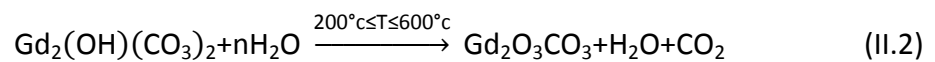
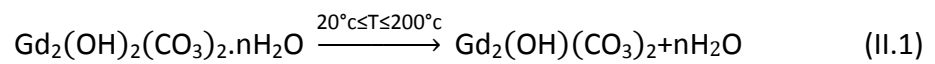


La suspension est alors centrifugée afin d'isoler le précipité qui est ensuite lavé plusieurs fois par resuspension dans l'eau distillée afin d'éliminer l'urée, les sels d'ammonium et les

précurseurs qui n'auraient pas réagi. La phase solide est finalement séchée à l'étuve à 85°C pendant une nuit.

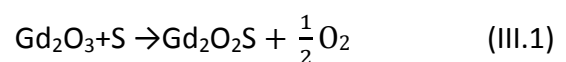
II. Décomposition thermique

Les hydrocarbonates formés subissent ensuite un traitement thermique par recuit à 750°C pendant 4 h afin d'obtenir les oxydes. Les carbonates subissent plusieurs transformations dépendantes de la température au cours de cette décomposition thermique. Ceci inclue la déshydratation par évaporation de l'eau adsorbée et de l'eau de structure ainsi que la décomposition des carbonates (II.1-3).



III. Sulfuration

Les oxydes sont finement broyés avant d'être placés dans un four en présence de soufre. Le traitement thermique à 850°C sous atmosphère inerte d'argon permet la réaction des oxydes avec le soufre vaporisé pour former les oxysulfures de gadolinium dopés aux lanthanides (III.1).



C. Caractérisation physico-chimique

1. Matrice d'oxysulfure de gadolinium

Une fois obtenues, les NPs ont été caractérisées afin de déterminer leurs propriétés physico-chimiques. La diffraction des rayons X (Figure III.1) permet de mettre en évidence des raies intenses, indiquant une bonne cristallisation du composé, et légèrement élargies, caractéristiques des NPs. Les raies ont pu être indexées selon la fiche PDF N°04-006-8819 et montrent que le composé obtenu est, comme attendu, du $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$. Aucun autre pic, notamment provenant de l'oxyde n'a été observé, ce qui indique que le procédé de sulfuration est total.

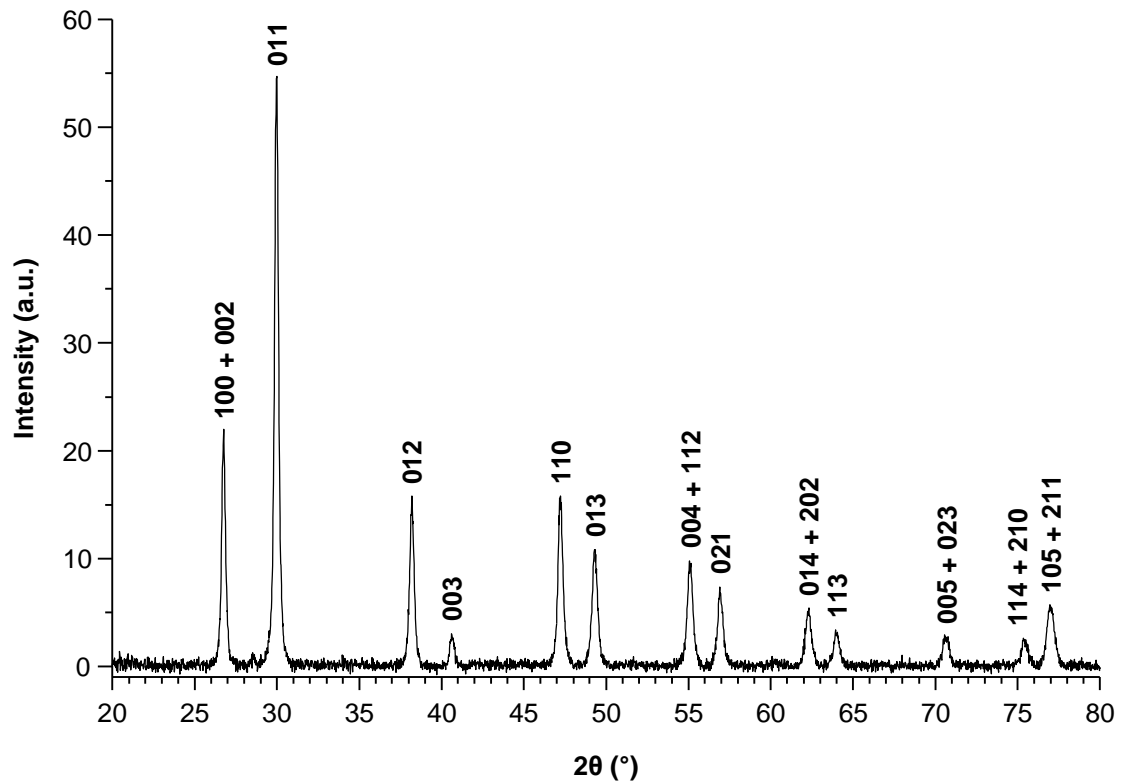


Figure III.1. Diffractogramme de rayons X de poudres de NPs obtenues en fin de synthèse. D'après Lechevallier¹⁴².

Le Gd_2O_2S possède une structure en couches (de type Sillen), et consiste en un empilement de feuillets constitués, d'une part, par la terre rare et l'oxygène, et d'autre part, par plusieurs couches d'atomes de soufre. Les oxysulfures sont formés par intercroissance de couches $[Ln_2O_2]^{2+}$ et de monocouches d'ions S^{2-} (Figure III.2a). Dans cette structure, la terre rare se situe dans un site de coordinance 7, entouré par 3 atomes de soufre et 4 atomes d'oxygène (Figure III.2b).

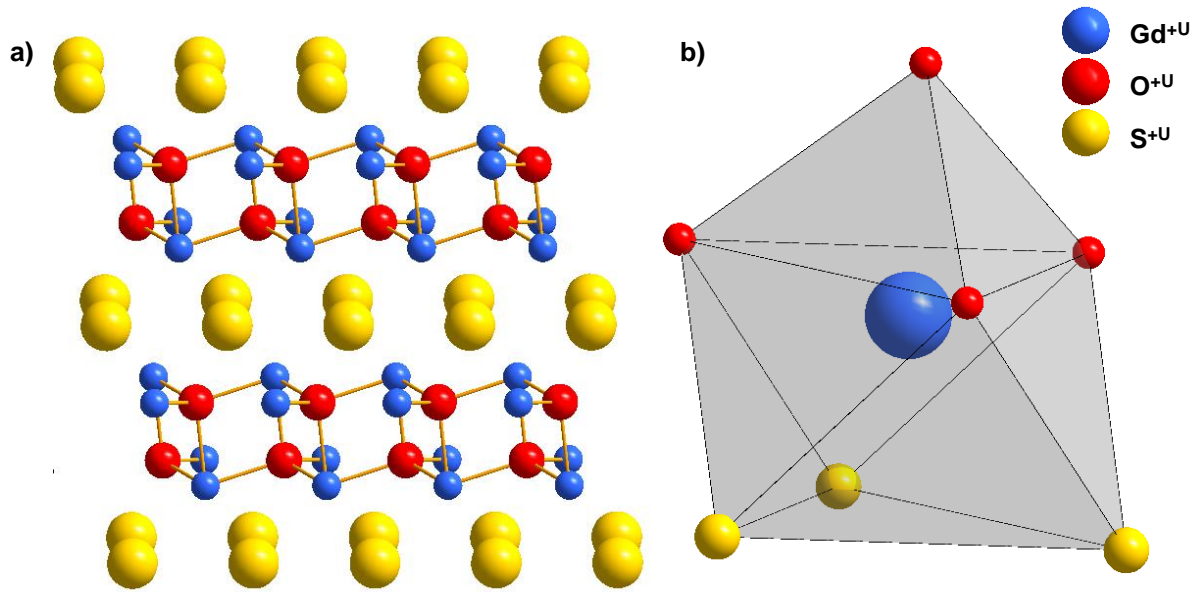


Figure III.2. Représentation de la structure Gd_2O_2S (a) et des polyèdres de coordination présents dans cette structure (b). D'après Lechevallier¹⁴².

L'analyse morphologique par microscopie électronique à balayage et à transmission révèle des NPs sphériques et monodisperses en taille (Figure III.3a,b).

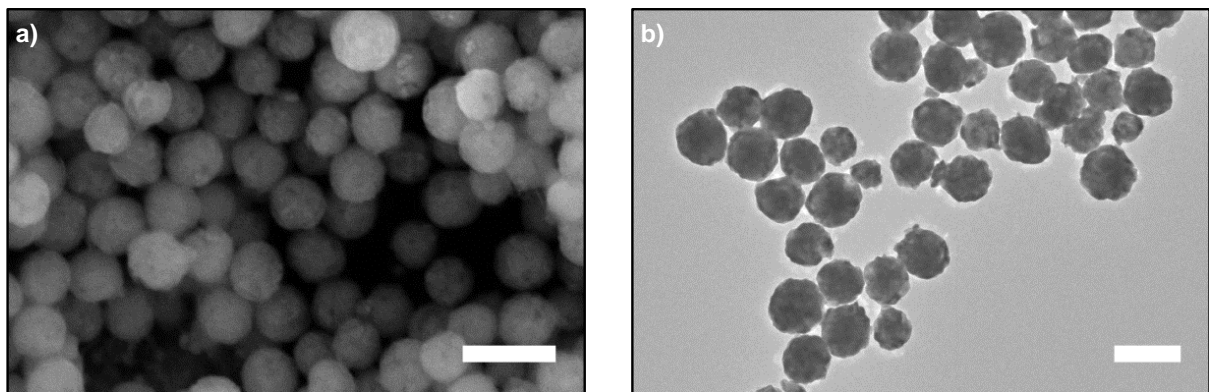


Figure III.3. Morphologie et taille des nanoparticules. Clichés représentatif des nanoparticules obtenues après synthèse acquis en microscopie électronique à a) balayage et b) transmission (barre d'échelle 200nm).

Par la suite, les propriétés de ces NPs en tant qu'agent d'imagerie multimodale ont été évaluées. L'étape finale de sulfuration revêt ici une importance cruciale car elle permet d'améliorer leurs propriétés, notamment de relaxivité, comparativement à des oxydes. Les mesures précédemment effectuées dans l'équipe ont montré un effet majoritairement T_2 favorisant leur action en tant qu'agent de contraste IRM négatif¹⁴⁵. En effet, la relaxivité longitudinale (T_1) est très faible comparativement au Dotarem[®] par exemple. Par ailleurs, il a été montré une corrélation linéaire entre intensité du champ magnétique utilisé et relaxivité

transverse (T_2). Cet effet a par la suite été validé en IRM, apportant la preuve de leur visualisation possible via cette méthode (Figure III.4a).

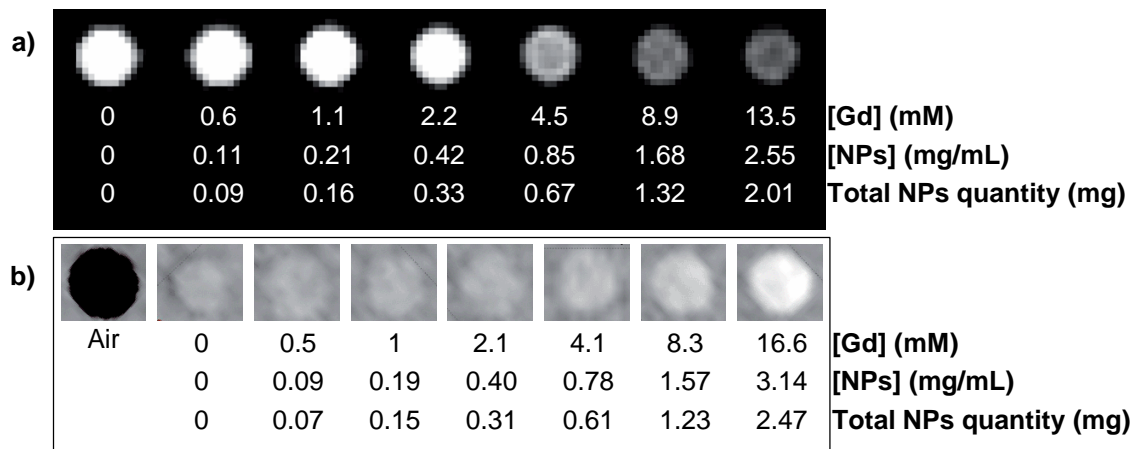


Figure III.4. Propriétés des nanoparticules en imagerie. a) Clichés d'IRM pondéré T_2 acquis à 3 T et 25°C (diamètre 220 nm). b) Tomodensitométrie des $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ dispersées en gel d'agar (image acquise à 100kV). D'après Osseni et al.¹⁴⁵.

Enfin, la faisabilité de visualisation par tomodensitométrie a été évaluée. Il a été mis en évidence que des concentrations supérieures à 4 mM en Gd (soit 0,76 mg/mL en NPs et 0,59 mg de NPs total) permettaient de discerner la cible du bruit de fond en IRM comme en TDM (Figure III.4a,b). Les performances des NPs avec cette modalité d'imagerie à 100 kV sont donc environ deux fois supérieures à celle d'un AC commercial à base d'iode comme l'Omnipaque^{®150}.

Ainsi, la caractérisation physico-chimique des propriétés d'imagerie de la matrice Gd_2O_2S de ces NPs a mis en avant leur potentiel en tant qu'agent d'imagerie bimodal.

2. Propriétés optiques des dopants

Comme précédemment décrit, deux types de dopage ont été réalisés : un dopage avec l'euporium pour une utilisation *in vitro*, et un dopage avec le couple ytterbium/thulium, pour une utilisation *in vivo*.

a) Euporium

Pour l'obtention de NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$, les proportions idéales établies¹⁴³ sont de 95% de gadolinium pour 5% d'euporium soit 95% de Gd_2O_2S pour 5% de Eu_2O_3 ($Gd_{1.9}Eu_{0.1}O_2S$). Ainsi, sur le spectre d'excitation des $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$, on identifie facilement les raies fines des transitions intra-4f⁶. L'aspect le plus intéressant concernant la luminescence est la présence

d'une bande d'absorption large très efficace entre 300 et 370 nm. Cette bande est attribuée à la bande de transfert de charge S-Eu. Pour des longueurs d'onde inférieures à 270 nm, l'efficacité d'excitation augmente à nouveau, correspondant à l'absorption dans la bande de transfert de charge O-Eu comme il est classiquement observé pour l'oxyde. Ainsi, la sulfuration permet également une excitation de l'euprium dans le proche UV (363 nm vs 254 nm pour l'oxyde) ce qui facilite la visualisation avec des équipements de microscopie classiques (Figure III.5). Le spectre d'émission enregistré après excitation à 365 nm présente des raies fines, attribuables aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$ ¹⁵¹. En outre, la raie correspondant à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, majoritaire dans le cas de l'oxyde comme de l'oxysulfure présente une intensité majorée pour l'oxysulfure, comparativement à l'oxyde.

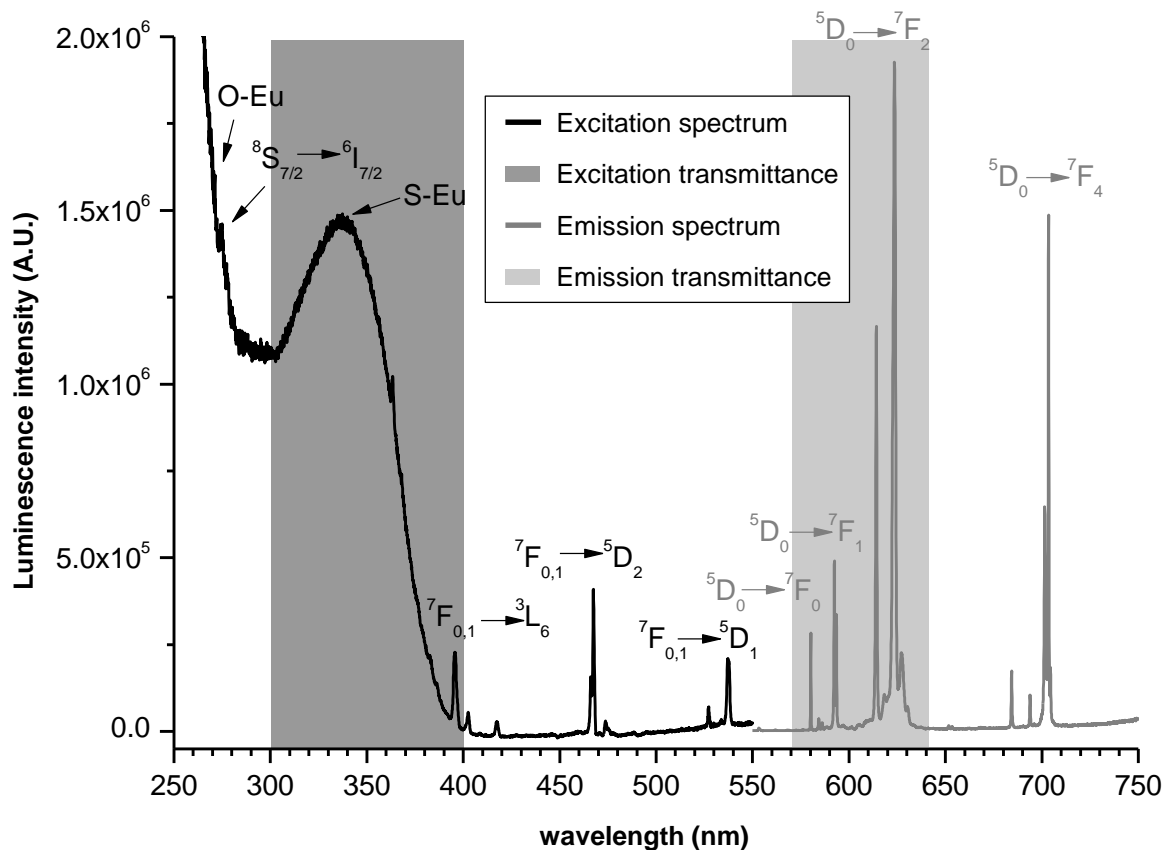


Figure III.5. Spectres de luminescence de $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$. Spectre d'excitation mesuré à 624 nm et spectre d'émission mesuré sous excitation 365 nm. Les fenêtres de transmission utilisées en microscopie de fluorescence apparaissent en transparence.

b) Ytterbium/thulium

Pour la mise au point du nouveau dopant $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$, nous avons testé différentes proportions afin de déterminer les meilleures conditions permettant d'obtenir la plus forte intensité d'émission de fluorescence :

% Gd	% Yb	% Tm	
97,9	2	0,1	▶ $\text{Gd}_{1.958}\text{Yb}_{0.04}\text{Tm}_{0.002}\text{O}_2\text{S}$
95,95	4	0,05	▶ $\text{Gd}_{1.919}\text{Yb}_{0.08}\text{Tm}_{0.001}\text{O}_2\text{S}$
95,9	4	0,1	▶ $\text{Gd}_{1.918}\text{Yb}_{0.08}\text{Tm}_{0.002}\text{O}_2\text{S}$
95,5	4	0,5	▶ $\text{Gd}_{1.91}\text{Yb}_{0.08}\text{Tm}_{0.01}\text{O}_2\text{S}$
89,9	10	0,1	▶ $\text{Gd}_{1.798}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.002}\text{O}_2\text{S}$

Les propriétés optiques des NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ sont très différentes des $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$. En effet, ce nouveau couple de dopants présente un spectre d'émission très intéressant pour l'imagerie biologique *in vivo*. Comme présenté en Figure III.6 et Figure III.7, après excitation à 980 nm, les NPs produisent une intense émission dans le proche infrarouge à 802 nm ainsi que de plus faibles émissions dans le visible centrées à 700, 660 et 480 nm. Ces émissions sont très spécifiques de ion Tm^{3+} et sont attribuables respectivement aux transitions : $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$, $^3\text{F}_3 \rightarrow ^3\text{H}_6$, $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{F}_4$ et $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$.

Les intensités de ces pics d'émission sont variables selon les proportions des éléments dopants utilisés. Nous avons tout d'abord testé différentes proportions d'ions Yb^{3+} (2 ; 4 ; 10%) pour une proportion d'ions Tm^{3+} fixe (0,1%). Comme présenté en Figure III.6, l'intensité dans le rouge profond (700 nm) est maximale pour un taux d' Yb^{3+} de 10%. Dans le proche IR (802 nm), c'est un taux de dopage en Yb^{3+} de 4% qui majore l'intensité d'émission. Dans le but d'utiliser les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ *in vivo*, il est primordial de majorer l'émission dans le proche IR, c'est pourquoi le taux de dopage en Yb a été fixé à 4%.

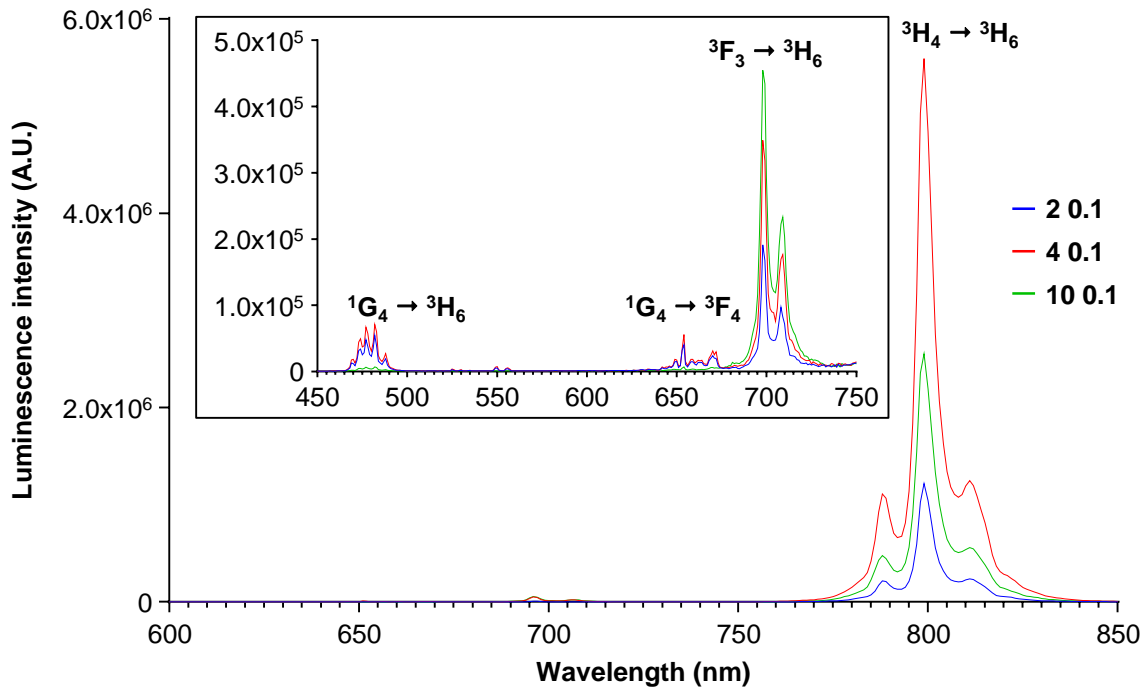


Figure III.6. Spectre d'émission de fluorescence des $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}$ (2 ; 4 ; 10%)/ Tm^{3+} (0,1%) mesuré sous excitation 980 nm.

Une fois la proportion d' Yb^{3+} idéale déterminée, nous avons fait varier la proportion de Tm^{3+} (0,05 ; 0,1 ; 0,5%) (Figure III.7) et déterminé que 0,1% permettait une émission plus intense dans le proche IR (802 nm). C'est donc tout naturellement que nous avons continué notre étude avec ces ratios (Yb=4% et Tm=0,1%).

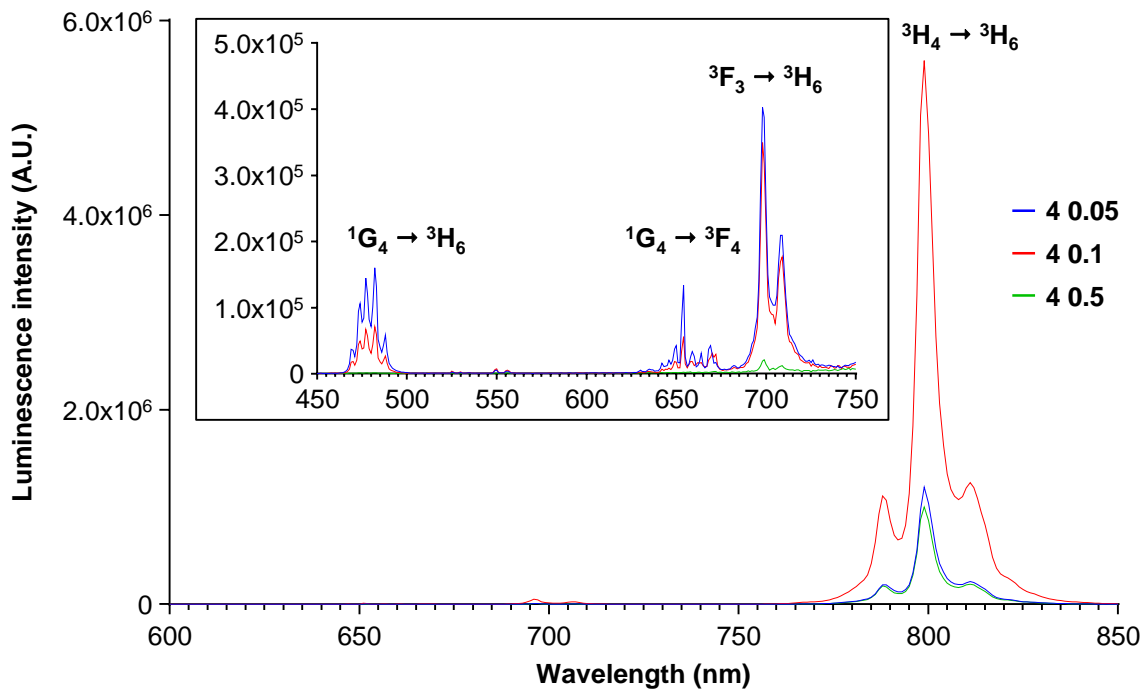


Figure III.7. Spectre d'émission de fluorescence des $Gd_2O_2S:Yb^{3+}$ (4%)/ Tm^{3+} (0,05 ; 0,1 ; 0,5%) mesuré sous excitation 980 nm.

Les transitions au sein de ces NPs ont lieu suite aux transferts énergétiques des ions Yb^{3+} , qui agissent comme sensibilisateurs, vers les ions Tm^{3+} qui agissent comme activateurs. Le diagramme énergétique correspondant est synthétisé en Figure III.8.

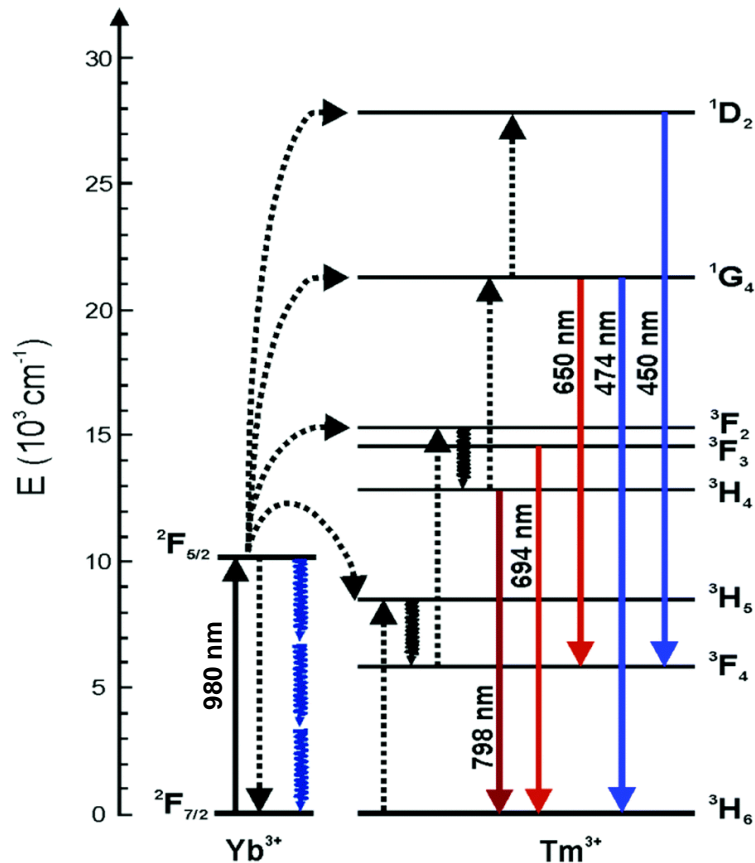


Figure III.8. Diagramme des niveaux énergétiques au sein du couple de dopants ytterbium/thulium. $^3H_4 \rightarrow ^3H_6$: 798nm ; $^3F_3 \rightarrow ^3H_6$: 694nm ; $^1G_4 \rightarrow ^3F_4$: 650nm ; $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$: 474nm ; $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$:450 nm. D'après Arppe et al.¹⁵².

D. Système d'imagerie proche infrarouge personnalisé

1. Mise au point de l'imageur

L'excitation et l'émission principale des NPs $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ étant localisées dans le proche infrarouge, et les systèmes d'imagerie classiquement accessibles ne disposant pas de telles longueurs d'onde (notamment une excitation à 980nm), nous avons développé un système d'imagerie personnalisé axé sur la visualisation de nos NPs chez l'animal de laboratoire (Figure III.9). Ce système est composé d'une enceinte opaque (viii) abritant le matériel nécessaire aux bonnes conditions d'expérimentation animale (système d'anesthésie gazeuse (x) et tapis chauffant (xii)) ainsi qu'à l'acquisition du signal de fluorescence. Le système optique est constitué de plusieurs parties :

- Source d'excitation : une diode laser 980 nm (i) à puissance de sortie modulable est utilisée comme source excitatrice, guidée par fibre optique équipée d'un élargisseur

Développement d'outils pour l'imagerie biologique

de faisceau (ii) permettant d'obtenir un faisceau d'un diamètre de 2,8 cm. L'ajout d'un filtre (laser clean-up 975/10 nm) (iii) en sortie de faisceau permet d'éliminer les longueurs d'onde parasites provenant du laser.

- Acquisition : le système d'acquisition est composé d'une caméra CCD (iv) refroidie pour diminuer le bruit électronique. Devant le capteur est monté un objectif (vi) suivi de filtres (short-pass 842 nm et 890 nm blocking edge) (v) et d'un miroir dichroïque (950 nm cut-off) (vii) permettant d'éliminer la lumière rétrodiffusée du laser.

L'ajout d'une source de lumière blanche (ix) permet de réaliser des clichés en lumière visible et de générer des superpositions avec les images de fluorescence obtenues après acquisition afin de localiser anatomiquement la source d'émission.

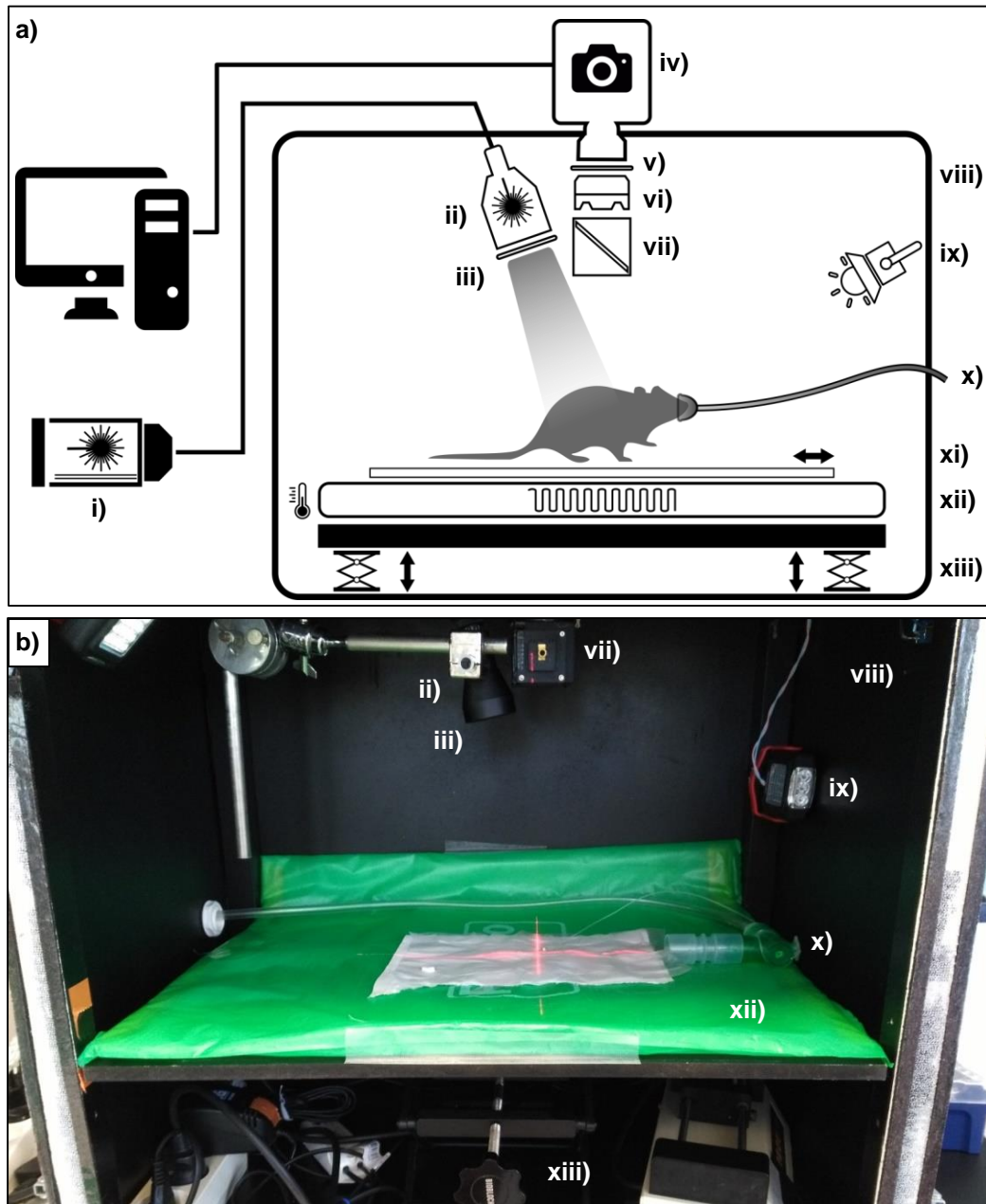


Figure III.9. Système d'imagerie personnalisé. a) Schéma des fonctionnalités du système. b) Photographie de la zone d'acquisition. i) Laser diode 980 nm ii) élargisseur de faisceau iii) Filtre d'excitation iv) Caméra CCD v) Filtre d'émission vi) Objectif vii) Filtre dichroïque viii) Enceinte opaque ix) Lumière blanche x) Système d'anesthésie gazeuse xi) Support des échantillons xii) tapis chauffant xiii) réglage de l'axe z.

L'étude de l'efficacité de fluorescence des NPs $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ en milieu biologique a été conduite de manière progressive afin d'ajuster les protocoles expérimentaux et de réduire l'utilisation d'animaux. Nous avons donc dans un premier temps réalisé des « phantoms » de gélatine comme décrits par Pleijhuis et collaborateurs¹⁵³ comprenant les composants biologiques les plus absorbants dans le proche infrarouge : eau, hémoglobine et lipides (voir Figure II.3). Ceci nous a permis de valider le système d'acquisition ainsi que les performances

des NPs. Nous avons été en mesure de détecter le signal émis par des quantités de NPs allant de 2 à 50 μg au travers de 7 mm du milieu très opaque constitué par les « phantoms » (Figure III.10).

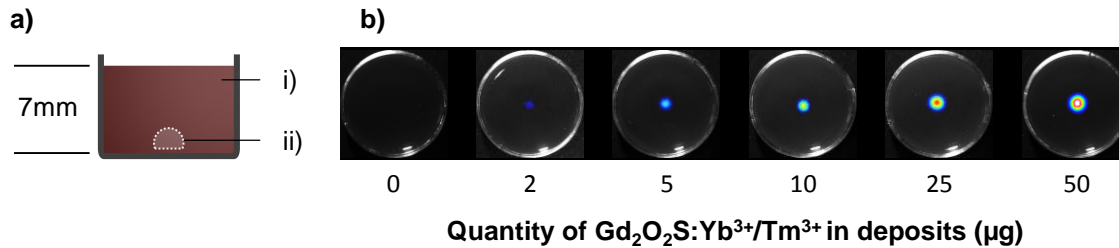


Figure III.10. Détection de fluorescence des $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ inclus en « phantoms » de gélatine. a) Schéma de la préparation des « phantoms » i) phantom composé de gélatine, d'hémoglobine et de lipides ii) dépôt de NPs gélifiées dans l'agarose (20 μL). b) Vue de dessus des « phantoms » lors de l'émission.

Nous n'avons pas effectué de tests comparatifs de sensibilités rigoureux entre l'IRM, la TDM et notre imageur proche infrarouge, essentiellement parce que cet imageur évolue constamment pour en accroître ses performances. Notons cependant qu'en IRM et TDM la limite de sensibilité (mesurée en « phantoms » de 1ml environ, voir III.C.1) est de l'ordre de quelques centaines de μg de NPs alors qu'avec cet imageur nous détectons des quantités de quelques μg montrant la très nette supériorité de ce dernier système en matière de sensibilité.

Ces résultats préliminaires ont été acquis avec du matériel peu onéreux (caméra CCD Atik 314L+ et laser MDL-III-980 2W) mais leur contenu prometteur nous a encouragé à réaliser l'acquisition de matériel plus performant (caméra CCD Andor iKon- M 934 et laser MDL-N-980/6000 8W) afin d'améliorer le système d'imagerie et de poursuivre les expériences chez l'animal.

Les premières expériences sur animal ont eu pour objectif de déterminer les limites de détection des NPs. Pour cela, différentes injections ont été réalisées en conditions défavorables à la transmission du signal. Ainsi, les NPs en suspensions ont été injectées dans des organes très opaques (le rein et le foie) et sous un relief osseux (la boîte crânienne). Comme présenté en Figure III.11, nous avons été en mesure de détecter aisément les NPs dans ces trois conditions, mettant en avant la bonne diffusion du signal de fluorescence et la faisabilité de l'imagerie *in vivo*.

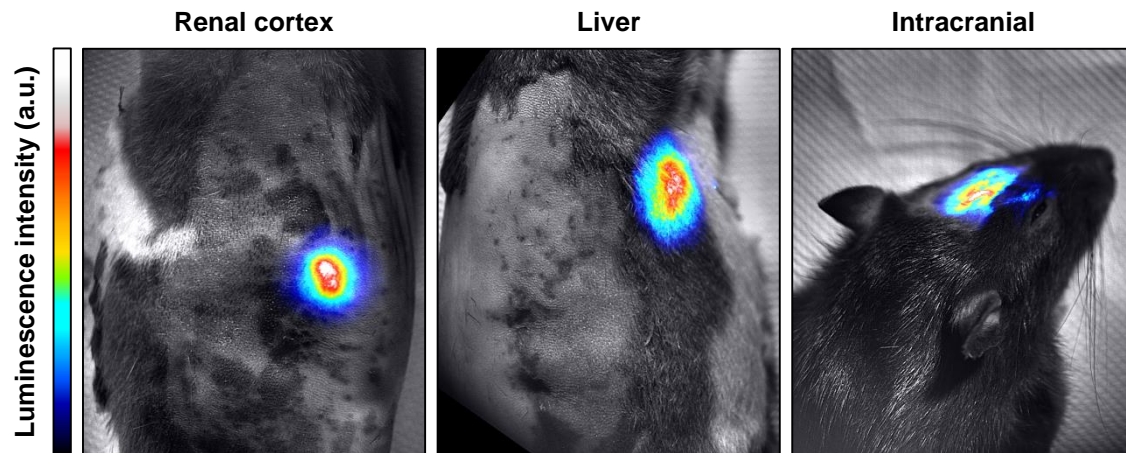


Figure III.11. Détection des $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$ *in vivo*. 20 μL de NPs à 2 mg/mL (Soit 10,6 mM de Gd et 40 μg de NPs totales) ont été injectés chez le rat euthanasié dans le cortex rénal, le lobe latéral droit du foie et la cavité crânienne par voie rétro-orbitale.

Le volume (20 μL) et la concentration (2 mg/mL) ont été fixés en fonction de l'objectif final de ces travaux : le suivi *in vivo* des MSCs marquées. En effet, les essais antérieurs de thérapie cellulaire effectués au sein de l'équipe ont été conduits par injection d'un million de cellules dans 30 μL au sein du parenchyme rénal¹⁵⁴. Ici, nous avons ajusté ce volume afin de concentrer le signal et injecté une dose totale de 40 μg de NPs correspondant grossièrement à 80 000 cellules marquées (voir V.B.2) et 2,5 fois la dose minimale détectable par IRM et TDM (voir Figure III.4). Ainsi, la visualisation de cette quantité de NPs nous donne bon espoir de réaliser le suivi de 1.10^6 MSCs marquées, correspondant à plus de dix fois ce que nous sommes en mesure d'observer.

2. Développement de la méthode d'injection dans un organe solide

Une fois le système d'imagerie et les performances des NPs validés, la suite des expériences a été axée sur la mise au point d'un protocole d'injection permettant le suivi à long terme des nanoparticules dans un organe solide au sein de l'organisme. L'objectif final de cette mise au point était de pouvoir suivre les MSCs marquées aux NPs par fluorescence à up-conversion.

Les résultats précédents de l'équipe ont permis d'acquérir une certaine expérience sur l'injection de MSCs dans le parenchyme rénal pour la thérapie cellulaire^{154,155}. De ce fait, nous avons poursuivi notre étude sur ce site d'injection. Nos nombreux essais préliminaires nous ont permis de mettre en évidence un certain nombre de contraintes :

Développement d'outils pour l'imagerie biologique

- Tout d'abord, les rongeurs utilisés classiquement en laboratoire présentent une couverture pileuse interférant avec l'utilisation de laser comme source d'excitation. En effet, le faisceau peut-être réfléchi par les poils induisant une perte d'efficacité d'excitation et/ou diffusé le long du pelage induisant des dommages tissulaires au niveau du bulbe (Figure III.12a). De ce fait, tous les animaux utilisés ont été systématiquement rasés avant chaque acquisition. Malgré ces précautions, il persiste un risque de lésions relatif à l'utilisation d'une source laser puissante et concentrée ainsi qu'à l'absorption locale de l'énergie proche infrarouge par l'eau des tissus irradiés. Nous avons donc travaillé avec précautions pour déterminer une puissance laser d'exposition permettant d'obtenir un bon signal sans risquer d'induire des lésions tissulaires : 110 mW et 30 mW de puissance en surface de la peau et en surface des organes (mesuré à l'aide d'un puissance-mètre).
- D'autre part, nous avons débuté les essais d'injection des NPs en introduisant la canule de façon perpendiculaire à la surface du rein. Or, ce type d'injection a conduit irrémédiablement à l'effusion des NPs induisant une dilution du signal et une potentielle propagation dans la cavité péritonéale. Pour remédier à cela, nous avons opté pour une insertion plus profonde de la canule le long de la grande courbure du rein pour une injection plus maîtrisée conduisant à une diffusion des NPs dans le parenchyme sans effusion (Figure III.12b).
- Enfin, nous avons rencontré des contraintes relatives à la méthode chirurgicale d'exposition du rein avant injection. En effet, lors de nos premiers essais, nous avons réalisé une laparotomie directement sur le flanc en surplomb du rein injecté. L'inflammation tissulaire induite et le tissu cicatriciel formé à proximité directe de la cible ont entravés les tentatives de localisation. La vasodilatation et le gonflement de la zone ont conduit à une diminution de la transmission de lumière infrarouge¹⁵⁶. De ce fait, nous avons adapté le protocole en réalisant une laparotomie médiane xiphopubienne permettant d'accéder au rein à partir de l'abdomen et d'éviter l'inflammation à proximité de l'organe (Figure III.12c).

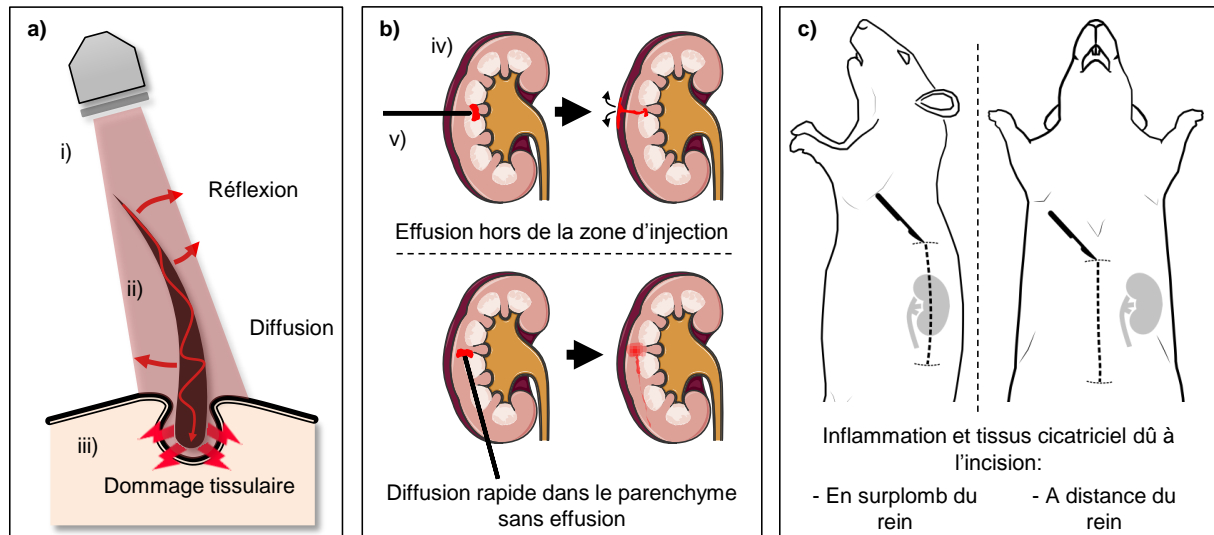


Figure III.12. Contraintes rencontrées lors de la mise au point du protocole. a) Perte d'efficacité du laser et risque de lésions tissulaires dues à la présence de poils. b) effusion en fonction de l'angle d'injection. c) Méthodes chirurgicales pour l'accès au rein. i) faisceau laser. ii) poil. iii) épiderme. iv) coupe sagittale du rein. v) canule d'injection.

En tenant compte de ces contraintes, nous avons mis au point un protocole précis d'injection nous permettant de réaliser le suivi à long terme des NPs $Gd_2O_2S : Yb^{3+}/Tm^{3+}$ dans le parenchyme rénal. L'animal est tout d'abord anesthésié à l'isoflurane dans une boîte d'induction puis transféré sur la table d'opération où l'anesthésie est maintenue au masque. La température corporelle est maintenue par un système connecté de tapis chauffant et thermomètre (Figure III.13a). Après rasage de la zone d'incision et d'acquisition (abdomen et flanc), le champ opératoire est mis en place pour éviter les risques d'infection par la zone uro-génitale (Figure III.13b). La laparotomie médiane est ensuite réalisée à proximité de la xiphoïde à hauteur du rein. L'organe est maintenu en place à l'aide de compresses humidifiées et l'abdomen est retenu par des écarteurs (Figure III.13c). Le système d'injection est constitué d'une seringue à insuline contenant les NPs et d'un cathéter reliant la seringue à une canule. Ce système permet une meilleure flexibilité et une meilleure maîtrise de l'injection. La canule est insérée au niveau du pôle inférieur, le long de la grande courbure pour atteindre le pôle supérieur du rein où 20 à 30 μL de solution de NPs sont injectés (Figure III.13d,e,f). La canule est ensuite maintenue en place quelques instants pour que le liquide diffuse dans le parenchyme avant retrait et suture de l'abdomen. Pour finir, l'animal est transféré dans l'imageur pour acquisition.

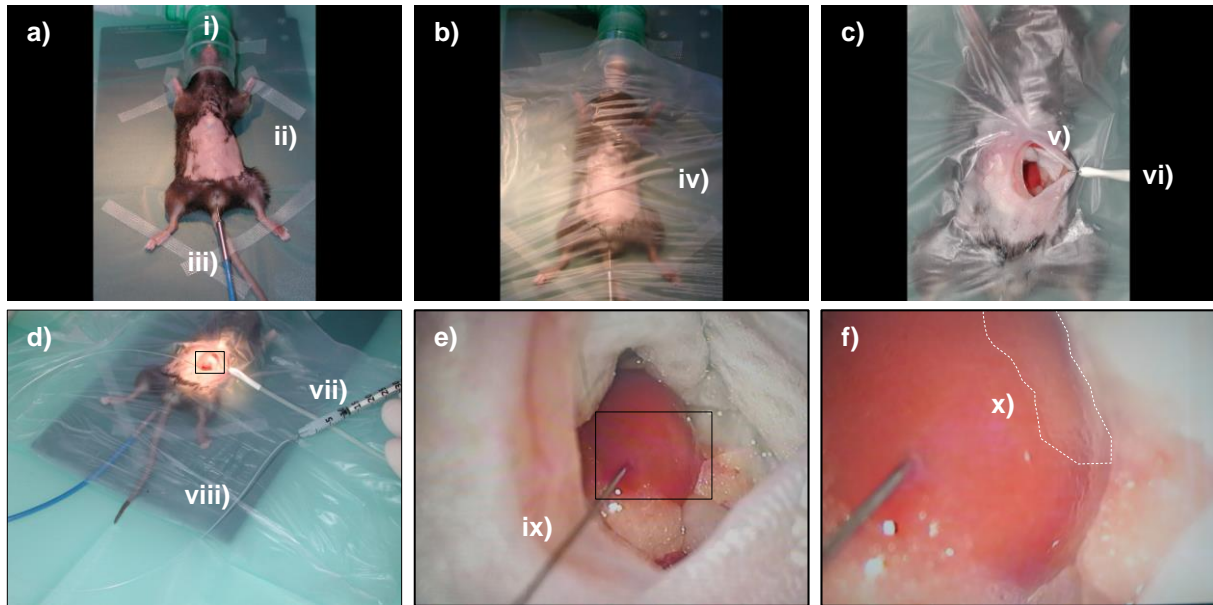


Figure III.13. Mise au point du protocole expérimental d'injection des $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ dans le cortex rénal. a) animal anesthésié. b) mise en place du champ opératoire avant laparotomie. c) préparation du rein avant injection. d) injection des nanoparticules. e) et f) plans rapprochés du rein après injection des NPs. i) système d'anesthésie gazeuse. ii) tapis chauffant. iii) thermomètre. iv) champ opératoire. v) compresse humidifiée maintenant le rein. vi) écarteur. vii) seringue à insuline contenant les NPs. viii) catheter. ix) Canule 32 G. x) zone d'injection dans le cortex rénal.

En utilisant le protocole défini ci-dessus, nous avons réalisé le suivi de l'évolution du signal des NPs injectées dans le parenchyme rénal. Comme démontré en Figure III.14, nous avons été en mesure de détecter ce signal directement après injection et pendant huit semaines en surface de la peau. Après treize semaines, le signal était devenu trop faible pour traverser l'épiderme. Cette diminution peut-être dû à plusieurs facteurs : dilution des NPs au sein de l'organe, dégradation au cours du temps, captation par le foie et la rate)... Nous avons donc réalisé une laparotomie et avons à nouveau détecté les NPs en surface du rein. De ce fait, nous avons validé la détection à long terme des $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$.

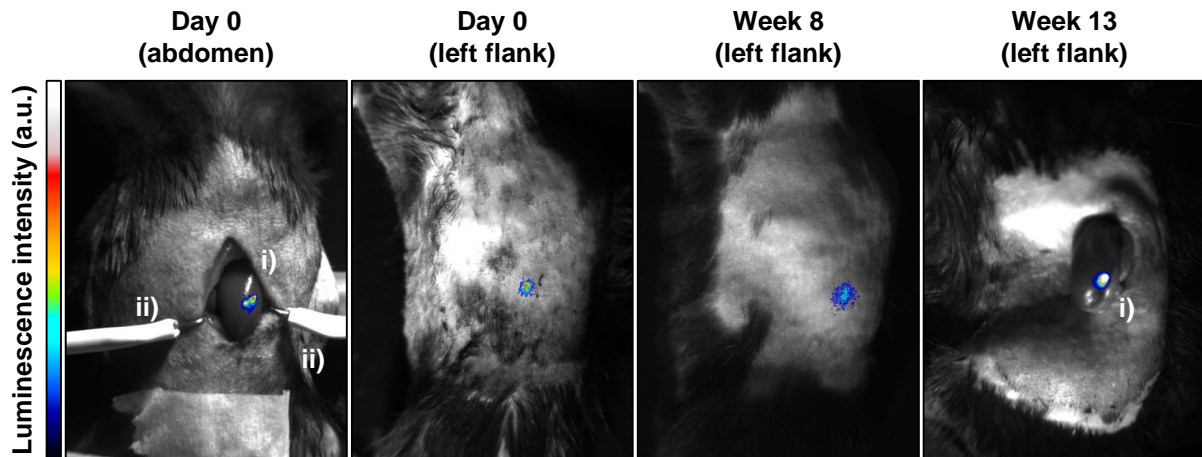


Figure III.14. Suivi au cours du temps des $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ *in vivo*. 20 μL de solution de NPs à 2 mg/mL (10,6 mM Gd) ont été injectés dans le parenchyme rénal de rat vivant. i) rein gauche injecté. ii) écarteurs.

Pour finir la mise au point, nous avons fait un essai ponctuel de détection de MSCs marquées comme suit : les NPs $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ ont été dispersées par ultrasons dans du milieu de culture puis les cellules adhérentes en culture ont été traitées pendant 24h à 125 $\mu g/mL$ avec cette suspension. Après rinçage et décollement à la trypsine, les cellules marquées ont été comptées puis suspendues dans du PBS avant injection chez le rat euthanasié.

Nous avons été en mesure de détecter jusqu'à 10 000 cellules injectées dans le parenchyme rénal et 1 000 cellules en sous-cutané (Figure III.15), validant ainsi la faisabilité de détection des MSCs par imagerie à up-conversion dans un contexte de thérapie cellulaire où classiquement 1 à 2 millions de cellules sont injectés suivant le protocole mis au point dans l'équipe^{154,155}.

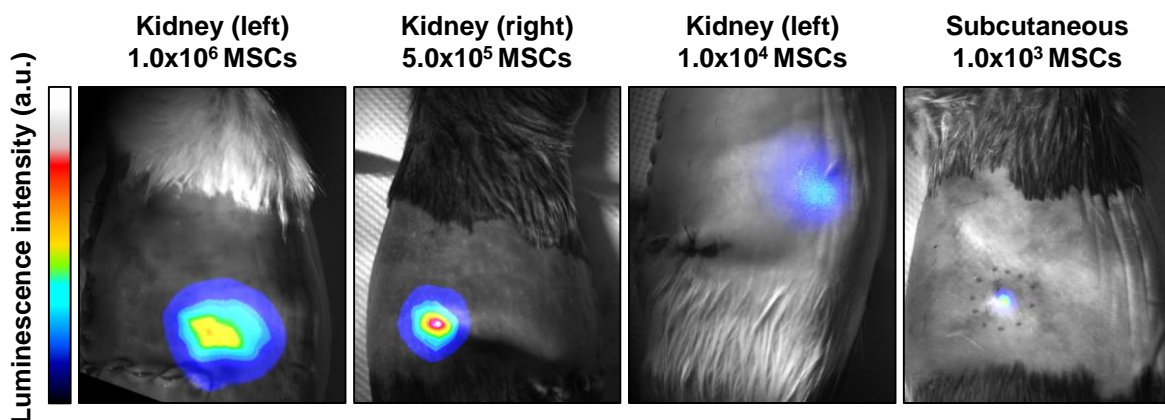


Figure III.15. Détection ponctuelle des MSCs marquées aux $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ *in vivo*.

En comparaison, Wang et collaborateurs¹³⁰ ont été en mesure de détecter jusqu'à 10 MSCs marquées avec d'autres NPs à up-conversion ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$) après injection sous-cutanée chez la souris nude (mutation génétique causant l'absence de poils). Cette détection a été réalisée à l'aide d'un imageur commercial (Maestro) équipé d'un laser 980 nm. La configuration actuelle de notre système d'imagerie ne nous permet pas d'atteindre une telle sensibilité mais nous nous sommes malgré tout placés en conditions plus défavorable à la diffusion du signal car la peau des souris nude est bien plus fine que celle des rats.

E. Conclusion

Au cours de cette première étude, nous avons donc démontré les propriétés des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium en tant qu'agent de contraste multimodal. Nous avons également caractérisé un nouveau couple de dopants au sein de cette matrice : l'ytterbium et le thulium. Sans modifier les propriétés physico-chimiques de base des nanoparticules, ce dopant apporte cependant un atout majeur dans l'imagerie de fluorescence grâce au mécanisme d'up-conversion. En effet, celui-ci est particulièrement adapté à l'imagerie *in vivo* car il permet une excitation et une émission dans le proche infrarouge. Afin de tirer profit de ces bénéfices, nous avons développé un système d'imagerie personnalisé dédié à la localisation de ces nouvelles NPs chez l'animal de laboratoire. Ceci nous a permis de mettre au point un protocole précis et adapté à l'injection et à la localisation de ces NPs dans le parenchyme rénal et de tester la faisabilité de l'objectif final de ces travaux : le suivi multimodal de cellules mésenchymateuses. Nous avons donc été en mesure de suivre par fluorescence les NPs jusqu'à huit semaines et les MSCs marquées ponctuellement après injection dans le parenchyme rénal.

IV. Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

A. Introduction

Au cours de cette seconde étude, nous avons souhaité mettre en pratique les propriétés d'agents de contraste des NPs d'oxysulfure de gadolinium pour une application en imagerie biomédicale. Nous avons donc suivi la biodistribution des deux formulations de NPs après injection intraveineuse chez différentes espèces de rongeurs à l'aide de techniques d'imagerie complémentaires (IRM et fluorescence proche infrarouge). Dans l'optique d'une utilisation à large échelle dans le domaine préclinique et clinique, nous avons également inclus l'étude du métabolisme et des potentiels effets secondaires des NPs.

Comme introduit plus haut (II.A), l'injection de NPs dans la circulation générale nécessite bien souvent la modification de leur surface afin d'augmenter la demi-vie plasmatique et d'assurer une bonne stabilité colloïdale empêchant l'embolisation. Afin de mener à bien l'étude de la biodistribution des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ (\varnothing 150 nm) et de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ (\varnothing 143 nm), nous avons préparé des solutions injectables avec un revêtement de polyéthylène glycol (PEG) (rapport $[\text{Gd}]/[\text{PEG}] = 5$). La suspension a ensuite été diluée dans une solution concentrée en glucose pour obtenir une solution iso-osmotique à 5% de glucose final.

B. Oxysulfures de gadolinium dopés europium ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$)

1. Suivi de la biodistribution par imagerie par résonance magnétique

Afin d'étudier la relaxivité (efficacité du signal IRM) de la solution de $\text{PEG-Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ avant utilisation chez l'animal, des « phantoms » ont été préparés par dispersion de la solution dans de la gélatine. Le but étant de mimer un milieu aqueux semi-solide et également de stabiliser la solution pendant la mesure pour éviter qu'elle ne sédimente. Un fort signal T_2 ($r_2 = 123 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et un plus faible effet T_1 ($r_1 = 0,35 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ont ainsi été mesurés pour un champ magnétique de 4,7 T. Les NPs sont donc majoritairement des agents de contraste IRM négatifs. En comparaison, les agents de contraste négatifs commerciaux (oxydes de fers

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

superparamagnétiques) présentent une relaxivité transverse (r_2) de 151 (Ferucarbotran), 98,3 (Ferumoxides) et 60 (Ferumoxtran) $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ ¹⁵⁷. Ceci met en avant la faisabilité de la détection *in vivo* des NPs. Leur biodistribution a donc été suivie par imagerie pondérée T_2 : leur présence au sein des tissus se manifeste alors par un obscurcissement du signal (hypointensité).

La solution de NPs PEGylées (3,3 mg/mL soit 21mM de Gd) a par la suite été injectée dans la veine caudale de souris C57BL/6J à raison de 4 mL/Kg (soit 13,2 mg de NPs/kg de poids corporel) et l'évolution de la biodistribution a été suivie à l'aide d'un appareil IRM 4,7 T. Quelques instants après leur injection, les NPs étaient distribuées dans la circulation induisant un pic de signal mesuré au niveau des carotides suivi d'une lente décroissance jusqu'à atteindre un plateau après 40 min (Figure IV.1a). En comparaison, les oxydes de fer superparamagnétiques, la référence des agents de contraste sous forme de NPs en IRM, présentent un temps de demi-vie plasmatique pouvant aller de quelques minutes¹⁵⁸ à plusieurs heures¹⁵⁹ selon leur taille et revêtement de surface.

En parallèle, la quantification du ratio signal/bruit au niveau du foie montre une diminution significative de ce dernier dès 6 minutes dû à la présence des NPs qui obscurcissent (ce sont des agents de contraste négatifs) et donc diminuent le signal (Figure IV.1b,c). L'hypointensité (IRM T_2) s'accroît par la suite pour atteindre son minimum à 50 min (un signal similaire a été mesuré au niveau de la rate). La variation de signal persistant jusqu'à 14 jours après injection, nous présumons que les NPs se retrouvent emprisonnées au sein du système réticuloendothélial (foie et rate). Ce profil corrèle avec la pharmacocinétique des NPs habituellement décrite dans la littérature¹⁶⁰. Nous pouvons également observer une variation de signal à proximité des vaisseaux rénaux (Figure IV.1b,c), cependant, le signal au niveau de la vessie restant stable, cela est plus probablement attribuable à un encombrement transitoire qu'à une clairance rénale directe des nanoparticules, d'autant que leur diamètre est largement supérieur à la limite de 5-8 nm décrite dans la littérature¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Les muscles ont été choisis comme contrôle négatif car ils ne présentent aucune variation de signal au cours du temps. Après 3 mois, le signal n'était plus détectable dans aucun des organes cibles. En conséquence, l'administration de PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺ a entraîné l'apparition d'une variation de signal durable associée à une lente clairance hépatique permettant le suivi à long terme dans les études futures.

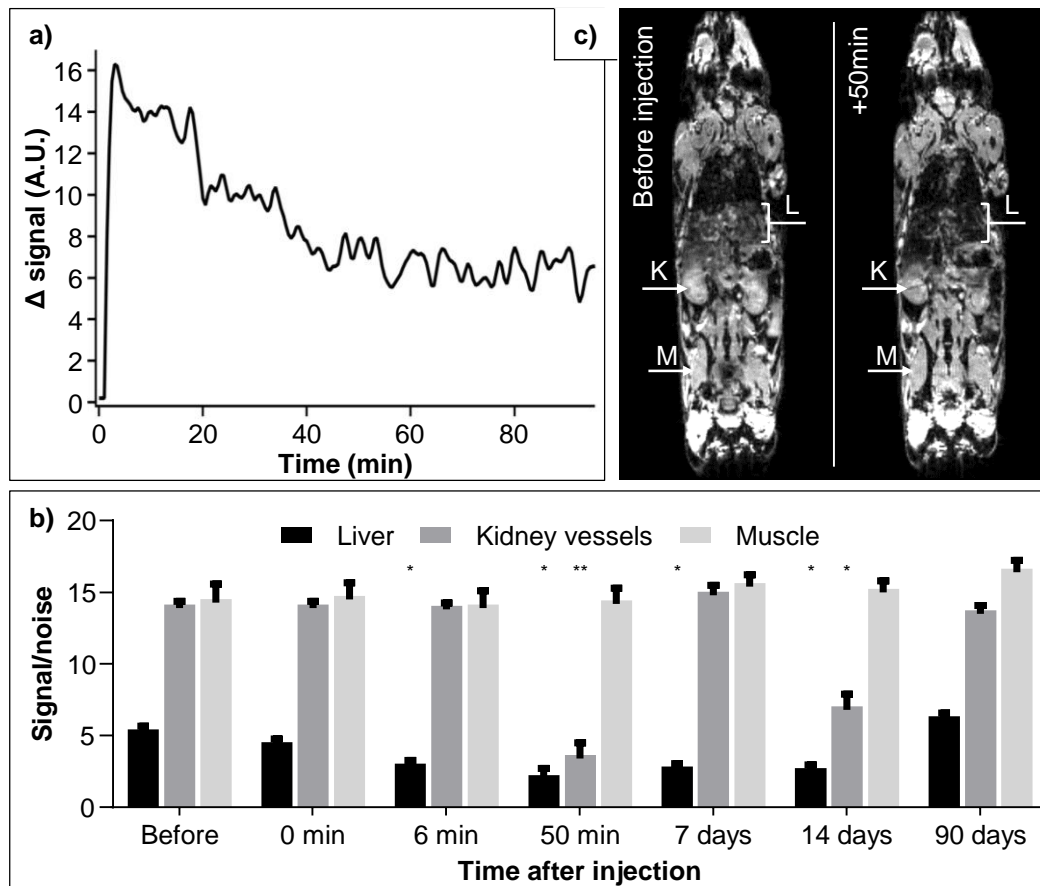


Figure IV.1. Distribution des PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺ chez la souris C57BL/6J suivi par IRM pondéré T2. a) Monitoring de la demi-vie plasmatique des NPs circulantes au niveau de la carotide. b) Quantification du ratio signal/bruit (la présence de NPs se traduit par une hypo-intensité soit une diminution du signal) (*p≤0.05, **p≤0.01). c) Images acquises avant et 50 min après injection. Les points de flèches désignent les organes cibles : foie (L), vaisseaux rénaux (K) et muscle (M).

2. Métabolisme et effets secondaires

Afin de percevoir d'éventuelles atteintes tissulaires associées à l'exposition aux PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺, 3 souris ont été injectées avec la solution et sacrifiées après 15 jours. L'examen minutieux de coupes histologiques n'a révélé aucune lésion tissulaire (nécrose, œdème, fibrose, inflammation ou infiltration de cellules lymphatiques) dans le foie, la rate, le cœur, les reins, les poumons ou le cerveau (Figure IV.2). Au cours de ces deux études, aucuns signes de douleurs ou de perte de poids n'ont été observés.

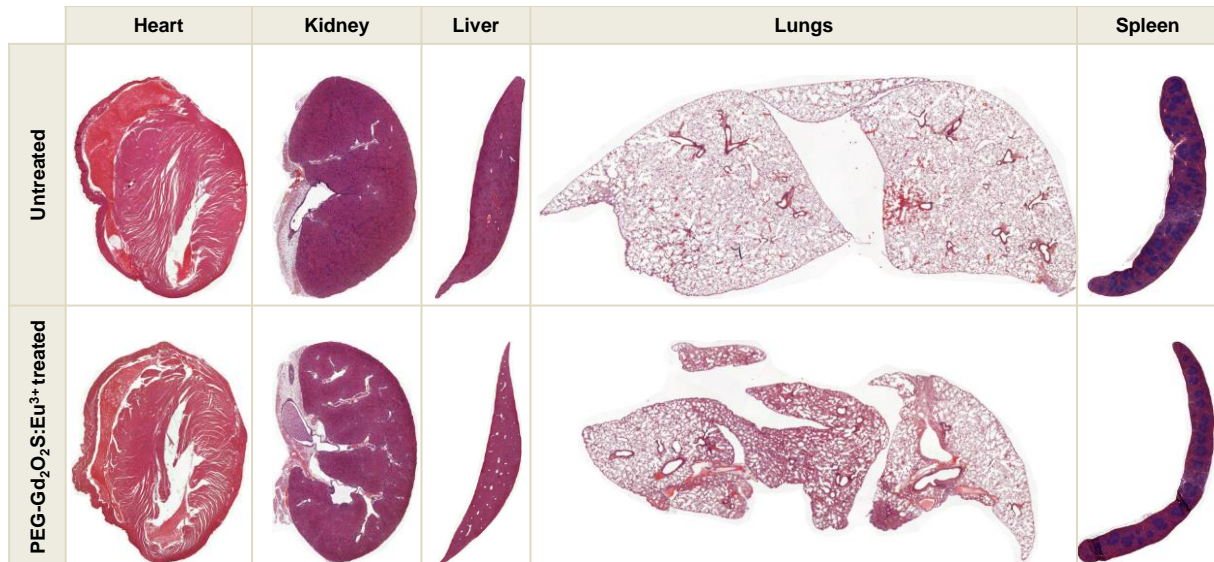


Figure IV.2. Coupes histologiques des principaux organes collectés 15 jours après injection de PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺.

Afin de compléter cette analyse, quatre lapins ont été injectés dans les mêmes conditions que précédemment décrites (13,2 mg/kg) avec des NPs PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺ et monitorés pendant un mois. Les lapins étant plus fragiles que les souris, ils étaient mieux adaptés à cette évaluation. De plus, les animaux devaient être suffisamment volumineux pour supporter des prises de sang régulières. L'injection n'a induit aucun effet secondaire sur le poids corporel (Figure IV.3a) ou l'état clinique (aspect général ; condition physique ; fonctions digestives, neuro-musculo-squelettique et respiratoire). Un taux basal de Gd a été retrouvé dans le sang et les fèces avant l'injection due à sa présence dans la nourriture (35 ng/g). Immédiatement après l'injection, un pic de concentration en Gd (15,2 mg/L) a été mesuré dans la circulation sanguine (Figure IV.3b) avant de décroître lentement pour atteindre un plateau ($\approx 10 \mu\text{g/L}$) après 6 jours. En parallèle, du Gd a également été détecté dans les urines et les fèces (Figure IV.3c) en concentrations variables (variant respectivement de 10 à 200 $\mu\text{g/L}$ et de 65 à 200 ng/g).

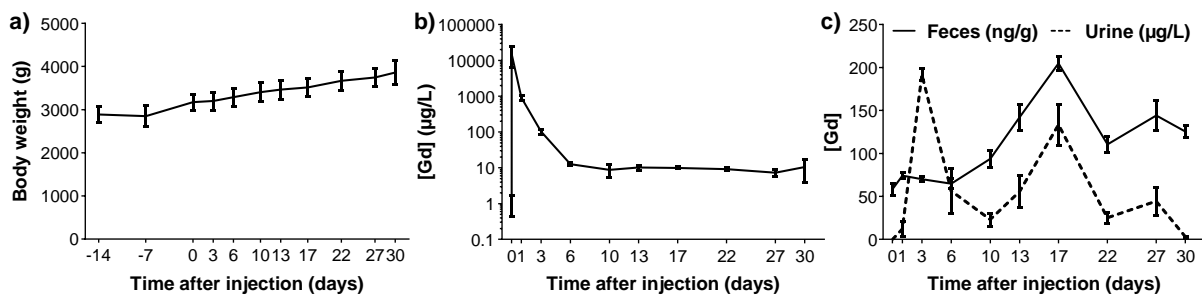


Figure IV.3. Effet des Nanoparticules PEG-Gd₂O₂S:Eu³⁺ chez le lapin Crl:KBL(NZW). a) Poids corporel. Distribution et excretion : concentration en gadolinium dans b) sang et c) fèces et urines.

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

En accord avec les données obtenues en IRM, il est très probable que le devenir des NPs dans l'organisme soit attribuable à une combinaison de processus. Elles circulent tout d'abord dans la circulation sanguine puis :

- Elles sont capturées par le foie (et la rate) et dégradées par le système hépatobiliaire, ce qui conduit à l'excrétion par les fèces (mécanisme principal).
- Du Gd ionique est libéré dans la circulation après dégradation hépatobiliaire et/ou relargage direct par les NPs lors de leur circulation ce qui conduit à l'excrétion indirecte par les urines (mécanisme minoritaire).

Il est important de prendre en compte que le gadolinium résiduel, probablement essentiellement ionique ($[Gd] \approx 10 \mu\text{g/L} : 0,064 \mu\text{M}$), toujours détectable dans le compartiment sanguin 6 jours après injection reste 200 fois moins important que la dose létale médiane (LD50) de 13 à 15 μM d'après Cacheris et al¹⁶⁵. Qui plus est, les rongeurs sont cæcotrophes (ingestion des fèces molles pour l'assimilation complète de certaines vitamines), ce qui peut modifier la concentration sanguine en Gd par réabsorption intestinale.

A partir de cette étude de l'interaction avec l'organisme, nous pouvons conclure que les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ induisent une variation de signal IRM à long terme au niveau du foie et de la rate, associée à une lente excrétion majoritairement hépatobiliaire. De plus, aucune toxicité n'a pu être mise en évidence. La durabilité du signal des NPs est due à leur grande stabilité biochimique en milieu biologique (faible solubilité). En effet, on observe un très faible relargage de Gd ionique à partir des NPs en milieu aqueux au cours du temps (Figure IV.4). Ce relargage est encore plus faible dans le plasma, ce qui pourrait être dû à une combinaison de facteurs : d'une part, le pH y est plus haut que dans l'eau pure (8 au lieu de 7). D'autre part, l'interaction avec les protéines circulantes modifie probablement la cinétique au travers de la formation d'une corona. Enfin, ce milieu contient très probablement des anions, comme les phosphates, formant une couche protectrice à la surface des NPs (les phosphates de terres rares étant connus comme étant parmi les minéraux les plus insolubles¹⁶⁶).

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

Ainsi, après 14 jours d'incubation en présence de plasma humain, 27 μM de Gd ionique ont été relargués dans le surnageant, ce qui correspond à une dissolution de 0,05 % de la masse totale des NPs.

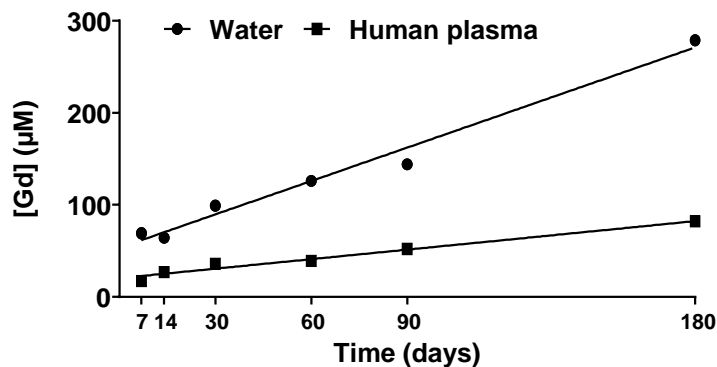


Figure IV.4. Stabilité des nanoparticules en milieu biologique. Relargage du Gd ionique dosé dans le surnageant de nanoparticules incubées à 37°C.

En comparaison, Frenzel et collaborateurs¹⁶⁷ ont montré qu'en conditions similaires après 15 jours, les agents de contraste IRM à base de chélates de gadolinium linéaires présentaient les pourcentages de déchelation du Gd^{3+} suivants : Optimark® 21% ; Omniscan® 20% ; Magnevist® et Multihance® 1,9% ; Vasovist® 1,8% et Primovist® 1,1%. Les agents de contraste macrocycliques quant à eux ne présentaient pas de déchelation détectable.

C. Oxysulfures de gadolinium dopés ytterbium thulium ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$)

1. Suivi de la biodistribution par imagerie proche infrarouge

Nous avons précédemment mis en avant l'innocuité des NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ et la faisabilité de leur détection *in vivo* par IRM. Nous avons également développé un nouveau système complet comprenant à la fois une nouvelle formulation des NPs ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) permettant la fluorescence à up-conversion, un imageur dédié et une méthode complète d'expérimentation. Dans la suite de cette étude, nous avons combiné ces données acquises afin de réaliser le suivi en temps réel de la biodistribution de ces nouvelles NPs par fluorescence proche infrarouge.

La méthode de détection utilisée ici (fluorescence par up-conversion) étant plus sensible que l'IRM, nous avons utilisé une solution de NPs PEGylées quatre fois moins concentrée en NPs (0,862 mg/mL) et isotonique à 5% de glucose. 12 rats Lewis femelles ont été séparés en deux

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

groupes distincts traités avec la solution PEGylée (3,448 mg/kg) ou avec le tampon correspondant (5% glucose). Un grand nombre de paramètres ont été suivis au cours des cinq mois de l'étude afin de déterminer la bonne santé des animaux (poids et signes de douleurs) ainsi que le métabolisme (collecte d'échantillons biologiques) et la distribution (acquisition du signal de fluorescence) des NPs. Les animaux ont été sacrifiés en fin d'étude après cinq mois et les organes collectés afin d'étudier les éventuelles atteintes tissulaires. La présence de Gd a été dosée dans tous les échantillons biologiques par spectrométrie de masse à couplage induit (ICP-MS). Le déroulement du protocole est synthétisé en Figure IV.5.

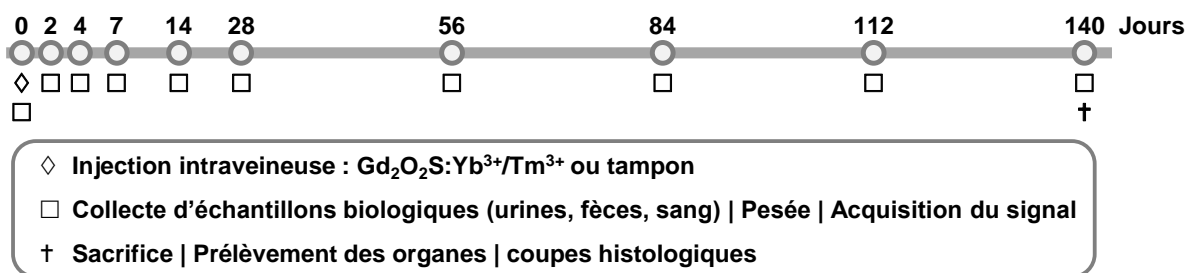


Figure IV.5. Chronologie du protocole d'étude du métabolisme des PEG-Gd₂O₂S :Yb³⁺/Tm³⁺.

a) Injection intraveineuse

Afin de contrôler au mieux l'injection intraveineuse, nous avons mis au point une installation nous permettant de maîtriser le débit d'administration tout en réalisant l'acquisition de fluorescence simultanée. Pour cela, la veine jugulaire externe des animaux anesthésiés a été exposée avant d'y introduire l'aiguille reliée au cathéter conduisant la solution à partir d'un pousse-seringue (Figure IV.6). Le débit a été fixé à 5 mL/h afin d'éviter toute embolisation. La dose utilisée étant de 4 mL/Kg, la durée totale d'injection par animal est donc située entre 7 et 8 minutes en fonction du poids.

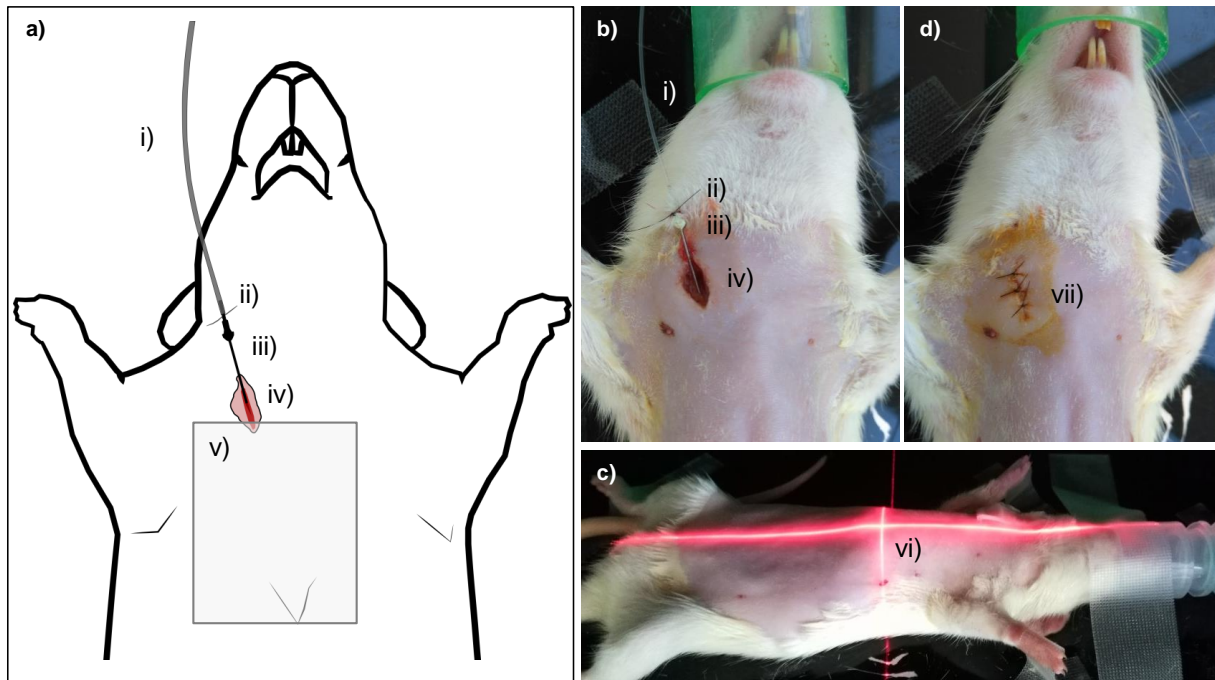


Figure IV.6. Injection intraveineuse de NPs PEG-Gd₂O₂S:Yb³⁺/Tm³⁺ chez le rat Lewis femelle anesthésié. a) Schéma de l'installation. b) image réelle correspondante. c) placement de l'animal dans l'imageur avant acquisition. d) animal après injection. i) Cathéter relié au pousse-seringue. ii) suture permettant le maintien de l'aiguille au cours de l'injection. iii) aiguille. iv) veine jugulaire externe. v) zone d'acquisition du signal de fluorescence au cours de l'injection. vi) ciblage de la zone d'acquisition. vii) suture.

Au cours des injections, une série d'acquisitions de fluorescence a été réalisée (1/min, 15 acquisitions au total). La quantification du ratio signal/bruit nous permet de vérifier que les NPs se répartissent sans problème dans le compartiment sanguin. Le signal augmente ainsi progressivement tout au long de l'injection et diminue rapidement une fois l'administration terminée pour disparaître de la zone thoracique après 11 minutes (Figure IV.7). Ceci met en avant une bonne répartition des NPs dans l'organisme et/ou une captation rapide par le foie et la rate. La diminution de la concentration circulante conduit ainsi à la disparition du signal détectable au niveau du thorax. Le signal mesuré chez les animaux contrôles quant à lui ne varie pas au cours de l'injection, mettant en avant la spécificité du signal détecté.

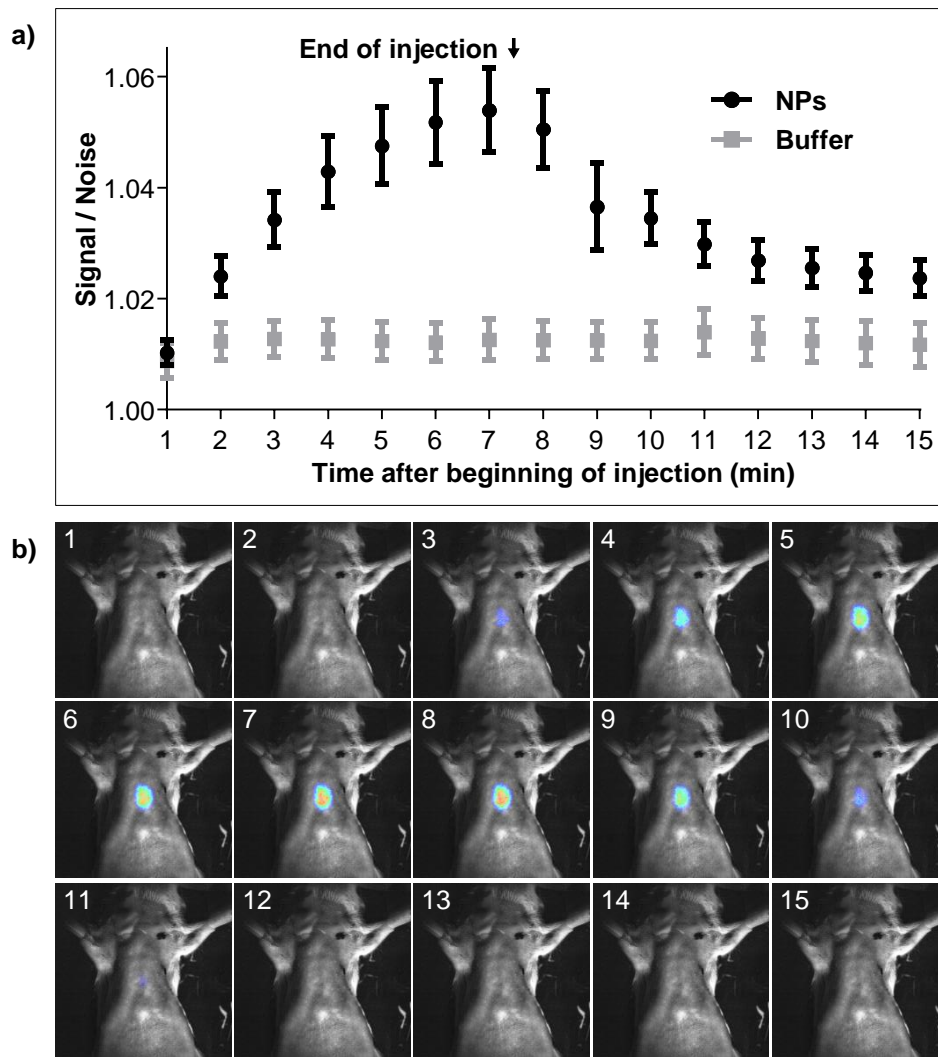


Figure IV.7. Distribution des PEG- $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ au cours de l'injection intraveineuse. a) quantification du ratio signal/bruit. b) images correspondantes acquises (superposition de lumière blanche et fluorescence) de 1 à 15 minutes.

b) Suivi de la distribution corporelle des NPs

Contrairement à l'IRM ou la TDM, notre système d'imagerie personnalisé ne permet pas une acquisition du corps entier, ce qui nécessite l'acquisition de plusieurs images. Cependant, la sensibilité très supérieure de cette technique permet de quantifier des signaux beaucoup plus faibles. La répartition du signal dans l'organisme a donc été suivie méthodiquement par acquisition à différentes localisations anatomiques, rendant compte de la répartition dans les organes clés généralement impliqués dans le métabolisme des NPs (thorax, foie, rate, abdomen, vessie) (voir IV.B). Les différentes zones d'acquisition du signal sont présentées en Figure IV.8.

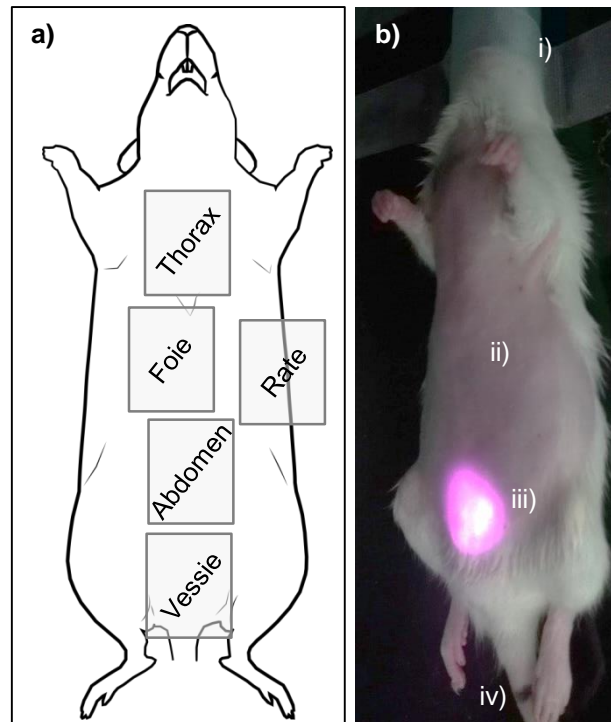


Figure IV.8. Zones d'acquisition du signal au cours du temps. a) zones permettant de visualiser un ou plusieurs organes (thorax : cœur et poumon ; foie : différents lobes du foie ; rate ; abdomen : intestins ; vessie : zone uro-génitale). b) Animal anesthésié lors d'une acquisition au niveau de la vessie : i) masque d'anesthésie gazeuse ii) zone d'acquisition rasée iii) faisceau laser visible grâce à une caméra sensible aux ultraviolets iv) identification individuelle : coloration de la base de la queue afin de différencier les animaux d'une même cage.

Ainsi, de la même façon que précédemment, la quantification du rapport signal/bruit prend compte de la répartition des NPs au cours du temps. Le signal de fluorescence augmente progressivement au niveau du foie jusqu'à atteindre son maximum 14 jours après injection. Par la suite, le signal diminue lentement jusqu'à disparition quasi complète après 5 mois (Figure IV.9a). Un profil similaire a été mesuré au niveau de la rate, ce qui corrèle parfaitement avec notre première étude de distribution des NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ (IV.B). En revanche, lors de cette première étude, le signal mesuré par IRM semblait disparaître après 3 mois, alors que nous sommes toujours en mesure de le détecter ici après 5 mois. Ceci est la manifestation concrète de la supériorité de la méthode de fluorescence en terme de sensibilité.

Lors de cette étude, nous avons également mis en évidence l'apparition de signal au niveau du thorax (Figure IV.9b) à partir de 14 jours et jusqu'à 4 mois après injection. Celui-ci étant relativement faible, cela pourrait expliquer son absence de détection par IRM. Néanmoins, ceci met en avant un nouvel organe cible du métabolisme des NPs, non détecté par IRM : les

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

poumons. Au même titre que le foie et la rate, cet organe agit comme un filtre et est très fortement irrigué. C'est également une barrière naturelle contre les agressions extérieures et il est donc riche en macrophages résidents probablement à l'origine de la captation et de la dégradation des NPs¹⁶⁸.

Enfin, comme présenté en Figure IV.9 c et d, le signal au niveau de l'abdomen et de la vessie ne semble pas varier significativement. De plus, des tentatives d'acquisition de signal à partir de fèces se sont révélées négatives. Cela semble indiquer que les NPs ne sont pas excrétées par les urines ou les fèces, tout du moins sous leur structure ou composition permettant la production d'un signal de fluorescence détectable dans les conditions présentes.

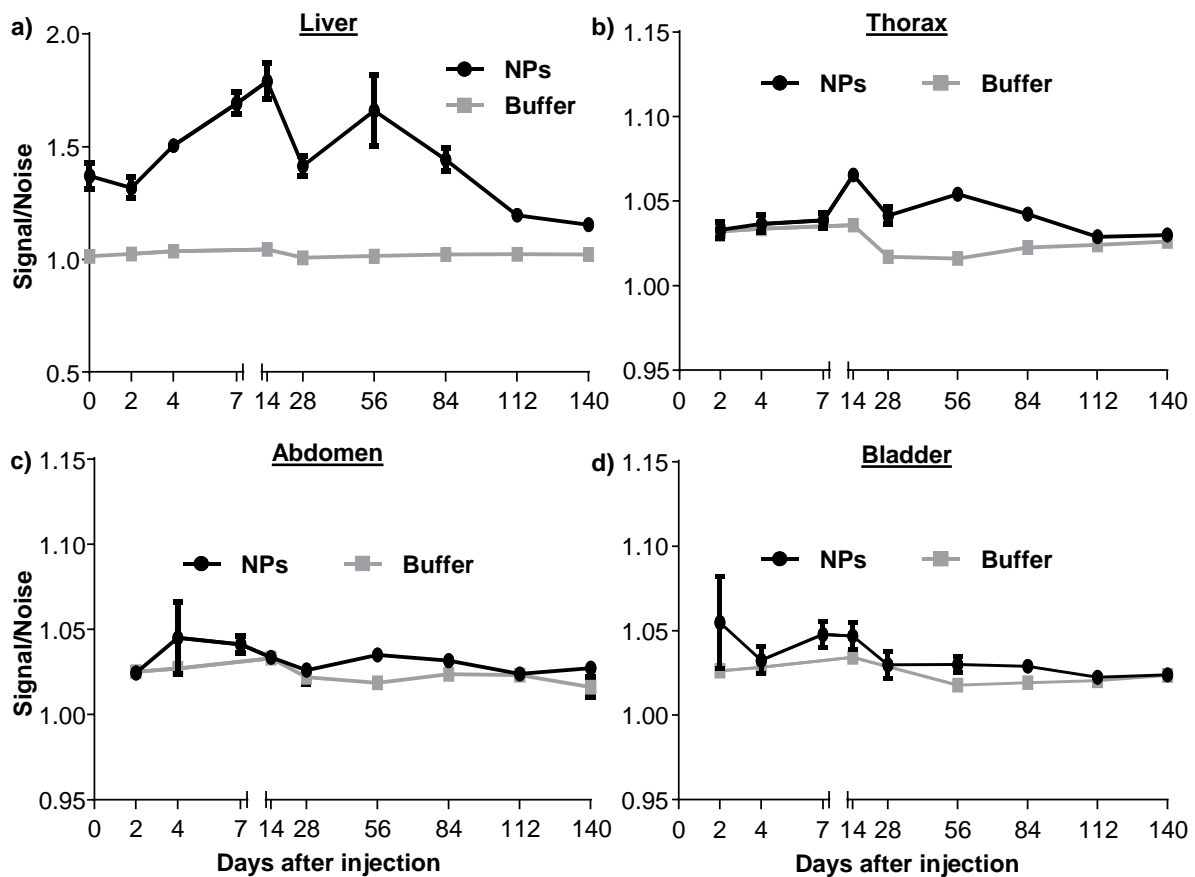


Figure IV.9. Suivi de la distribution des NPs par fluorescence. Quantification du ratio signal/bruit au niveau de a) foie ; b) thorax ; c) abdomen et d) vessie.

La reconstitution des images acquises sur corps entier (Figure IV.10) permet de rendre compte visuellement des conclusions précédemment tirées et d'apporter des compléments d'information. Anatomiquement, la quantification du signal majoritaire correspond bien à la localisation du foie et de la rate. Le faible signal observé au niveau de la vessie à J14 (Figure IV.10) est probablement dû à une contamination externe lors du toilettage de l'animal.

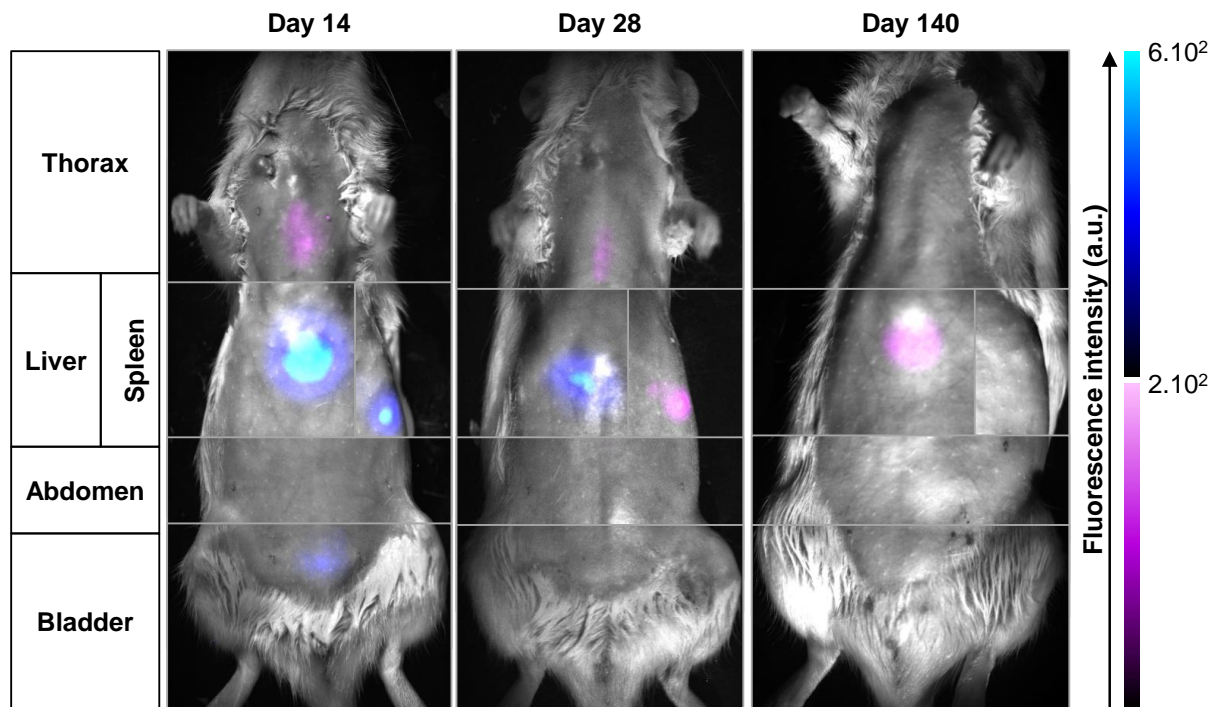


Figure IV.10. Evolution du signal de fluorescence au cours du temps. Reconstitution des différentes zones d'acquisition du signal de fluorescence : thorax, foie, rate, abdomen et vessie.

Le dosage du Gd présent dans les échantillons biologiques collectés au cours du temps permet de compléter l'étude du métabolisme des NPs. Il apparaît que deux jours après injection, il subsiste une concentration circulante de NPs de l'ordre de $160 \mu\text{g/L}$ (Figure IV.11), ce qui corrobore les résultats obtenus sur lapins avec les NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ (IV.B.2). A noter qu'ici, le sang n'a pas été prélevé directement après injections des NPs du fait de l'acquisition du signal de fluorescence simultanée. Le pic majoritaire de leur distribution n'apparaît donc pas. Par la suite, on note une rapide diminution de la concentration circulante jusqu'à une stabilisation de l'ordre de $10 \mu\text{g/L}$ après quatre jours, comme obtenu lors de la première étude sur lapins (voir IV.B.2). Des traces de Gd ont été dosées dans les urines avec un maximum de $35 \mu\text{g/L}$. En revanche, nous avons détecté des quantités importantes de Gd dans les fèces : 113 ng/g dès le deuxième jour avec une augmentation croissante jusqu'au premier mois pour atteindre un maximum de 800 ng/g puis une pseudo-stabilisation jusqu'au troisième mois avant de retrouver une excrétion de l'ordre de 80 ng/g aux quatrième et cinquième mois.

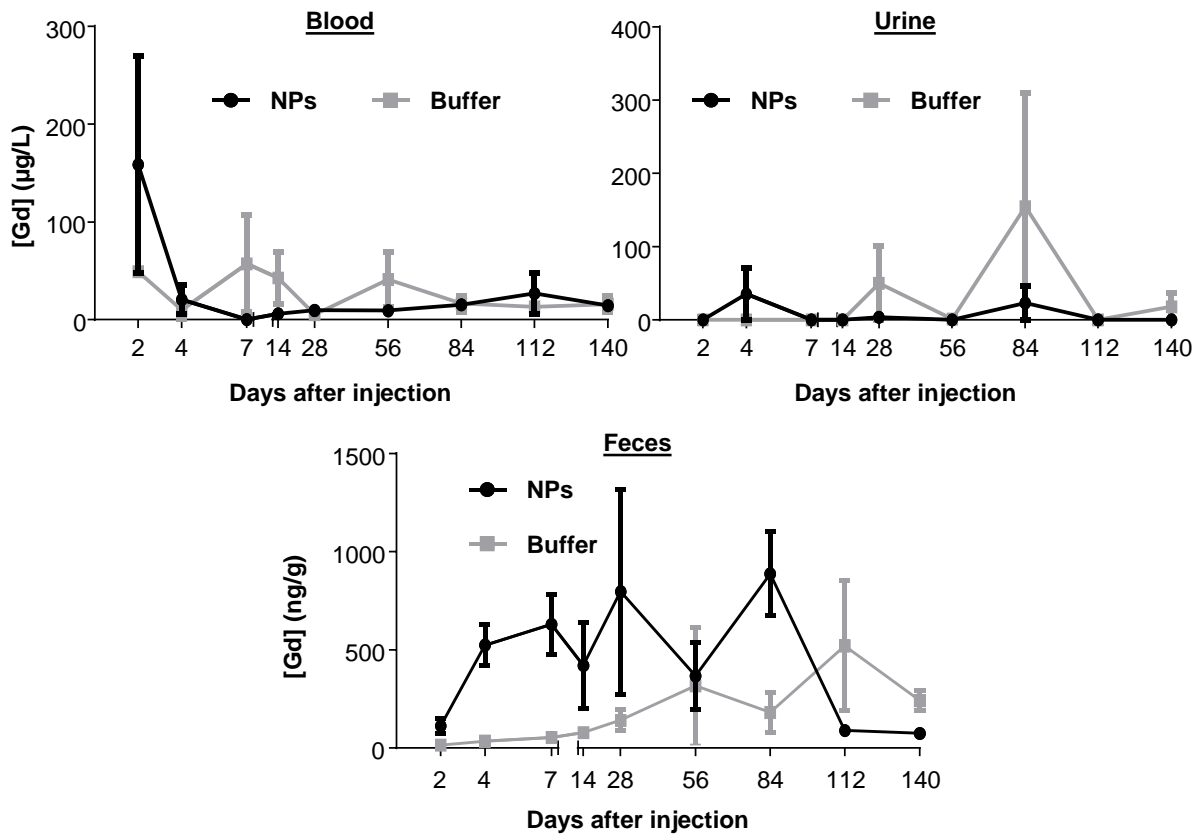


Figure IV.11. Distribution et excrétion des NPs. Concentrations en Gd dosé par ICP-MS dans a) sang ; b) urine et c) fèces.

Si l'on considère la concentration (0,862 mg/mL) et la dose (4 mL/Kg) initialement injectée, la quantité totale de NPs introduite dans l'organisme était en moyenne de 560,3 µg (en fonction du poids des animaux) ce qui correspond à 465,6 µg de gadolinium. En approximant la production de fèces à 5 g/jour, nous pouvons extrapoler le pourcentage d'élimination quotidien du Gd par les fèces (Figure IV.12). Ainsi, au cours du premier mois, une moyenne spéculative de 18,3 % du Gd introduit a été éliminée par les fèces, soit 61,6 % total après cinq mois. L'élimination est continue entre les jours 2 et 84 puis se stabilise aux jours 112 et 140.

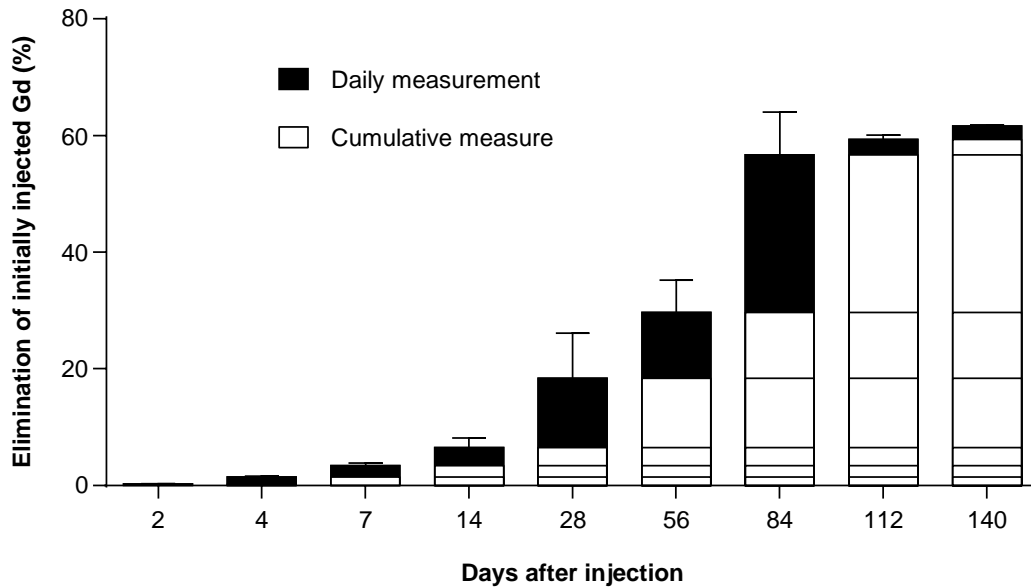


Figure IV.12. Extrapolation de l'élimination de gadolinium chez les animaux traités aux NPs. Résultats exprimés en pourcentage cumulé du Gd initialement injecté (moyenne \pm sem).

Ceci met donc en avant une excrétion majoritairement fécale certainement consécutive à une dégradation hépatobiliaire corrélée avec le marquage observé.

c) Vérification de la distribution des NPs dans les organes

Afin de vérifier les hypothèses formulées d'après les résultats obtenus en surface de la peau des animaux anesthésiés, nous avons mesuré la fluorescence émise directement en surface des organes prélevés après sacrifices (Figure IV.13). S'il ne semble pas y avoir de fluorescence au niveau des reins, du cœur et du cerveau, on observe toutefois un signal intense au niveau du foie et de la rate ainsi qu'un signal plus faible au niveau des poumons. Ces résultats valident donc l'hypothèse de répartition des NPs dans le foie, la rate et les poumons.

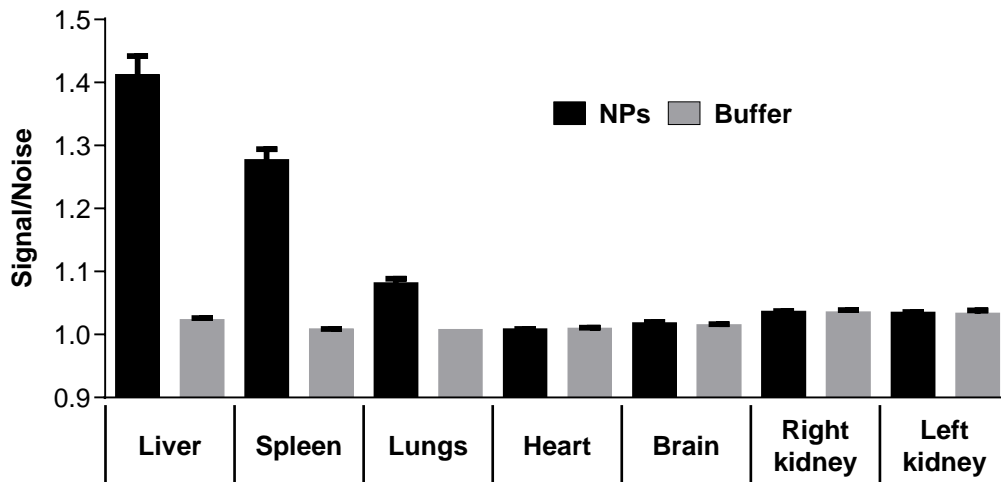


Figure IV.13. Quantification du ratio signal/bruit en surface des organes prélevés après sacrifices au jour 140.

Les images acquises en surface des organes isolés (Figure IV.14) rendent compte d'une part de la structure normale des organes traités par rapport aux contrôles mais également de la répartition du signal. En effet, le faisceau laser n'étant pas assez large pour couvrir la surface des plus grands organes (foie, rate et poumon), différentes acquisitions ont été réalisées en surface de ceux-ci. Il en ressort un signal identique sur toutes les zones mesurées rendant compte d'une répartition uniforme des NPs dans le foie, la rate et les poumons. La présence de signal au niveau des reins n'est pas imputable à la présence de NPs, car le même signal est identifiable chez les animaux contrôles, mais plutôt à un bruit de fond important et/ou à une autofluorescence des tissus. En effet, malgré tous nos efforts et l'ajout de filtres pour purifier la source d'excitation, il semble qu'il persiste des longueurs d'onde parasites provenant du laser. Or, l'urine est connue pour produire une forte autofluorescence après excitation dans le bleu et le vert¹⁶⁹.

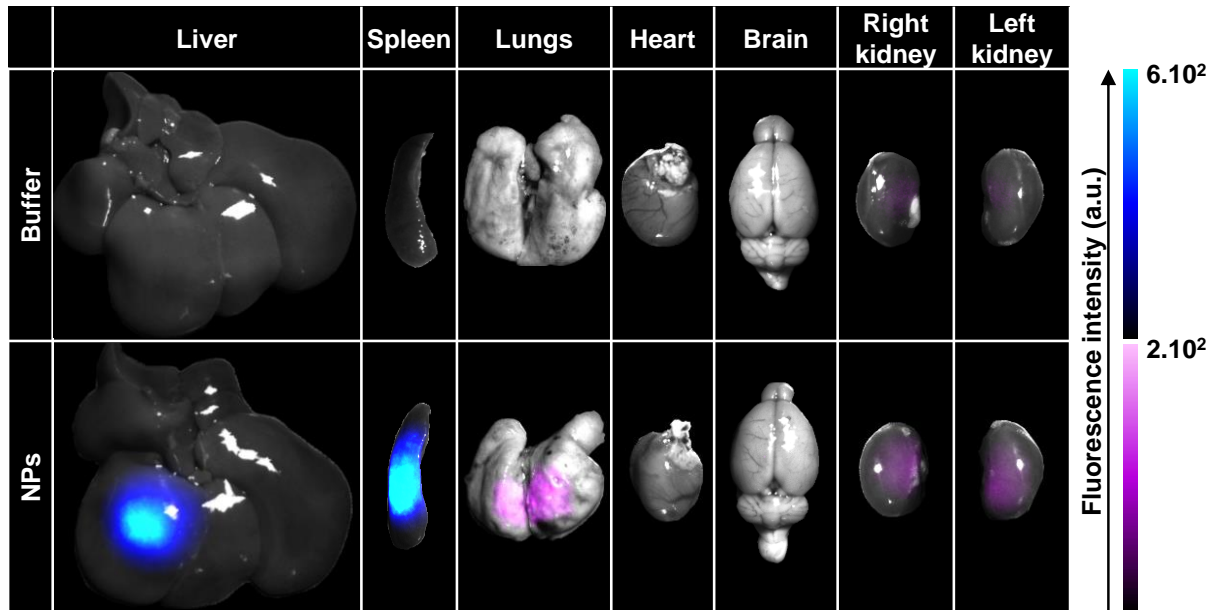


Figure IV.14. Signal de fluorescence sur organes prélevé après sacrifices au jour 140.

Le dosage du Gd dans les organes prélevés, corrobore les résultats obtenus en fluorescence. En effet, nous avons retrouvé une majorité de la quantité totale de Gd dans le foie et dans la rate (163 μg et 46 μg), ainsi qu'une plus faible quantité dans les poumons (10,8 μg).

Les acquisitions de fluorescence ayant mis en avant une répartition homogène des NPs dans les organes cibles, les résultats sont exprimés ici en quantité totale de Gd par organe en rapportant la concentration mesurée par ICP-MS au poids total de l'organe correspondant au moment du prélèvement.

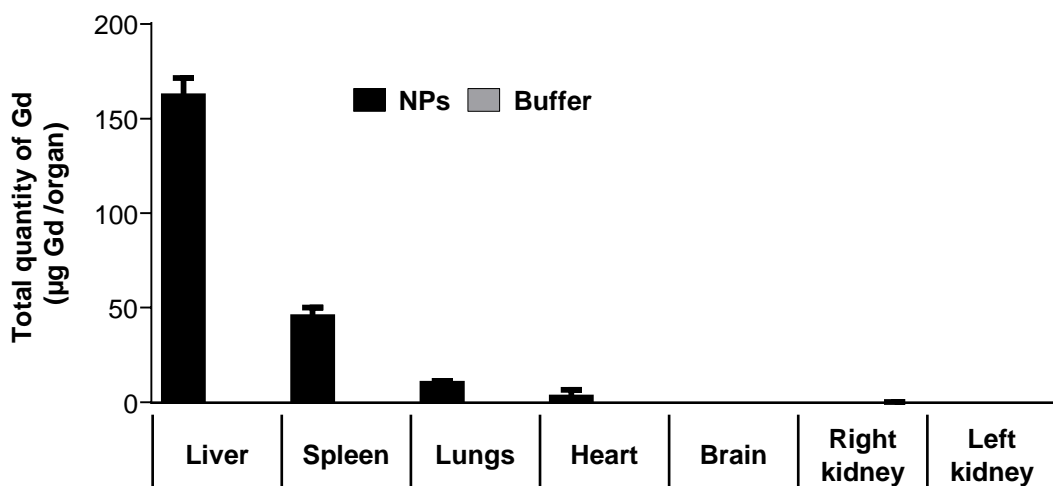


Figure IV.15. Quantité totale de Gd dans chaque organe prélevé au jour 140 dosé par ICP-MS.

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

Si l'on considère la quantité cumulée de Gd dans les principaux organes cibles (foie, rate et poumon), nous avons retrouvé 220 µg le cinquième mois. Ceci correspond à 47,2 % de la quantité totale de Gd initialement introduite. En comparaison avec la quantité théorique d'élimination par les fèces (61,6 %), il semble que la totalité (108,8 % selon notre approximation) du Gd introduit soit retrouvée. Cela valide donc l'hypothèse d'une lente dégradation hépatobiliaire associée à une excrétion fécale ainsi qu'à une fixation minoritaire dans les poumons.

2. Impact sur la santé des animaux

En parallèle, des paramètres physiologiques ont été mesurés pour rendre compte de la bonne santé des animaux. Il en ressort que le traitement aux NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ n'impacte nullement la prise de poids corporel (Figure IV.16a) ou le poids des organes prélevés (Figure IV.16c) laissant envisager l'absence d'impact négatif sur la santé. Par ailleurs, tout au long de l'étude, les animaux n'ont montré aucun signe de douleur ou d'inconfort. Cependant, la quantification des volumes urinaires (Figure IV.16b) lors de l'isolement en cage à métabolisme met en avant une différence entre animaux traités et contrôles. Ceci laisse envisager une atteinte rénale sans perte de masse du tissu. Comme nous l'avons introduit précédemment (II.B.2), cela pourrait être relié à l'apparition de pathologie telle que la fibrose néphrogénique systémique. Cette hypothèse reste à confirmer dans des études ultérieures par des biopsies de peau et de tissus osseux. Néanmoins, cette différence disparaît après cinq mois, ce qui suggère un effet transitoire et réversible et donc non relié à une pathologie fibrotique.

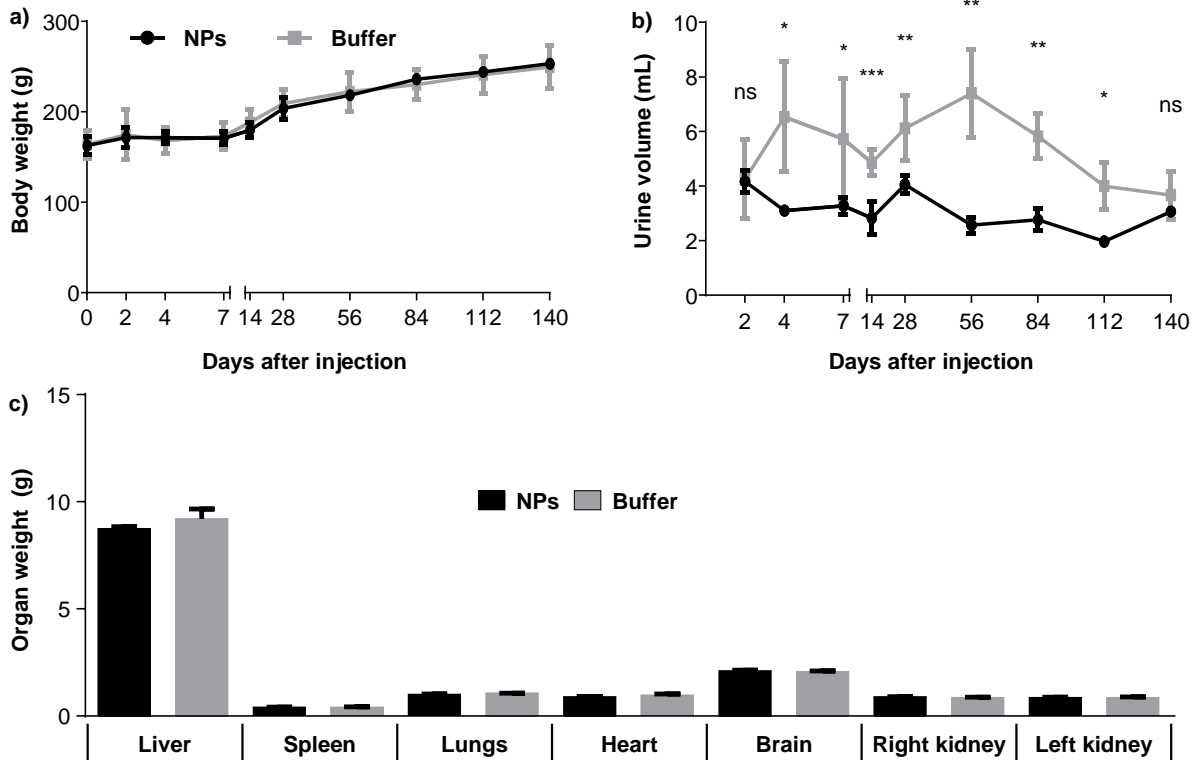


Figure IV.16. Impact des NPs sur la santé des animaux. a) Poids corporel. b) volume urinaire total collecté en cage à métabolisme. c) Poids des organes prélevés au jour 140.

L'analyse ultérieure des coupes histologiques nous permettra de vérifier plus en profondeur les éventuelles atteintes tissulaires induites par la présence des NPs.

D. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette seconde étude mettent en avant un fort potentiel des NPs Gd_2O_2S pour le marquage à long terme et l'imagerie multimodale biomédicale. L'étude de leurs potentiels effets secondaires sur la santé animale révèle une relative innocuité de ces agents de contraste.

D'après l'ensemble des résultats obtenus ici ainsi que les données de la littérature¹⁷⁰, nous proposons le schéma ci-dessous comme synthèse de la distribution, du métabolisme et des voies d'excrétion des NPs Gd_2O_2S (Figure IV.17) : après injection dans le compartiment sanguin (i), les NPs circulent et sont captées par les organes fortement vascularisés et riches en macrophages résidents, soit en majorité le foie et la rate et en plus faible proportion, le poumon (ii). Cette captation s'accompagne d'un signal de longue durée visible en IRM (IV.B) et en fluorescence (IV.C). Deux mécanismes de décomposition des NPs peuvent alors entrer en jeu :

Utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique

- d'une part le relargage de gadolinium ionique directement à partir des NPs dans la circulation sanguine avec élimination de ce dernier par filtrage rénal (iii). Cependant, au vu de nos résultats sur la stabilité des NPs dans le plasma (Figure IV.4) et des traces extrêmement faibles de Gd détectées aussi bien dans les urines que dans la circulation sanguine après quelques jours (Figure IV.11), ce mode d'élimination paraît extrêmement minoritaire.
- d'autre part, la dégradation/métabolisation par le système hépatobiliaire (iv) conduisant possiblement à la transformation des NPs (initialement en oxysulfures) en sous-produits de dégradations comme des carbonates ou des phosphates avant excrétion finale. Cette métabolisation semble très lente et conduit à l'excrétion des produits de dégradation principalement par les fèces et éventuellement par les urines (v). Il serait également possible que ces sous-produits de métabolisation se retrouvent fixés dans des organes non directement impliqués tels que la peau ou les os (vi). Des tests complémentaires sont en cours.

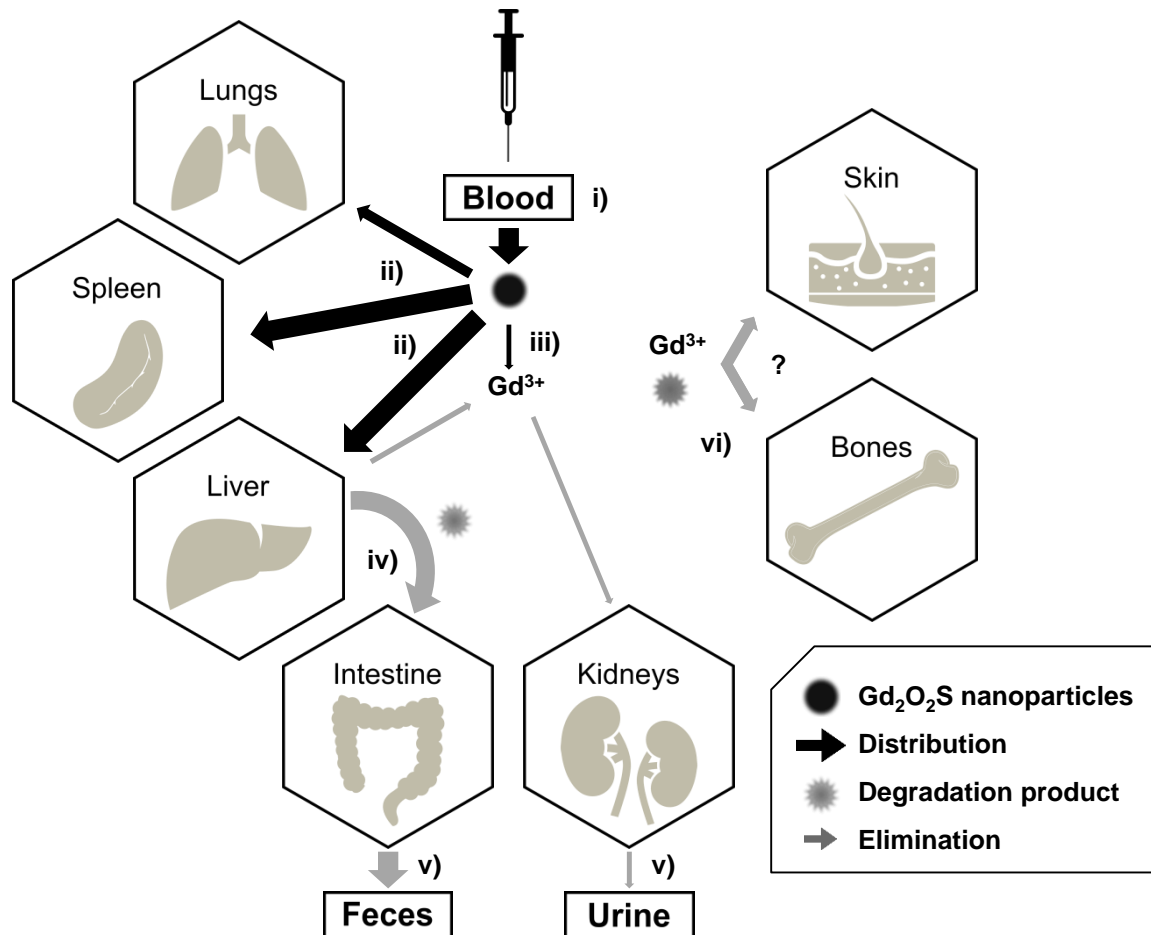


Figure IV.17. Métabolisme des NPs Gd_2O_2S au sein de l'organisme. i) Circulation des NPs après injection. ii) Capture par les organes abondamment irrigués et riches en macrophages : foie, rate et poumons. iii) Relargage du Gd ionique. iv) Dégradation. v) Excrétion des produits de dégradation ou du Gd ionique. vi) Potentielle fixation des produits de dégradation dans la peau ou les os.

V. Marquage et suivi cellulaire

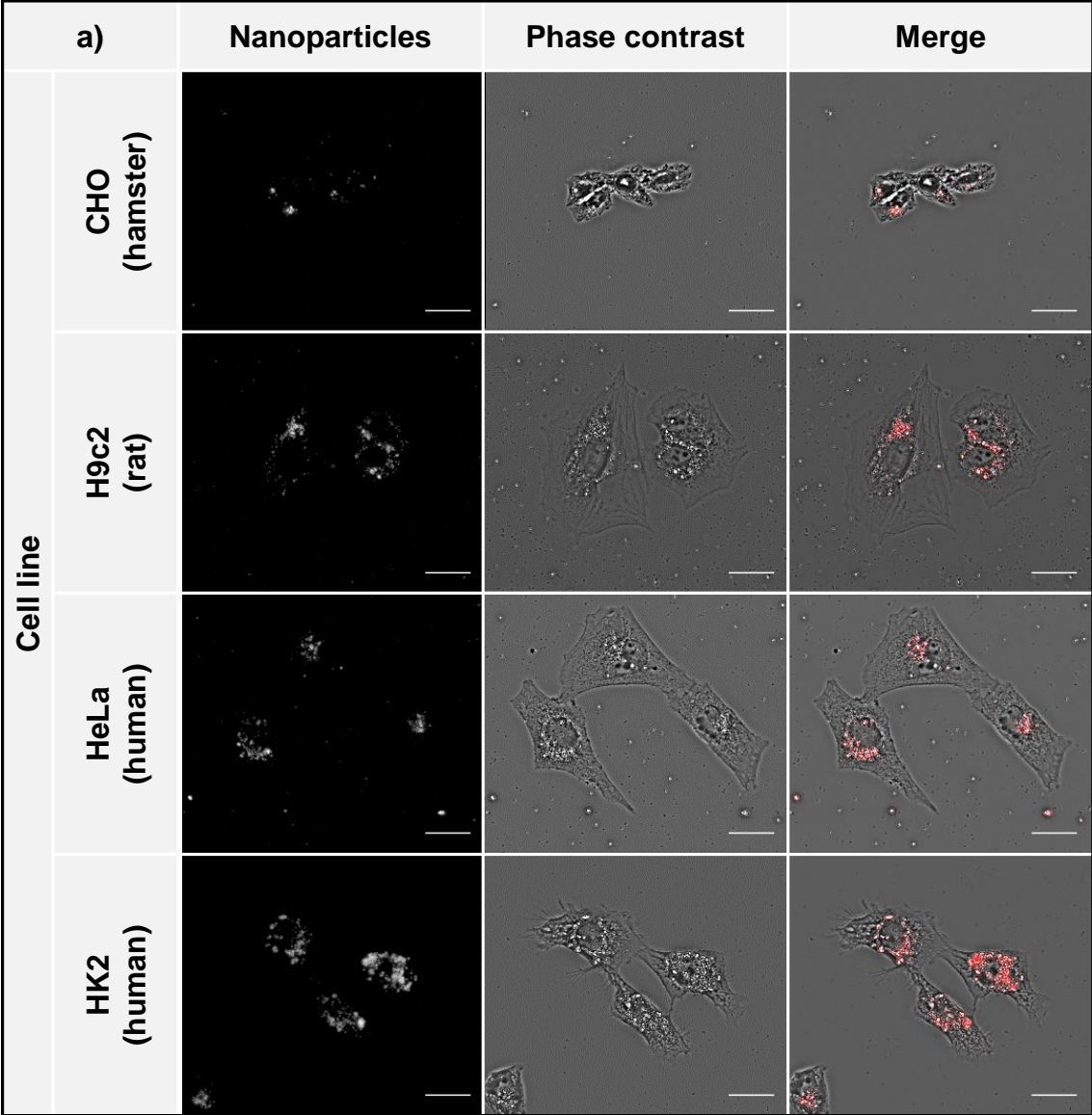
A. Introduction

Après avoir validé la non toxicité et étudié les phénomènes métaboliques associés aux NPs au niveau de l'organisme, nous avons concentré notre attention sur leur potentiel en tant qu'agent de marquage cellulaire. Dans un premier temps, nous avons donc tiré parti de la visibilité des NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ par microscopie de fluorescence classique pour mettre au point le marquage cellulaire et la biocompatibilité du traceur. Dans un second temps, suite à la validation des NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ et de l'imageur dédié, nous avons réalisé le suivi en temps réel de cellules mésenchymateuses marquées dans un contexte de thérapie cellulaire.

B. Mise au point du marquage cellulaire *in vitro* : $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$

1. Marquage cellulaire polyvalent

Les travaux précédemment effectués dans l'équipe ont montré la faisabilité du marquage cellulaire sur des fibroblastes murins et des cellules tumorales mammaires humaines^{144,145}. Ici nous avons étendu le champ d'action sur des lignées cellulaires d'origine humaine (utérine et rénale) et de rongeurs (cardiaque et ovarienne) (Figure V.1a). Les mêmes expériences ont été également conduites sur des cellules primaires car elles sont souvent décrites comme moins permissives aux transfections et marquages. Ainsi, des cellules humaines (moelle osseuse, veine de cordon ombilical) et de rongeurs (macrophage et moelle osseuse) ont été utilisées (Figure V.1b). Les MSCs de rat et humaines ont été sélectionnées car elles représentent d'excellents candidats en thérapie cellulaire.



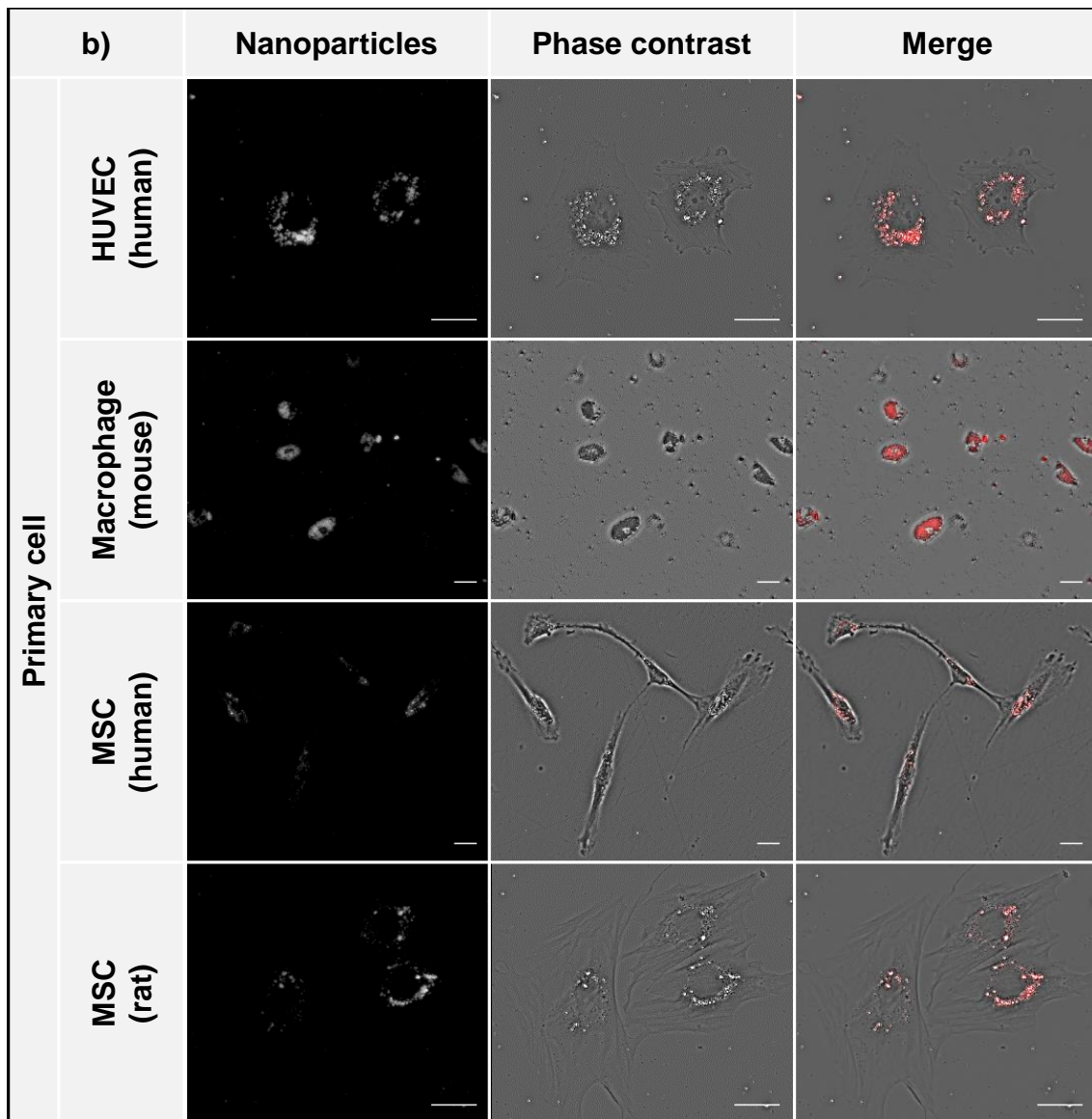


Figure V.1. Marquage de différents types cellulaires avec $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$. a) Lignées cellulaires. b) Cellules primaires. (Barre d'échelle $25\mu m$).

Dans les deux conditions (lignées ou cultures primaires), l'internalisation des NPs a été aisément accomplie après 24 h d'incubation, ce qui résulte en un marquage intense visualisé par microscopie d'épifluorescence. Comme attendu, les cellules phagocytaires (macrophages) présentent la plus grande quantité de NPs internalisées tandis que les cellules non phagocytaires présentent une plus faible quantité qui semble cohérente avec le rapport nucléo-cytoplasmique. Les CHO par exemple, présentent un plus petit cytoplasme et semblent donc internaliser moins de NPs en relation avec l'espace intracellulaire disponible. Ces résultats confirment le potentiel de ces NPs en tant que sondes fluorescentes ubiquitaires pour le marquage cellulaire. Des expériences plus approfondies ont par la suite été conduites sur des cellules stromales mésenchymateuses car ce sont des cultures

primaires présentant une sensibilité biologique conséquente et qui sont actuellement utilisées en thérapie cellulaire dans des essais cliniques^{171,172}. De plus, le développement d'outils de suivi dédiés est essentiel pour évaluer le devenir cellulaire ainsi que les potentiels effets bénéfiques.

2. Marquage des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse

a) Conditions de marquage

Nous avons tout d'abord étudié les meilleures conditions de marquage adaptées à ce type cellulaire. Pour cela, nous avons testé différentes tailles et concentrations de NPs $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$. Nous avons donc préparé différents lots de nanoparticules de diamètres croissants allant de 85 nm à presque un demi-micron (Figure V.3a) avec une relative monodispersité (Figure V.2).

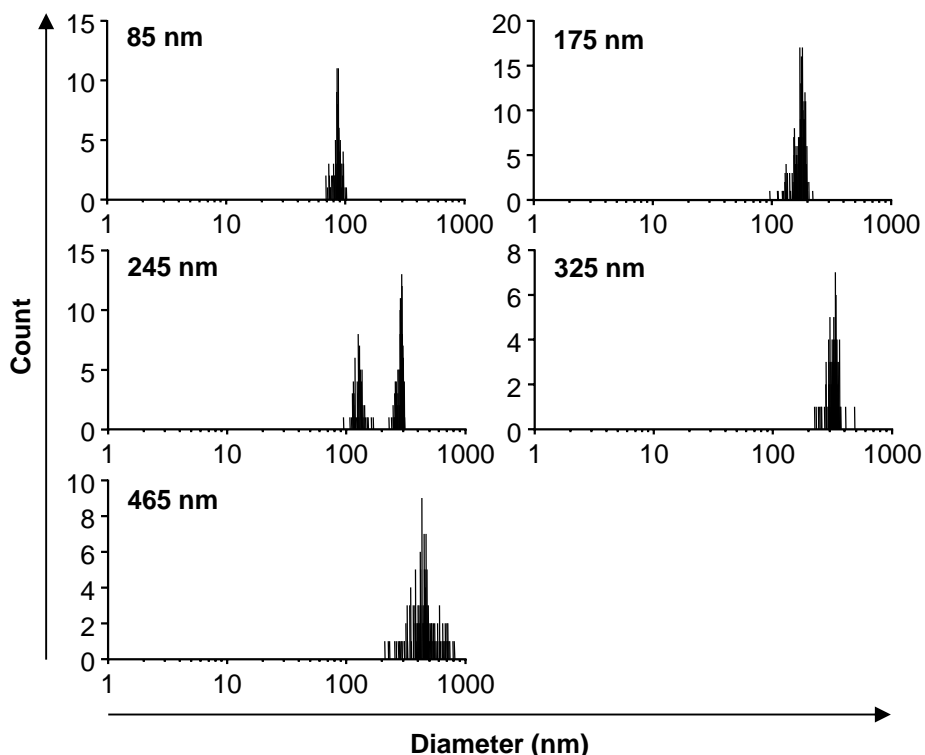


Figure V.2. Diamètres des différents lots de nanoparticules mesurés par microscopie électronique à transmission (moyenne mesurée sur un minimum de 100 NPs différentes).

Nous avons par la suite quantifié l'efficacité de marquage de ces différents lots (Figure V.3). Comme nous pouvons l'anticiper, l'intensité de marquage augmente proportionnellement à la concentration. La majorité des études sur le sujet se concentre sur l'utilisation de NPs les

plus petites possibles, et, à notre connaissance, très peu de données existent sur l'effet de NPs plus larges¹⁷³. Nous avons ainsi mis en évidence que des NPs plus grandes induisaient des niveaux de marquage plus importants avec une saturation pour des concentrations supérieures à 100 µg/mL pour les NPs de diamètre supérieurs à 200 nm. Il est probable que différents mécanismes d'internalisation soient impliqués dépendamment de la taille des NPs¹⁷⁴.

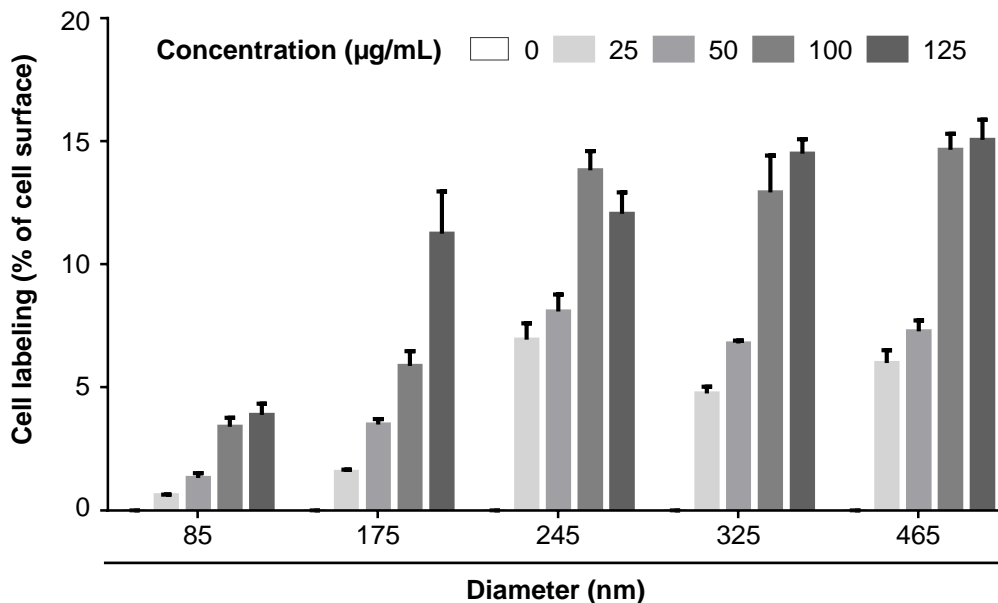


Figure V.3. Impact de la taille et de la concentration des NPs sur le marquage cellulaire des MSCs. Quantification du marquage cellulaire exprimé en pourcentage de surface cellulaire occupé par les NPs.

Afin de comparer l'intensité de fluorescence et la quantité réelle de NPs internalisées, nous avons réalisé une expérience complémentaire de dosage par spectrométrie à plasma à couplage inductif sur les cellules marquées. Ainsi, nous avons pu déterminer que pour une exposition à 125 µg/mL de NPs, la quantité de NPs internalisées variait de 0,37 à 0,7 ng/cellule proportionnellement au diamètre.

b) Biocompatibilité

Afin d'évaluer les potentiels effets du marquage aux NPs sur la biologie, l'intégrité et le comportement cellulaire, nous avons tout d'abord examiné la persistance de l'activité métabolique et l'intégrité membranaire à court terme.

Les plus fortes concentrations de NPs semblent diminuer légèrement l'activité métabolique cellulaire (MTT, Figure V.4a) comparativement aux cellules non traitées avec cependant un

effet moins marqué pour les NPs de diamètre intermédiaire (175 et 245 nm). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que l'internalisation est un processus énergie-dépendant. De plus, aucun détachement cellulaire n'a été observé durant les 24 h d'incubation et l'impact sur l'activité métabolique reste dans tous les cas très limité (<25%). Enfin, l'utilisation de tests basés sur une mesure de l'absorbance comme le MTT est certes incontournable pour une première validation des conditions de traitement mais peut conduire à des résultats ne reflétant pas véritablement la viabilité à cause de la génération d'artefacts dus à la présence des NPs¹⁷⁵

En revanche, l'intégrité membranaire ne semble pas être impacté (Rouge neutre, Figure V.4b). La légère augmentation de fixation du colorant rouge neutre en présence de NPs peut être apparentée à l'implication des lysosomes dans le processus d'internalisation et à la fixation du colorant rouge neutre dans ces compartiments.

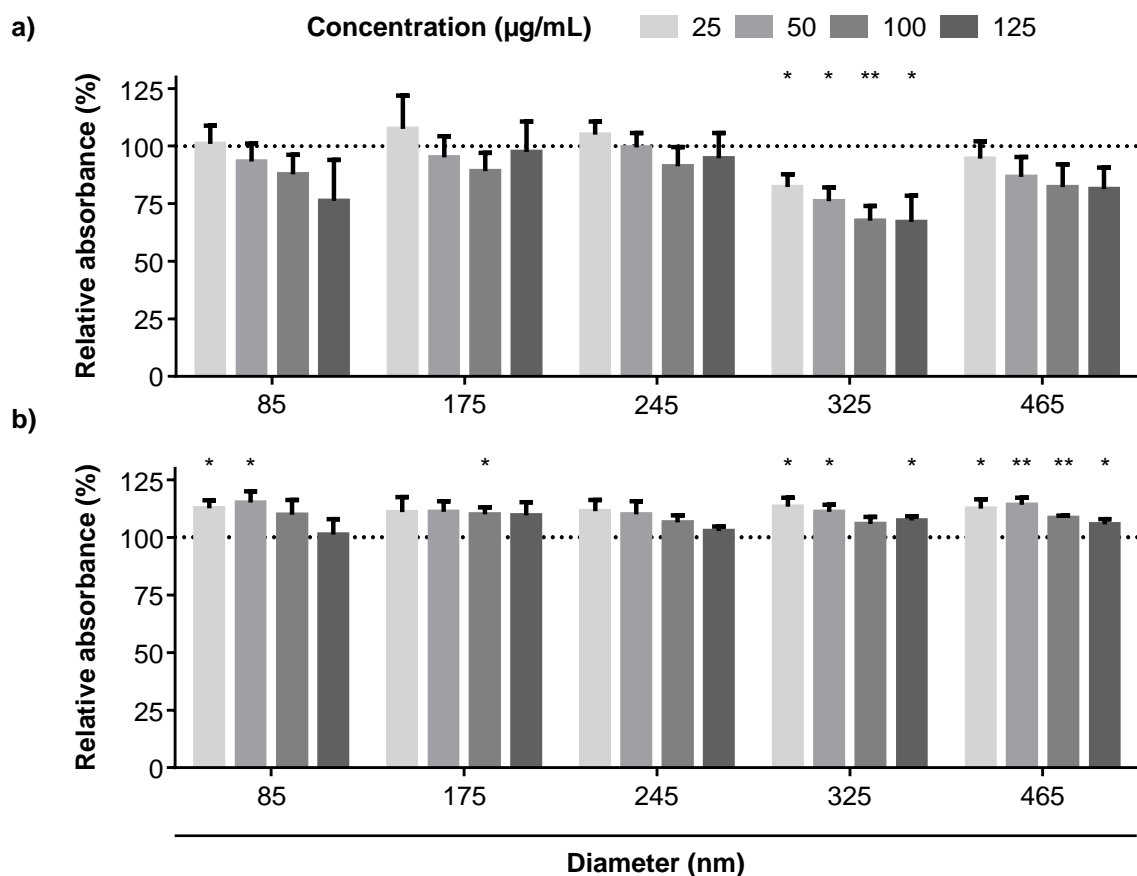


Figure V.4. Viabilité des MSCs après 24h de marquage aux Gd₂O₂S:Eu³⁺ évaluée par a) MTT et b) rouge neutre. Les résultats sont présentés sous forme d'absorbance relative par rapport aux cellules non traitées (ligne en pointillés à 100%) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Marquage et suivi cellulaire

Ces résultats révèlent qu'il ne semble pas y avoir de corrélation linéaire entre la taille des NPs et l'effet biologique mais plutôt une certaine gamme de diamètres plus adaptés à un certain type cellulaire. Dans le cas présent, il semble être compris entre 175 et 245 nm.

Parmi les autres propriétés fonctionnelles des MSCs, se trouvent les capacités de migration et de prolifération. Les potentielles modifications de ce processus ont été évaluées par un test de cicatrisation (wound healing scratch assay) permettant l'appréciation fonctionnelle à moyen terme. Comme présenté en Figure V.5 a, la vitesse de fermeture de la brèche se trouve diminuée lorsque les concentrations dépassent 50 µg/mL. L'effet est d'autant plus prononcé pour les NPs se trouvant en dehors de la gamme de taille précédemment définie (175-245 nm). Comme attendu, il est par conséquent nécessaire de trouver le dosage approprié.

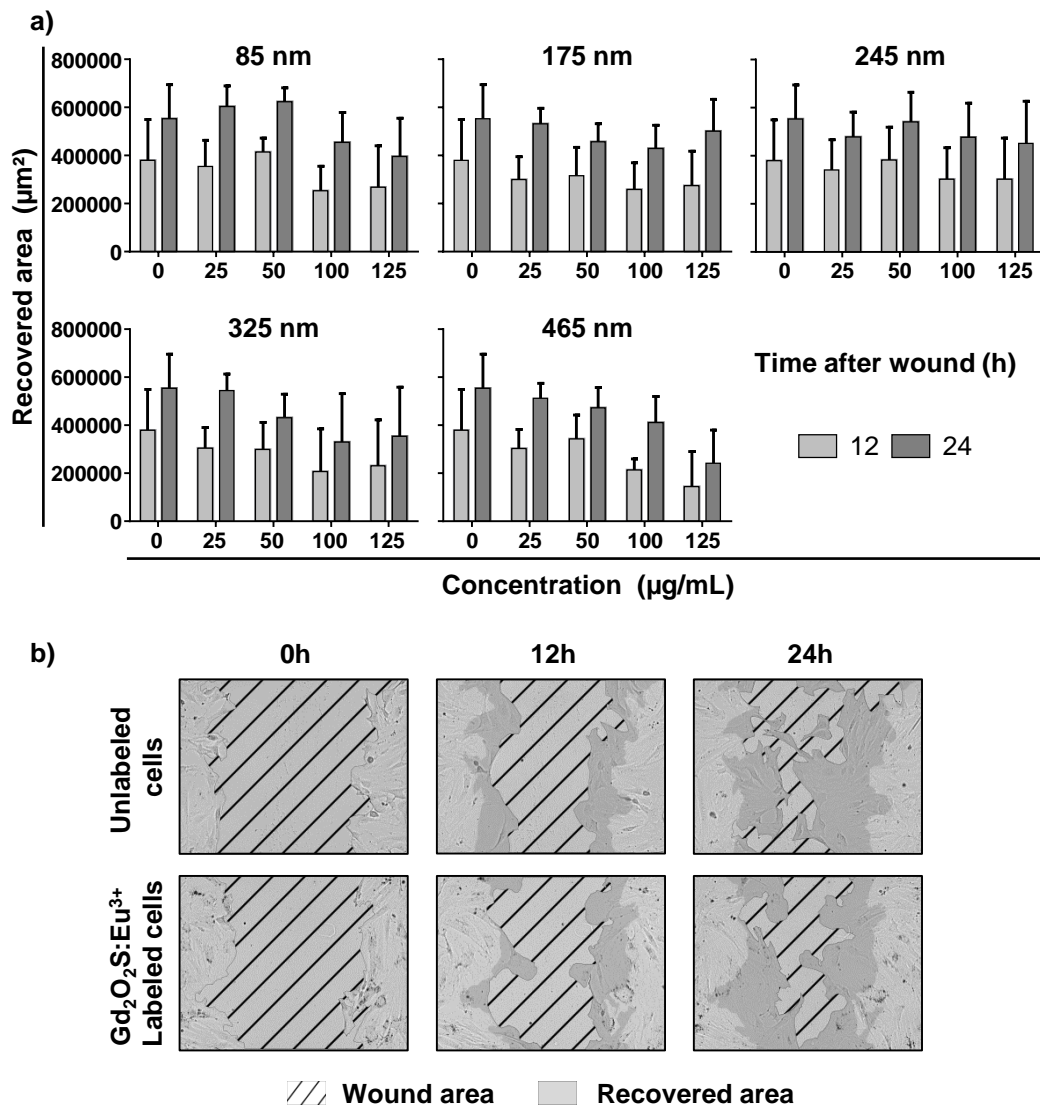


Figure V.5. Test de « Wound healing » effectué sur MSCs. a) quantification de la surface recouverte par les cellules après blessure du tapis cellulaire. b) clichés représentatifs de la fermeture de la plaie cellulaire.

Les MSCs sont également utilisées en thérapie cellulaire pour leur capacité à sécréter un grand nombre de facteurs paracrine (facteurs de croissance et cytokines) ainsi que pour leur multipotence. En effet, ces cellules sont capables de se différencier vers trois lignages mésodermiques. Nous avons ici évalué l'impact d'une exposition à long terme des NPs sur ce potentiel de différenciation, l'achèvement de ce processus prenant plusieurs semaines. Comme exposé en Figure V.6, aucune différence n'a pu être observée entre cellules marquées et non marquées. Une quantité similaire de polysaccharides du cartilage, de cristaux d'hydroxyapatite et de gouttelettes lipidiques ont été observées alors même que les conditions de marquage utilisées ici sont les plus défavorables selon les résultats précédents (diamètre 85 nm et concentration 125 µg/mL).

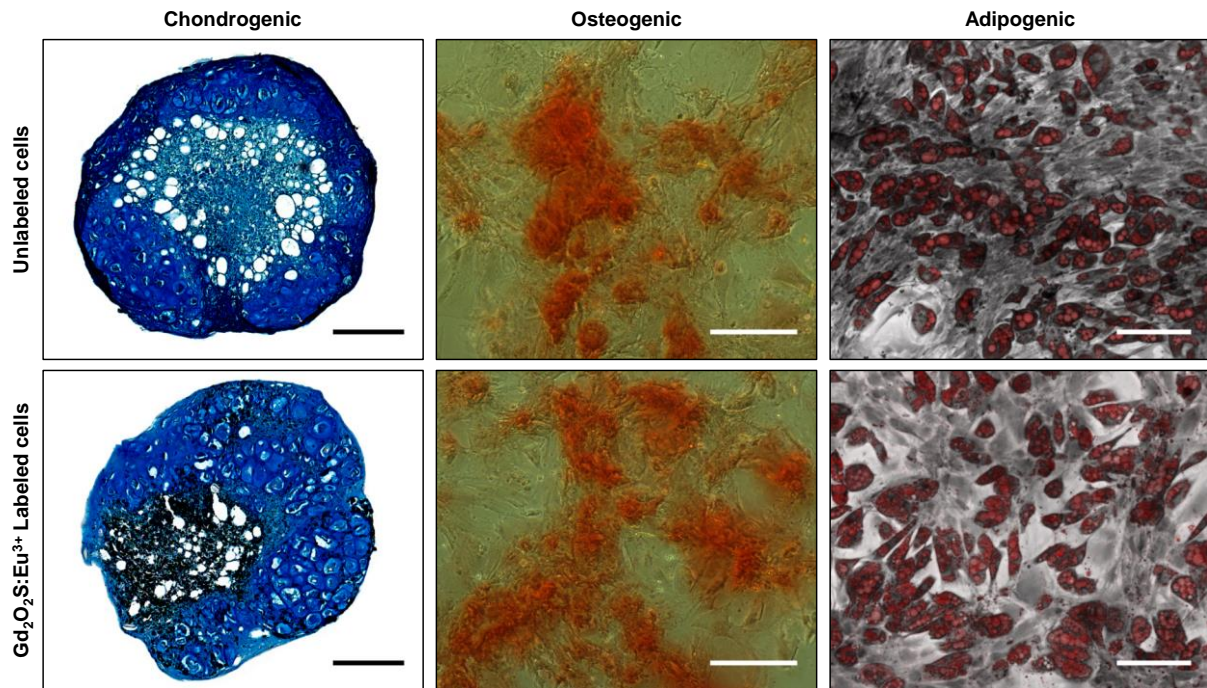


Figure V.6. Différenciation des MSCs (barre d'échelle 150 μm). Le marquage aux $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ a été réalisé à 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec des NPs de diamètre 86 nm. Les polysaccharides du cartilage sont colorés au bleu alcian, les cristaux de phosphate calcium au rouge alizarin et les gouttelettes lipidiques à l'huile rouge.

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve que les NPs de $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ peuvent être utilisées sans risque démontré en thérapie cellulaire.

3. Fiabilité du marquage

Nous avons par la suite étudié en détail le marquage cellulaire afin de vérifier que celui-ci soit fiable et adapté à une application en thérapie cellulaire. La cinétique d'internalisation des NPs par les MSCs a été observée à l'aide d'un vidéomicroscope permettant l'acquisition d'images toutes les 15 minutes pendant toute la durée du marquage. Il est alors apparu que les NPs entrent dans la cellule graduellement au cours des 24 h d'incubation pour se concentrer dans la zone périnucléaire. Aucune NP ou agrégats quittant la cellule n'a été observée durant toute cette période (Figure V.7a). Un comportement identique a été constaté avec des NPs de diamètres différents. Une fois la période d'incubation terminée et les NPs non internalisées éliminées, l'examen par microscopie de fluorescence classique a mis en évidence que les NPs sont stockées dans le cytoplasme, principalement autour du noyau (Figure V.7b) (visible ici par coloration au DAPI). La microscopie électronique à transmission révèle que celles-ci sont retenues dans des vésicules avec différents niveaux de compactage et de concentration (Figure V.7c).

Marquage et suivi cellulaire

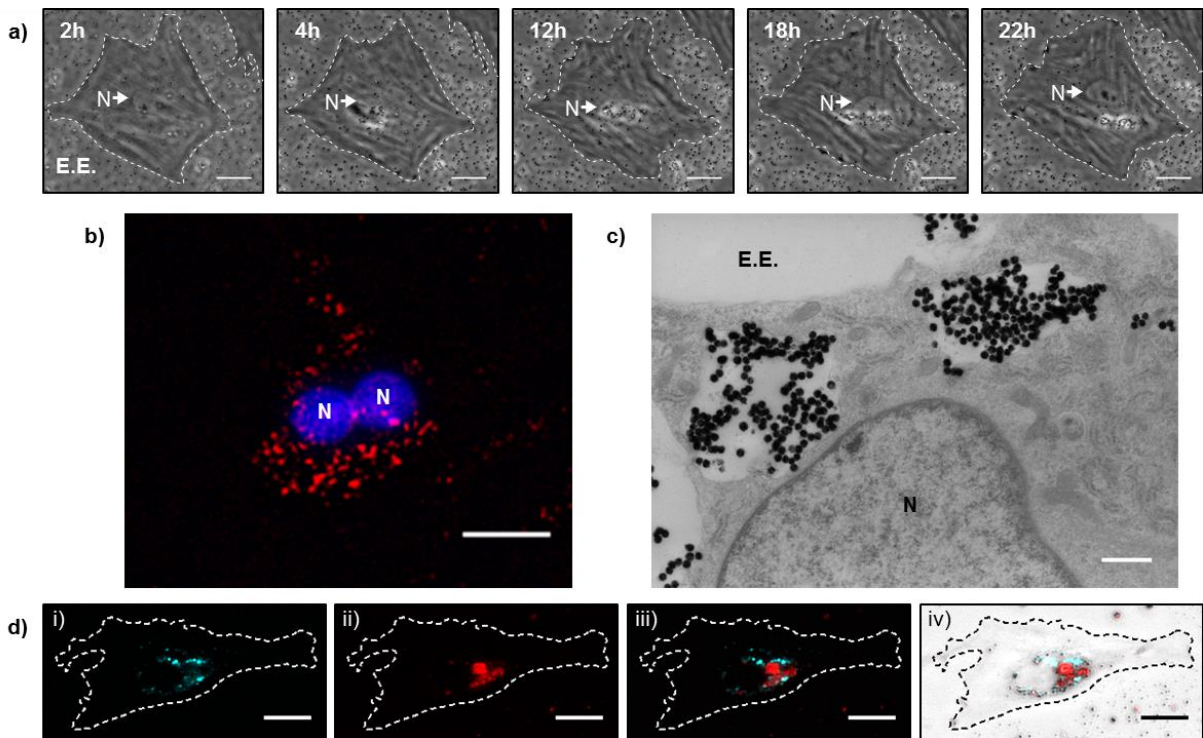


Figure V.7. Marquage des MSCs aux $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$. a) clichés extraits de l'acquisition en vidéomicroscopie. Les agrégats de nanoparticules apparaissent sous forme de points noirs ou de masses brillantes selon leur compactage (barre d'échelle 20 μm). b) Image de fluorescence : NPs en rouge et noyau en bleu (DAPI) (barre d'échelle 20 μm). c) Image de MET des compartiments subcellulaires durant l'internalisation (barre d'échelle 500 nm). d) Comportement lysosomal en présence de NPs i) LysoTracker® ii) $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ iii) superposition iv) superposition sur contraste de phase (barre d'échelle 20 μm). La délimitation met en évidence le contour cellulaire ; N = noyau ; E.E = environnement extracellulaire.

Les MSCs étant non phagocytaires, les NPs sont généralement internalisées par voies d'endocytose et transitent par le système endolysosomal^{174,176}. La coloration des lysosomes, comme démontré en Figure V.7d, met en avant que la majorité des NPs ne sont pas strictement colocalisées avec ceux-ci mais semblent cependant être à leur proximité directe.

La vérification de la rétention cellulaire après internalisation étant une étape critique dans le développement d'un traceur, nous avons réalisé une co-culture de cellules marquées aux NPs avec des cellules marquées au CFSE afin de valider ce point. Pendant une durée de 6 jours après début de la culture, aucune colocalisation entre la fluorescence du CFSE et celle des NPs n'a été observée (Figure V.8). Ceci démontre que les NPs ne se sont pas échappées hors des cellules et que le confinement cellulaire après marquage est bien efficace. Après cette période, la fluorescence du CFSE n'était plus détectable pour cause de photoblanchiment et/ou oxydation du colorant.

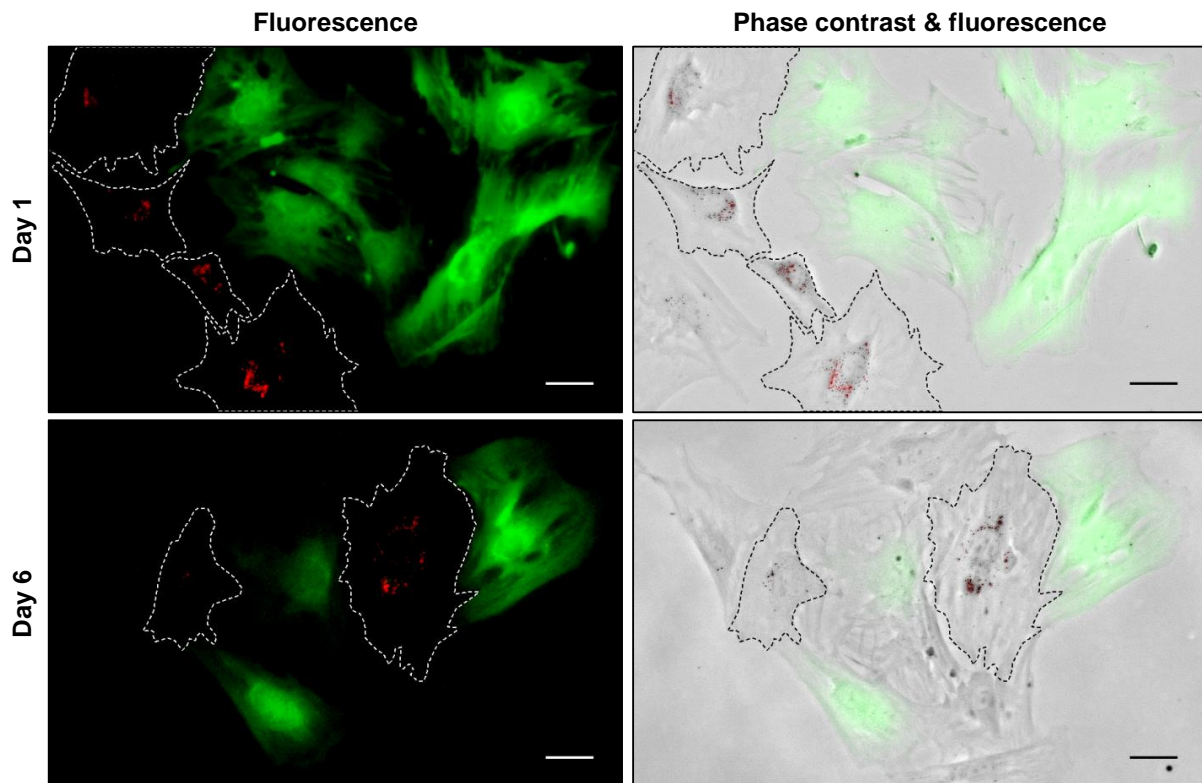


Figure V.8. Images de fluorescence de co-culture des MSCs marquées au CFSE (vert) ou aux $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ (rouge) (barre d'échelle 30 μm). La délimitation met en évidence les contours des cellules marquées aux NPs.

4. Vieillessement des nanoparticules

Afin de mieux comprendre le mécanisme de vieillissement des NPs en milieu biologique et cellulaire pouvant avoir lieu lors de leur utilisation en tant qu'agent de traçage à long terme, nous avons par la suite réalisé une simulation de stabilité *in vitro*. Pour cela, les NPs ont été incubées dans différents milieux aqueux mimant les environnements rencontrés classiquement lors de leur transit intracellulaire^{17,177}. Ainsi nous avons testé différentes conditions comprenant des milieux neutres (eau, PBS, et acétate de sodium) et acides fort ou faibles à différents pH (acide acétique à pH 5,5 et 4,5 et acide chlorhydrique à pH 5,5 et 3,5). Quel que soit le milieu utilisé, on note une diminution de l'intensité d'émission de fluorescence au cours du temps (Figure V.9). Cet effet est majoré en présence de milieux acides, qu'ils soient forts (acide chlorhydrique) ou faibles (acide acétique), proportionnellement au pH. Ces résultats laissent envisager une dissolution/destruction lente des NPs.

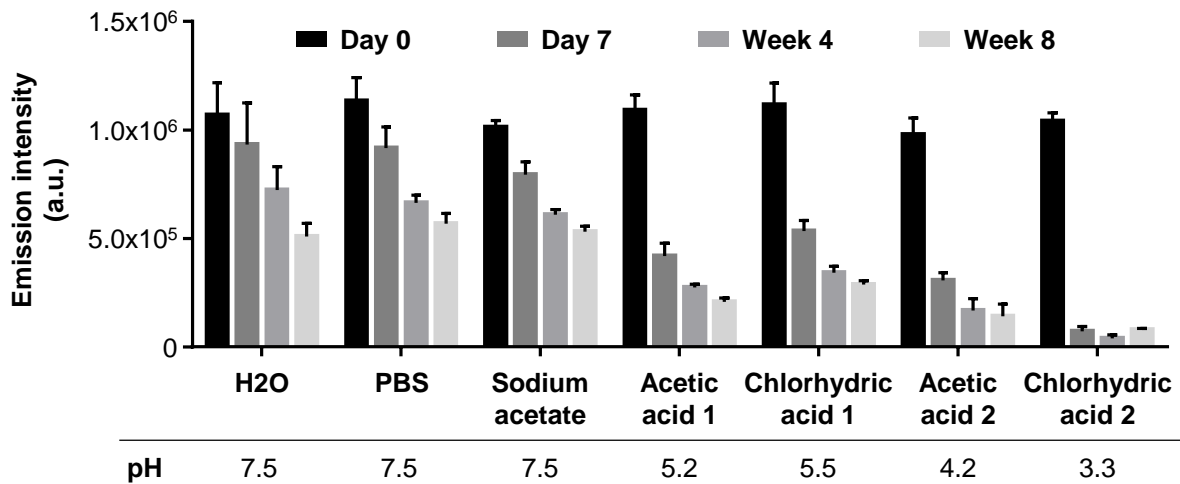


Figure V.9. Vieillesse des nanoparticules en milieux aqueux et/ou acide à 37°C : quantification de l'intensité d'émission de fluorescence au cours du temps. Les différents acides ont été dilués dans le tampon acétate de sodium.

Pour évaluer les potentiels effets néfastes associés à ce type de comportement, nous avons mesuré le relargage de Gd ionique dans le surnageant après exposition à un milieu très défavorable mimant les conditions pouvant être rencontrées dans les lysosomes (pH 4,5) (Figure V.10). Les résultats obtenus confirment qu'une dégradation des NPs est associée à un relargage de Gd ionique. Après 30 jours, 7,42 mM de Gd sont retrouvés dans le surnageant, ce qui correspond à 14% de la masse totale des NPs. Cette valeur augmente encore à 25% après deux mois et 30% après trois mois.

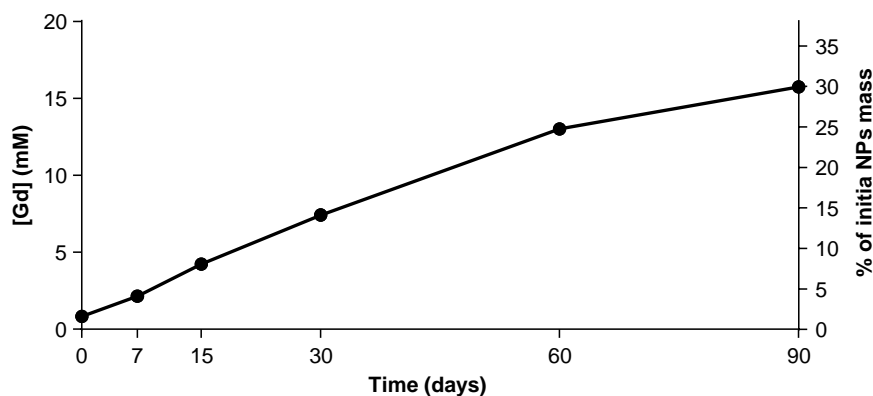


Figure V.10. Relargage du Gd ionique dosé dans le surnageant de nanoparticules incubées à 37°C dans l'acide chlorhydrique à pH 4,5.

Ces résultats mettent en lumière la relative stabilité physico-chimique des NPs en milieu biologique dépendante de l'acidité et de la charge ionique. Cependant, comme montré précédemment, une fois dans la cellule, les NPs ne semblent pas être conservées dans les lysosomes et leur dégradation reste très lente comparativement aux fluorochromes

organiques. La libération de Gd ionique associée paraît négligeable à l'échelle de la cellule marquée, d'autant plus si l'on considère le bénéfice majeur de la longévité du suivi cellulaire.

Par ailleurs, ces résultats peuvent être mis en relation avec la longévité du marquage obtenu *in vivo* (Voir IV). Les NPs captées par le système réticuloendothélial sont très certainement lentement dégradées par les macrophages, ce qui implique un transit par les lysosomes et donc une acidification similaire à celle-ci. La cinétique est suffisamment lente pour autoriser le suivi cellulaire sur plusieurs semaines dans de futures études.

Cette vitesse de métabolisation est également suffisamment lente pour que la libération de gadolinium ionique toxique soit toujours contenue à un niveau largement supportable par la cellule et l'organisme. Elle est cependant suffisamment rapide pour pouvoir qualifier ces nanomarqueurs comme étant non biopersistants. C'est là, très probablement, une spécificité et une qualité appréciable de ces oxysulfures qui sont largement moins insolubles que les oxydes ou phosphates de terres rares qui ont également été largement étudiés, par d'autres équipes, pour des applications en imagerie médicale¹⁷⁸. Cela nous permet d'envisager à terme une éventuelle utilisation humaine.

5. Imagerie cellulaire multimodale

Après avoir évalué l'efficacité du marquage cellulaire au travers de la modalité de fluorescence, nous avons testé la faisabilité d'imagerie multimodale pour le traçage cellulaire. Des « phantoms » ont été préparés pour mimer une injection de cellules en thérapie cellulaire comme précédemment effectué dans l'équipe où les cellules sont directement injectées dans un organe solide^{154,155}. Les MSCs ont été marquées selon les conditions précédemment déterminées et remises en suspension après décollement à la trypine. Elles ont ensuite été diluées à différentes concentrations dans une solution de gélatine (10%). Après gélification, la gouttelette obtenue a été placée entre deux couches de gélatine (Figure V.11). Le volume total de cette gouttelette (20 μ L) correspond au volume injectable dans un organe solide. Des phantoms identiques ont également été réalisés avec différentes quantités de nanoparticules seules afin de comparer l'intensité du signal.

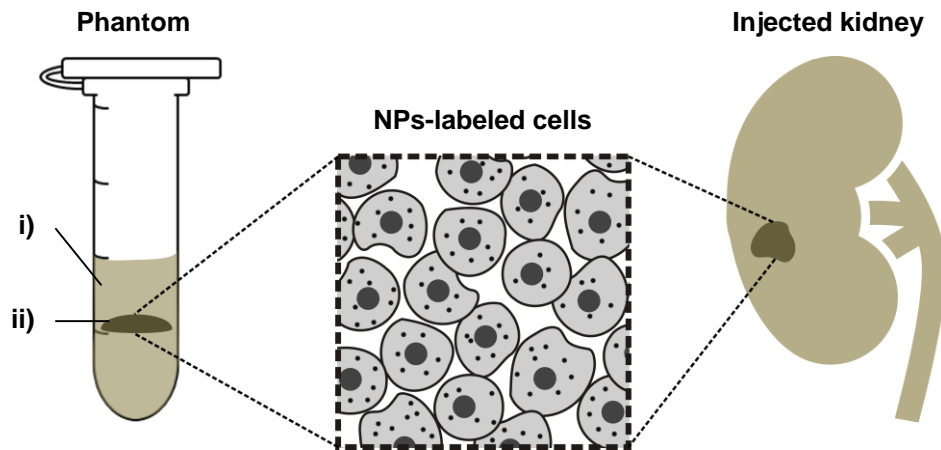


Figure V.11. Schéma de la préparation des « phantoms » mimant une injection des cellules marquées aux NPs dans un organe solide (ici le rein).

Par la suite, les « phantoms » ont été visualisés à l'aide d'un appareil IRM 3 T. La gélatine étant un milieu aqueux neutre, elle apparaît en clair sur les images (hyper-intenses) pondérées T_2 . En revanche, la présence de NPs ou de cellules marquées laisse apparaître une bande sombre (hypo-intense) au centre des « phantoms » (Figure V.12). Comme attendu, les quantités croissantes de NPs et de cellules obscurcissent d'autant plus les clichés obtenus.

Nous avons ainsi été en mesure de détecter des quantités de NPs allant de $2,5 \mu\text{g}$ à $0,5 \text{ mg}$ et des quantités de cellules allant de $2,5 \times 10^4$ à $1,0 \times 10^6$.

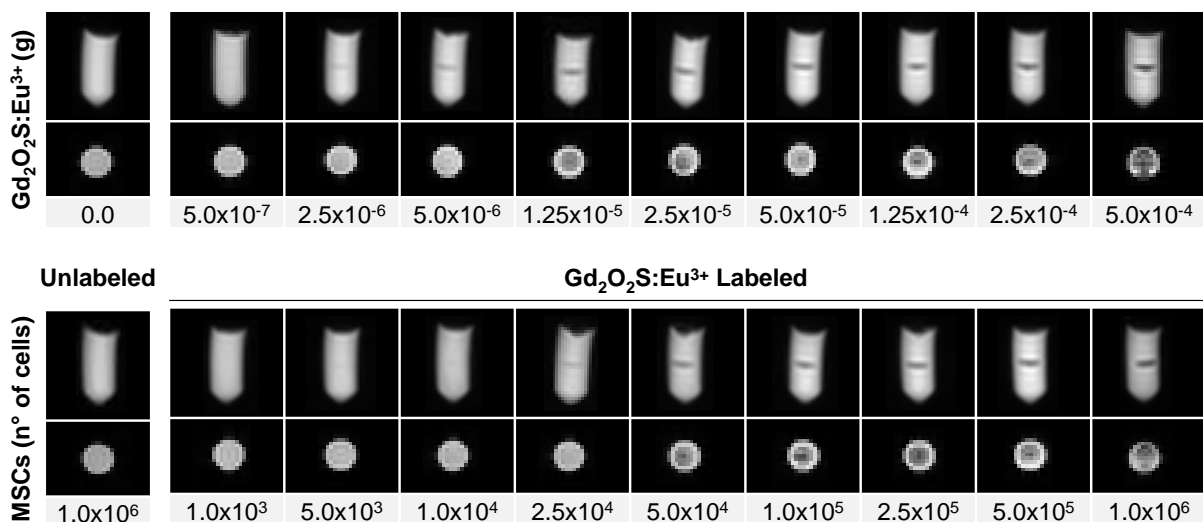


Figure V.12. « Phantoms » visualisés en IRM pondéré T_2 . Images présentant les coupes coronales et transversales de différentes quantités de NPs Gd₂O₂S:Eu³⁺ et de MSCs marquées en suspension dans $20 \mu\text{L}$ de gélatine.

Marquage et suivi cellulaire

En comparaison, les NPs d'oxyde de fer, l'un des ACs IRM les plus populaires pour l'imagerie et le suivi par IRM, ont récemment été utilisés pour la détection *in vivo* de $2,5 \times 10^5$ MSCs^{179,180}. En définitive, les résultats de la première partie de cette étude ont validé nos espérances sur la possibilité de détection des MSCs marquées aux $Gd_2O_2S:Eu^{3+}$ dans l'organisme où classiquement deux à trois millions de cellules sont injectées à chaque point.

C. Suivi des cellules stromales mésenchymateuses *in vivo* : $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$

Nous avons combiné toutes les mises au point précédemment effectuées sur le marquage cellulaire des MSCs et les méthodes d'imagerie pour mettre en place l'objectif final de ces travaux de thèse : le suivi multimodal de MSCs marquées injectées dans un organe solide. Huit rats Lewis femelles ont été inclus dans cette étude de faisabilité et ont été injectés dans le parenchyme rénal (partie fonctionnelle de l'organe, par opposition au tissu conjonctif de soutien) selon le protocole décrit auparavant (III.D.2). Afin de détecter des éventuelles différences d'effets biologiques, nous avons inclus dans cette étude trois contrôles différents : des NPs seules, des MSCs seules et des MSCs traitées aux Quantum Dots (voir II.B.1). Lors des travaux antérieurs de l'équipe sur la thérapie cellulaire cardiaque et rénale, les MSCs ont été marquées aux Quantum dots (Qtracker 655, excitation 405 nm, émission 615/655 nm) avant injection afin de pouvoir les détecter au sein de l'organe en fin de protocole après sacrifice de l'animal^{154,155,181}. Nous avons donc inclus dans ce protocole des animaux traités de façon similaire afin de pouvoir comparer les bénéfices des NPs.

Le déroulement du protocole et le nombre d'animaux injectés avec chaque échantillon est synthétisé en Figure V.13.

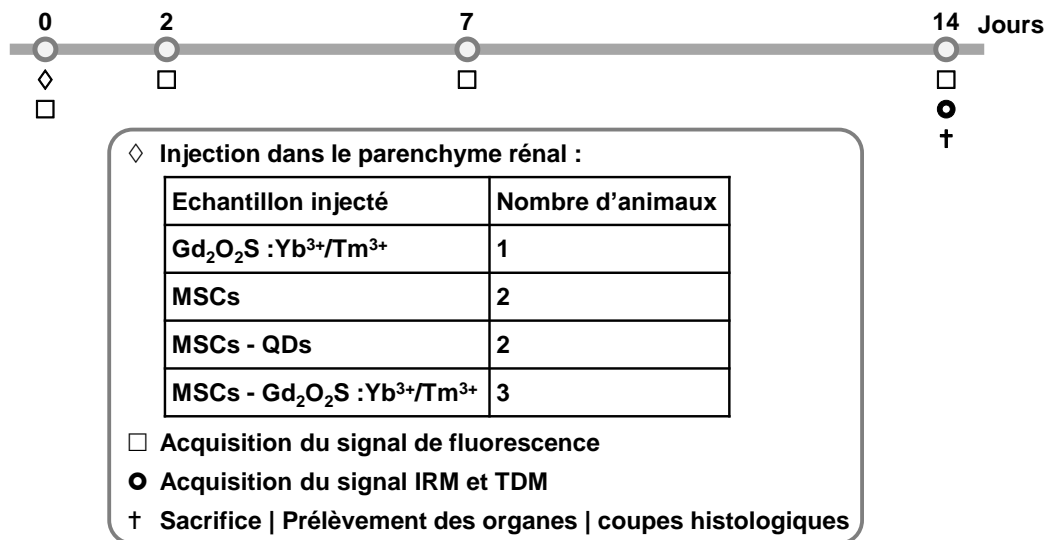


Figure V.13. Chronologie du protocole de suivi des cellules injectées.

1. Suivi des MSCs au cours du temps par fluorescence proche infrarouge

Dans, un premier temps, les MSCs ont été marquées avec les NPs Gd₂O₂S:Yb³⁺/Tm³⁺ de diamètre 143 nm (Figure V.14) de la même manière qu'avec les Gd₂O₂S:Eu³⁺ : les cellules adhérentes ont été traitées à 125 µg/mL (soit avec 3 ng de NPs par cellule) dans des flasques de culture pendant 24h.

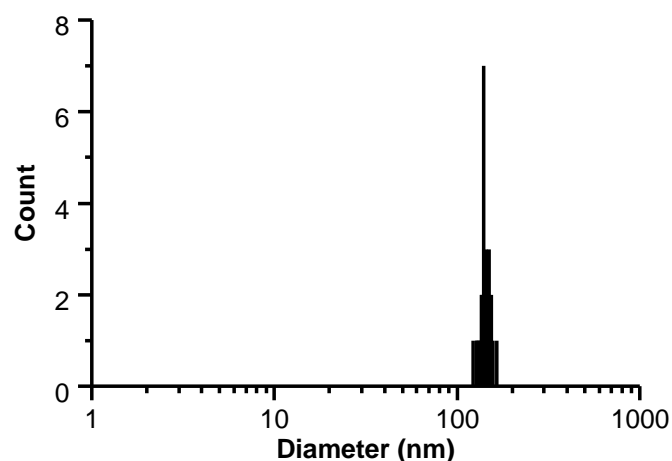


Figure V.14. Diamètres du lot de NPs Gd₂O₂S :Yb³⁺/Tm³⁺ utilisé pour le marquage des MSCs mesurés par microscopie électronique à transmission : 143 nm.

Après rinçage, et décollement à la trypsine, les cellules ont été reprises dans du milieu de culture et comptées avant injection. Pour chacune des conditions (MSCs seules, MSC-QDs et MSCs NPs), deux millions de cellules ont été injectées dans 30 µL de milieu de culture, ce qui

Marquage et suivi cellulaire

correspond à 1 mg de NPs si l'on considère que chaque cellule internalise 0,5 ng en 24 h (voir B.2.a)). Pour le contrôle de NPs seules, 40 μg ont été injectés dans 30 μL ce qui correspond à la quantité utilisée lors des phases de mise au point de l'imageur.

L'efficacité du marquage des différentes cellules a été vérifiée avant injection par microscopie à fluorescence comme présenté ci-dessous (Figure V.15)

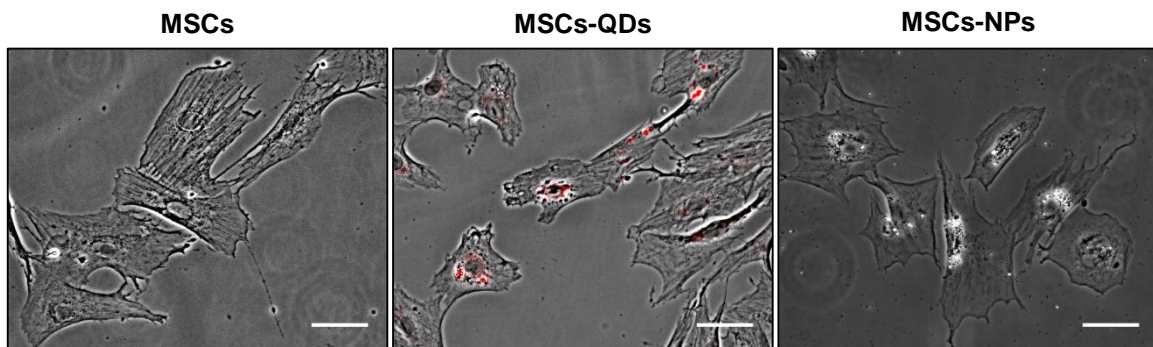
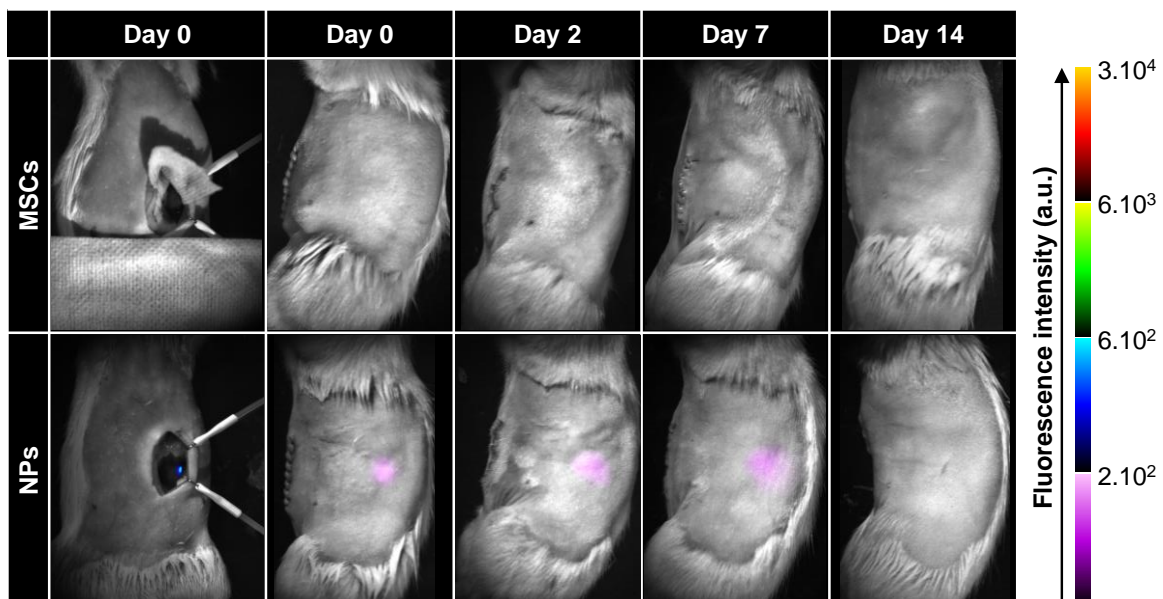


Figure V.15. Cellules en culture avant injection. Images en contraste de phase et fluorescence superposée pour les QDs. La fluorescence des NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ n'est pas visualisable sur un microscope classique non-équipé de source d'excitation proche infrarouge. Toutefois les NPs agglomérées dans le cytoplasme des cellules, apparaissent sous forme de masse brillante en contraste de phase.

Après injection, nous avons donc suivi le signal de fluorescence au cours du temps à l'aide de l'imageur proche infrarouge. Comme présenté en Figure V.16, nous avons été en mesure de détecter sans problème le signal émis par les MSCs marquées aux NPs $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. Cependant, selon la zone d'injection dans le parenchyme rénal, l'évolution du signal de fluorescence a été modifiée.



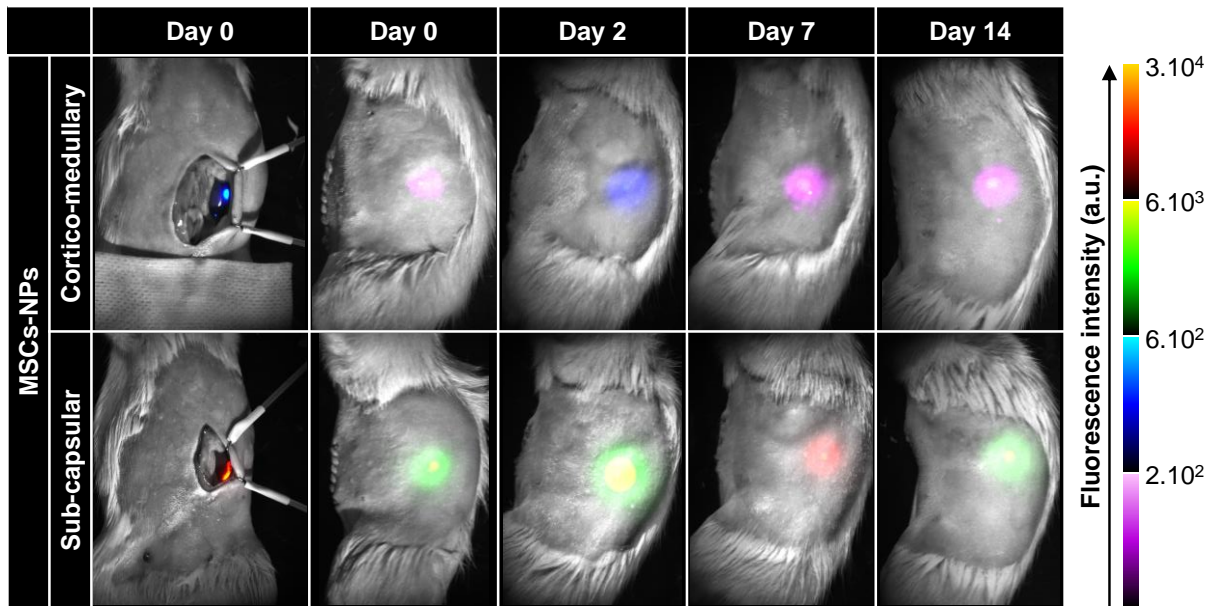


Figure V.16. Suivi du signal de fluorescence après injection dans le parenchyme rénal gauche.

En effet, il est important de prendre en compte que lors de l'injection, selon la profondeur et l'angle de pénétration de la canule, la répartition des échantillons a pu varier comme présenté ci-dessous (Figure V.17). Ainsi, dès l'injection, nous avons pu noter des différences visuelles marquées : l'injection sous-capsulaire a conduit à une répartition homogène et stabilisée sous cette membrane fibreuse alors que l'injection cortico-médullaire a subit une dispersion beaucoup plus marquée au sein du parenchyme observable à l'œil nu. L'intensité de fluorescence s'en est donc trouvée amoindrie. On peut noter une variation de l'intensité du signal au cours du temps en fonction de la position de l'animal par rapport à la source d'excitation laser.

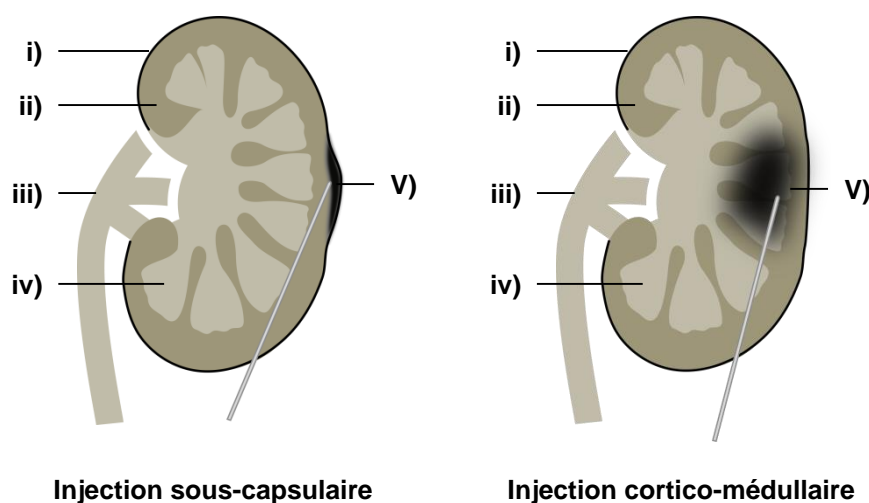


Figure V.17. Différentes zones d'injection dans le parenchyme rénal. i) capsule (enveloppe de l'organe) ; ii) cortex ; iii) arbre vasculaire ; iv) médulla; v) site d'injection des échantillons.

Marquage et suivi cellulaire

Le marquage aux QDs quant à lui n'a bien évidemment produit aucun signal car leur fluorescence n'est pas adaptée à une localisation *in vivo*.

Des acquisitions effectuées sur différentes zones anatomiques ont mis en évidence la présence de fluorescence au niveau du foie (Figure V.18) et de la rate (signal similaire).

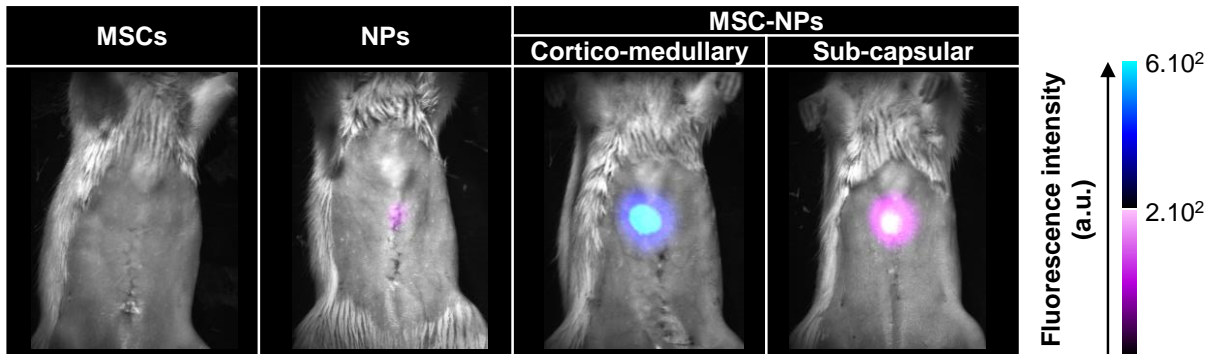
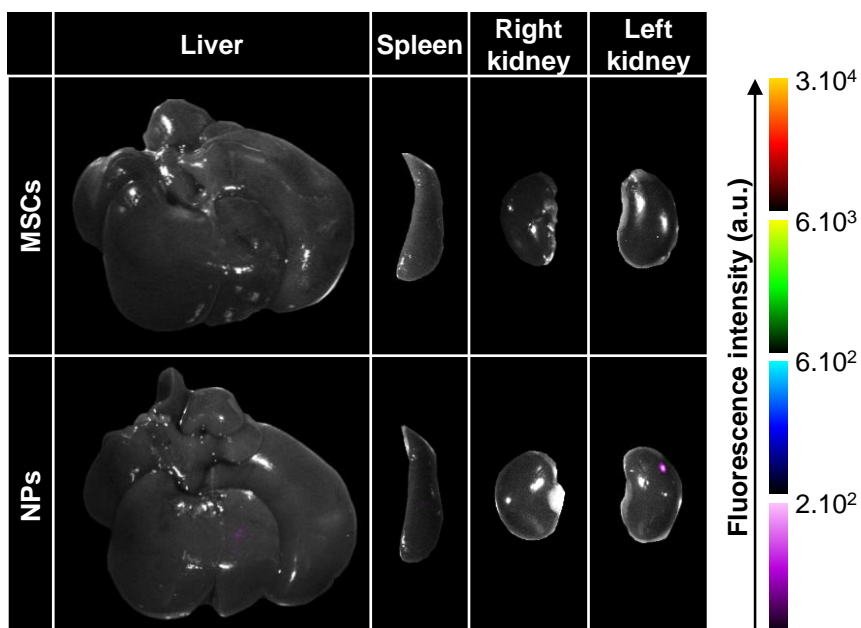


Figure V.18. Signal de fluorescence au niveau du foie 14 jours après injection.

L'examen des organes prélevés après sacrifice des animaux a validé la présence de signal dans ces organes (Figure V.19). De plus, il semble que l'intensité visualisable en surface du foie et de la rate soit d'autant plus importante que le signal au niveau du rein est faible (en comparant l'injection cortico-médullaire et sous-capsulaire), suggérant une migration des NPs à partir de l'organe injecté vers ces deux organes. De la même manière que lors de l'étude de la biodistribution des NPs $Gd_2O_2S : Yb^{3+}/Tm^{3+}$ (voir IV.C), des séries d'acquisitions ont été réalisées en surface du foie et de la rate, révélant une répartition homogène du signal dans la totalité de ces organes.



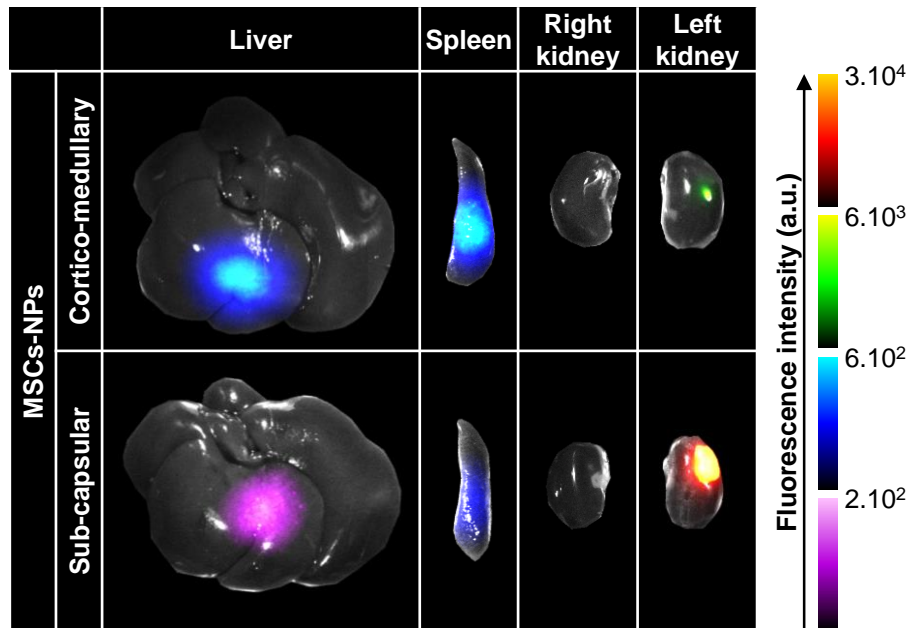


Figure V.19 Signal de fluorescence en surface des organes prélevés 14 jours après injection.

A ce stade, nous ne pouvons affirmer que ce sont les cellules marquées qui ont directement opéré cette migration. D'autant que la mortalité cellulaire en sortie d'aiguille est connue pour être élevée^{182,183}. Il est donc probable que les cellules mortes en sortie de canule aient relargué leur contenu en NPs au site de l'injection. Les NPs libérées ont alors pu suivre plusieurs évolutions. En cas d'effusion hors du parenchyme rénal après injection, les macrophages péritonéaux ont alors probablement effectué la phagocytose des particules et migré en direction du foie. En cas de persistance sur le lieu d'injection, les NPs libres auront pu être drainées par les vaisseaux lymphatiques et/ou reprendre une distribution tissulaire analogue à celle décrite précédemment (IV.C) avec un tropisme préférentiel pour le foie et la rate.

A noter que les NPs seules n'ont pas pu être localisées efficacement sur animaux vivants. Le signal ayant disparu 14 jours après injection, il est probable que ce soit dû à la faible quantité injectée en comparaison aux cellules marquées. Nous n'avons retrouvé qu'un faible signal en surface du foie et de la rate après sacrifice.

2. Imagerie multimodale

Avant leur sacrifice, les animaux ont subi des examens d'imagerie médicale afin de tester la possibilité de localisation multimodale des cellules injectées. Après anesthésie gazeuse, le scan corps entier en tomodensitométrie a permis de localiser clairement les MSCs-NPs

Marquage et suivi cellulaire

injectées en zone sous-capsulaire (Figure V.20). La présence d'un croissant hyper-intense au niveau du rein corrèle parfaitement avec les observations macroscopiques de la zone d'injection ainsi qu'avec les acquisitions de fluorescence. En revanche, aucun autre échantillon (NPs, MSCs-QDs (non adapté à ces longueurs d'onde), autres MSCs-NPs) n'a pu être détecté dans le foie, la rate, le rein ou tout autre organe, probablement dû à la dilution du signal et au manque de sensibilité de cette technique. L'intensité des niveaux de gris est donc équivalente à celle obtenue lors de l'injection de MSCs non marquées comme présenté ci-dessous. Ici les tissus mous apparaissent en gris (hypo-intense), et les tissus denses comme les os en blanc (hyper-intense) au même titre que les NPs.

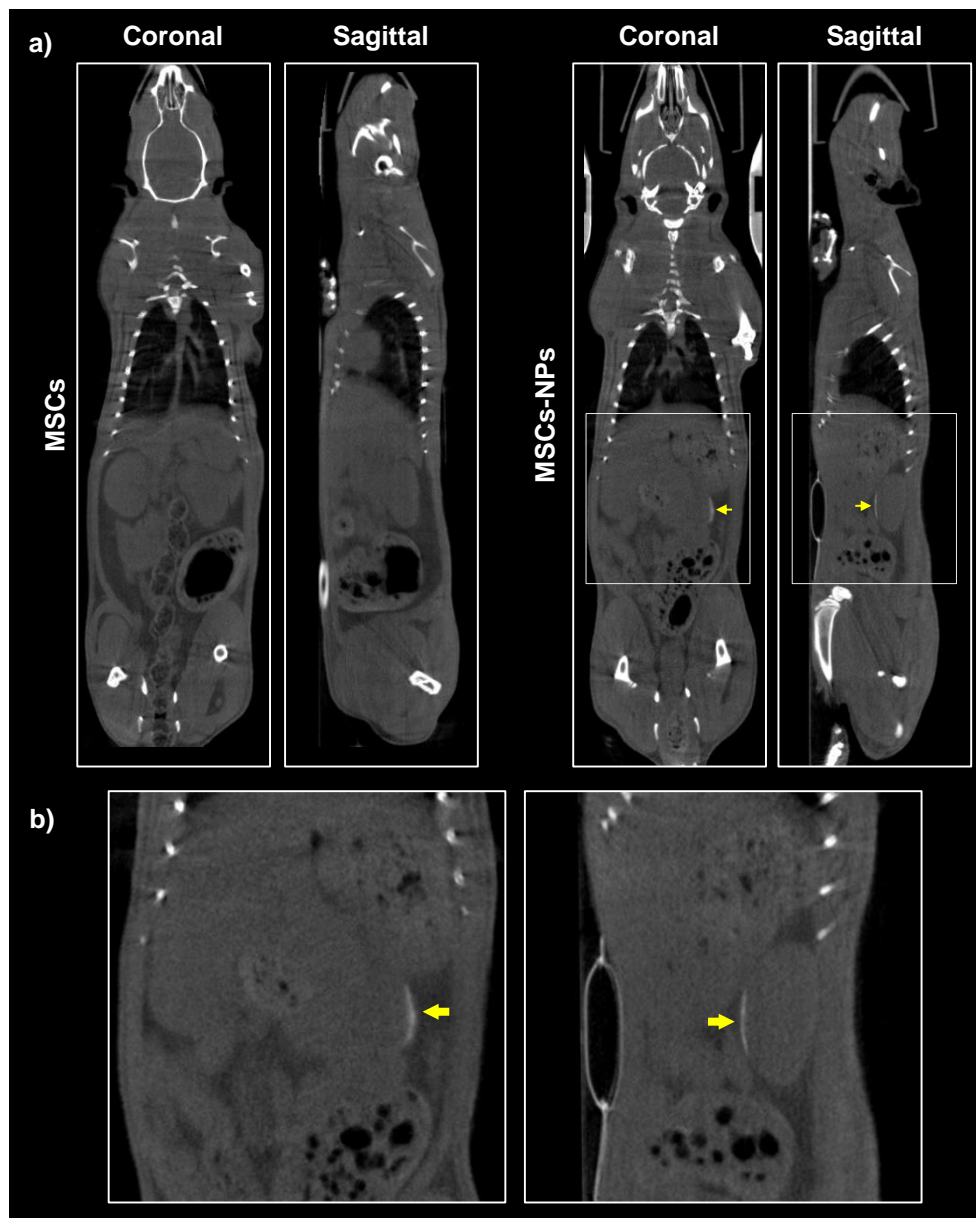


Figure V.20. Visualisation des cellules injectées par tomodensitométrie. Coupes issues de représentations multi-planaires. a) coupes corps entier. b) agrandissement de la zone d'injection des MSC-NPs en zone sous-capsulaire rénale.

Si la technique de tomodensitométrie possède des inconvénients, notamment un manque de sensibilité et un risque de radiations, elle n'est en revanche pas limitée en profondeur de pénétration dans les tissus. Il est ainsi possible d'effectuer une reconstruction en trois dimensions des animaux scannés. Comme présenté en Figure V.21, la zone d'injection sous-capsulaire et la répartition de l'échantillon est bien visible mettant en avant la complémentarité des informations obtenues par fluorescence et l'imagerie par rayons X.

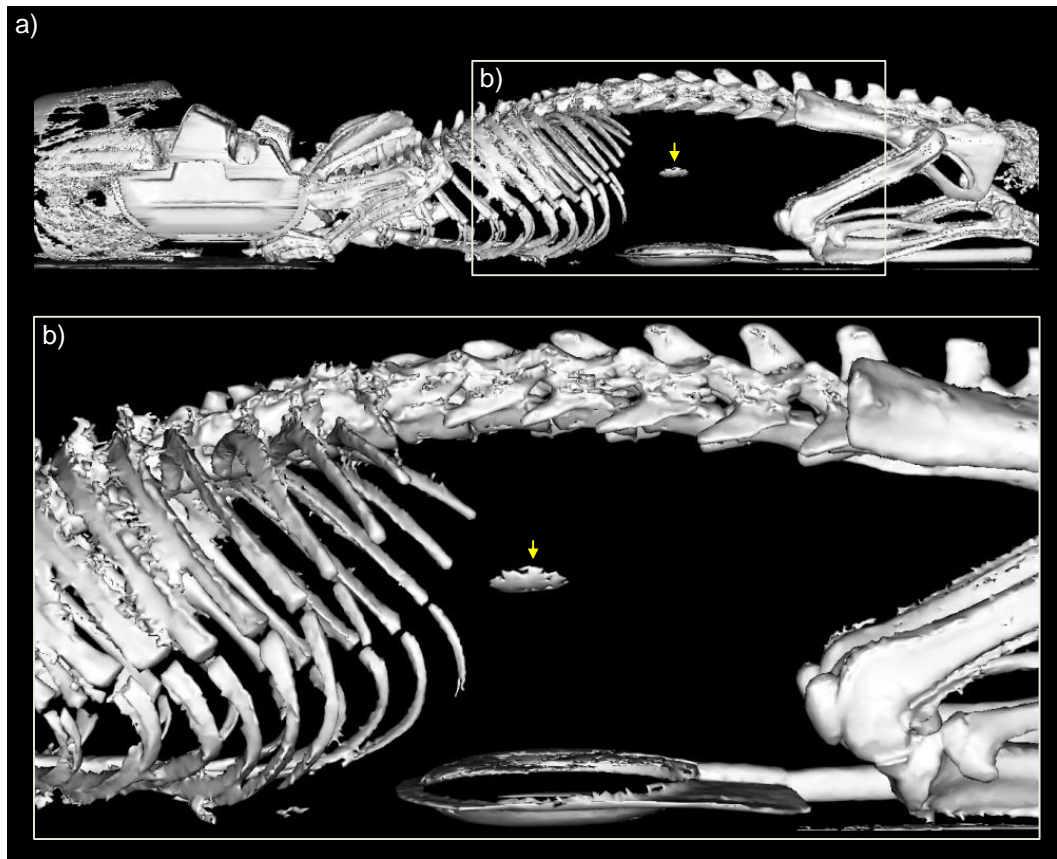


Figure V.21. Reconstruction 3D après acquisition en tomodensitométrie de l'animal injecté en zone sous-capsulaire rénale avec les MSCs-NPs. a) reconstruction corps entier. b) agrandissement de la zone abdominale.

Afin de compléter l'imagerie multimodale, la zone abdominale a été visualisée à l'aide d'un appareil IRM 7 T (dont l'intensité du champ est bien supérieure aux appareils classiquement utilisés en imagerie clinique, alors comprise entre 1,5 et 3 T). De la même façon que pour la tomodensitométrie, nous avons été en mesure de localiser parfaitement l'échantillon injecté dans la zone sous-capsulaire (Figure V.22b). La supériorité de sensibilité de l'appareil nous a également permis de détecter les zones d'injection cortico-médullaire et de visualiser la répartition diffuse (Figure V.22c) ou très concentrée (Figure V.22d) des échantillons. Les MSCs marquées aux QDs n'ont, quant à elles, produits aucune modification locale du contraste.

Dans le cas présent, les tissus mous apparaissent en différents niveaux d'intensité selon leur densité en protons. Les NPs apparaissent en hypo-intensité (plus sombre) du fait de leurs propriétés d'agent de contraste négatif.

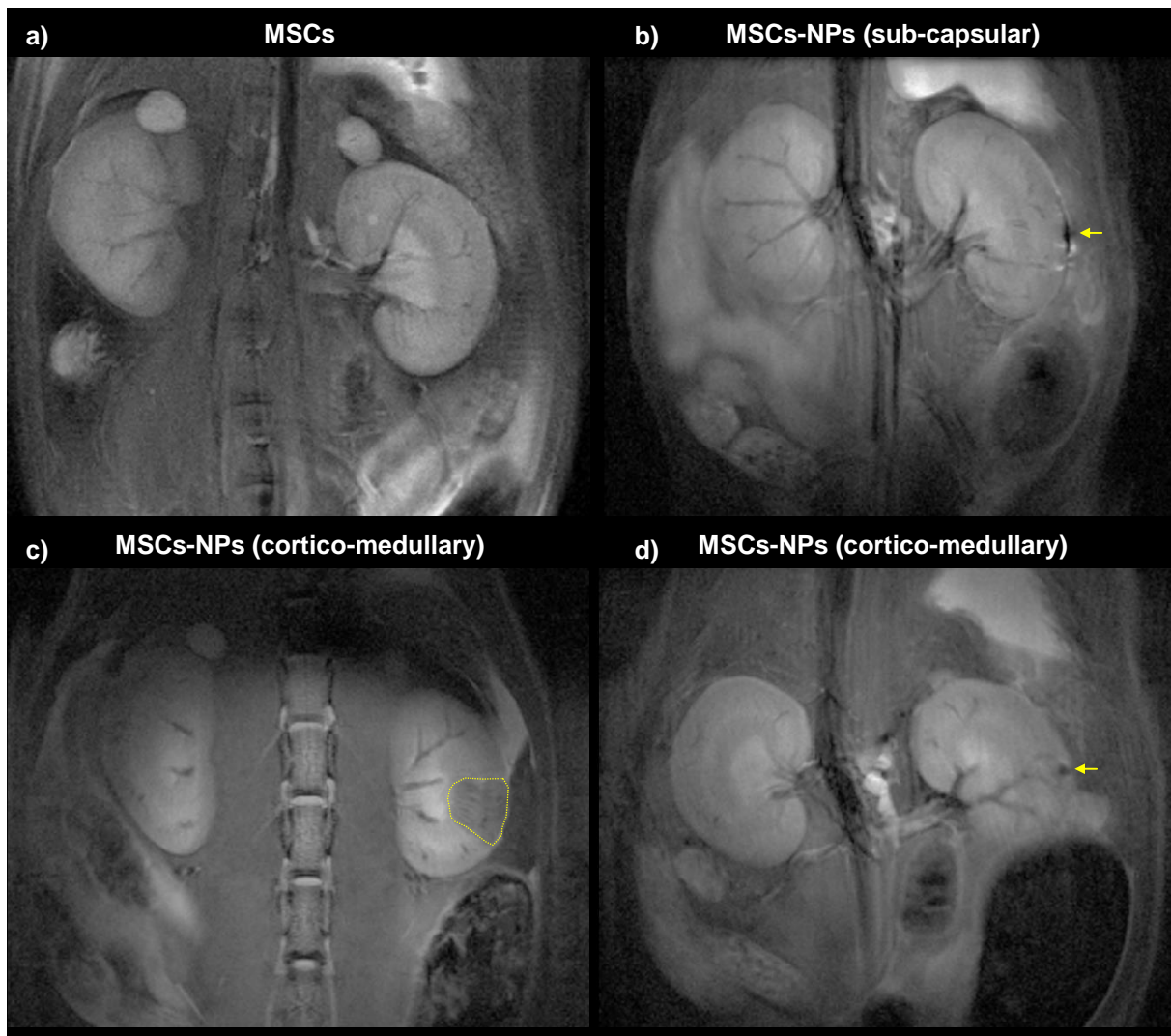


Figure V.22. Visualisation des cellules injectées par IRM pondérée T_2 . Coupes coronales issues d'acquisitions multi-couches. Les cellules sont réparties différemment en fonction de la zone d'injection.

L'analyse des coupes histologiques des organes prélevés nous a permis de vérifier la localisation des échantillons injectés. Comme présenté en Figure V.23, on note une bonne intégration de l'échantillon au sein du parenchyme dont la forme correspond parfaitement aux visualisations en TDM et IRM.

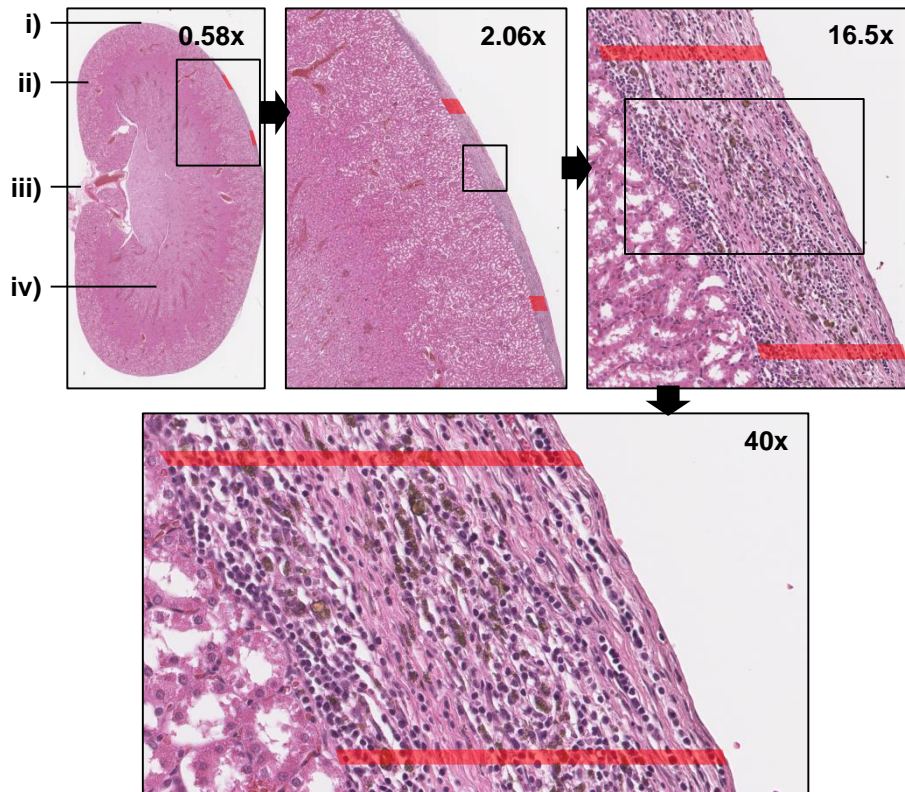


Figure V.23. Coupe histologique du rein gauche injecté dans la zone sous-capsulaire avec des MSC marquées aux NPs $Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$. Coloration hémalum-éosine. i) capsule ; ii) cortex ; iii) arbre vasculaire et uretère ; iv) médulla. Les bandereaux rouges délimitent la zone d'injection. Les agrégats de NPs apparaissent de couleur brune dans la zone d'injection.

Enfin, l'évolution du poids corporel des animaux au cours de l'étude a été suivie (Figure V.24).

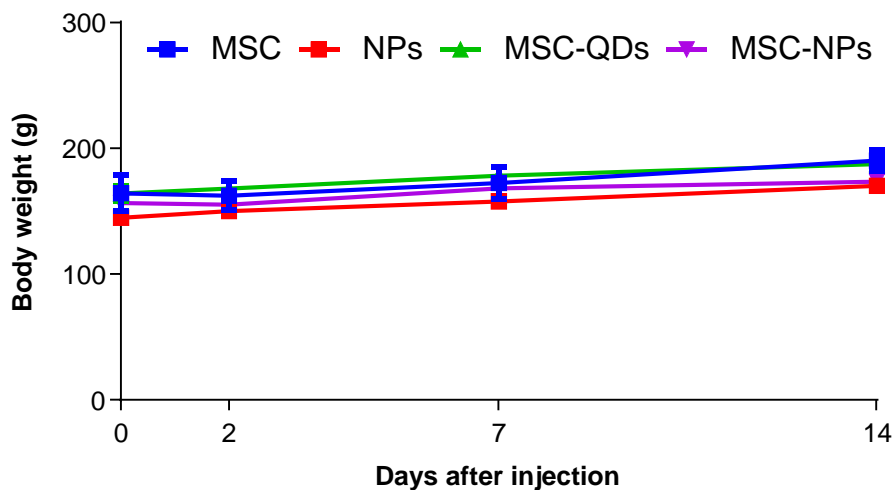


Figure V.24. Evolution des poids corporels au cours de l'étude.

Marquage et suivi cellulaire

Nous n'avons pas observé de différences entre les animaux injectés avec les MSCs seules ou les MSCs marquées (NPs ou QDs), ce qui traduit une bonne tolérance vis-à-vis des traitements.

D. Conclusion

Au cours de cette dernière étude, nous avons démontré, grâce au dopant europium, que les NPs de Gd_2O_2S peuvent être utilisées de façon sûre comme traceur cellulaire multimodal durable. Elles permettent un marquage fiable associé à une perturbation cellulaire minimale lorsque la taille et la concentration sont correctement adaptées (diamètre entre 170-300 nm et concentration maximale de 50 $\mu g/mL$).

Par la suite, nous avons été en mesure de suivre le signal émis par des NPs Gd_2O_2S internalisées dans des MSCs après injection dans le parenchyme rénal grâce au dopant ytterbium/thulium. Nous avons donc apporté la preuve de la faisabilité de suivi des MSCs dans un contexte de thérapie cellulaire par des techniques complémentaires : la fluorescence proche infrarouge nous a permis de détecter de faibles quantités de NPS de manière sensible ainsi que leur répartition dans différents organes. L'IRM et la TDM quant à elles, nous ont permis de localiser anatomiquement les échantillons grâce à leurs excellentes résolutions spatiales. D'autre part, nous avons montré qu'une injection sous-capsulaire se traduisait par une concentration du signal localement et évitait une dilution trop importante avec concentration dans le foie et la rate. Par ailleurs, comme nous l'avions précédemment mis en avant¹⁴⁵, l'utilisation de NPs de Gd_2O_2S est d'autant plus intéressante en IRM à haute intensité de champ (ici 7 T) où la sensibilité est améliorée.

Le bénéfice de l'utilisation de tels marqueurs pour le suivi *in vivo* de cellules injectées est donc remarquable. En comparaison avec les QDs, la tolérance semble similaire et l'imagerie multimodale permet de visualiser les échantillons sans avoir recours au sacrifice des animaux.

Conclusion et perspectives

VI. Conclusion générale

Le développement de traceurs fiables pour l'imagerie biologique permettant le suivi à long terme de cibles réduites à l'échelle de l'organisme reste un défi et une nécessité. En effet, la mise au point de protocoles précliniques nécessite souvent le sacrifice des animaux de laboratoire afin de localiser la cible d'intérêt. Ceci est particulièrement vrai en thérapie cellulaire où les cellules utilisées présentent de possibles propriétés migratoires. Il est donc nécessaire de pouvoir suivre leur devenir en temps réel afin d'apporter la preuve qu'un éventuel effet bénéfique est imputable à leur présence. Mes travaux de thèse se sont donc axés sur l'utilisation de nanoparticules inorganiques à base d'oxysulfure de gadolinium en tant qu'agent de contraste multimodal pour l'imagerie biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses dans un contexte de thérapie cellulaire.

Au cours des différentes études, nous avons apporté la preuve de la possibilité de détecter ces NPs au sein d'organismes ou de cellules par différentes techniques complémentaires : l'IRM et la tomodensitométrie permettant une localisation anatomique grâce à leur excellente résolution et pénétration dans les tissus, la fluorescence permettant quant à elle une quantification du signal émis grâce à sa très bonne sensibilité.

La fluorescence reste l'une des techniques les plus utilisées en recherche biomédicale du fait de sa facilité d'utilisation et de mise en œuvre ainsi que de son coût réduit. De ce fait, nous avons mis au point deux types de dopants au sein de la matrice d'oxysulfure de gadolinium : l'euprimum ($Gd_2O_2S :Eu^{3+}$) plus adapté à un examen *in vitro* et le couple ytterbium/thulium ($Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$) plus adapté à un examen *in vivo* grâce au mécanisme d'up-conversion qui permet une excitation et une émission (majoritaire) dans le proche infrarouge et par conséquent une meilleure pénétration dans les tissus. Afin de visualiser ce nouveau type de NPs ($Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$), nous avons également mis au point un imageur dédié à l'imagerie du petit animal. Ce dernier nous a permis de localiser avec précision et sensibilité les NPs injectées. L'étude de la biodistribution de ces deux types de NPs au sein d'organismes vivants a mis en avant leur caractère d'agent de contraste multimodal détectable à long

Conclusion générale

terme. Nous avons montré que les cibles principales de ces agents une fois injectés dans la circulation sont, comme régulièrement décrit avec d'autres types de matériaux¹⁶⁸ : le foie, la rate et le poumon. Une fois captées et séquestrées dans ces organes, il semble se produire une lente dégradation des NPs du fait de la stabilité des composants inorganiques en milieu biologique.

Nous avons également démontré que les NPs Gd_2O_2S peuvent être utilisées de manière fiable comme marqueur cellulaire polyvalent et bien adapté au suivi de cellules primaires sensibles comme les cellules mésenchymateuses.

L'ensemble de ces travaux a donc permis d'apporter la preuve de concept d'une utilisation possible des NPs d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biomédicale multimodale, le marquage cellulaire polyvalent et le suivi de cellules au sein d'un organisme vivant. Ces résultats ainsi que leur potentiel impact sont synthétisés en Figure VI.1.

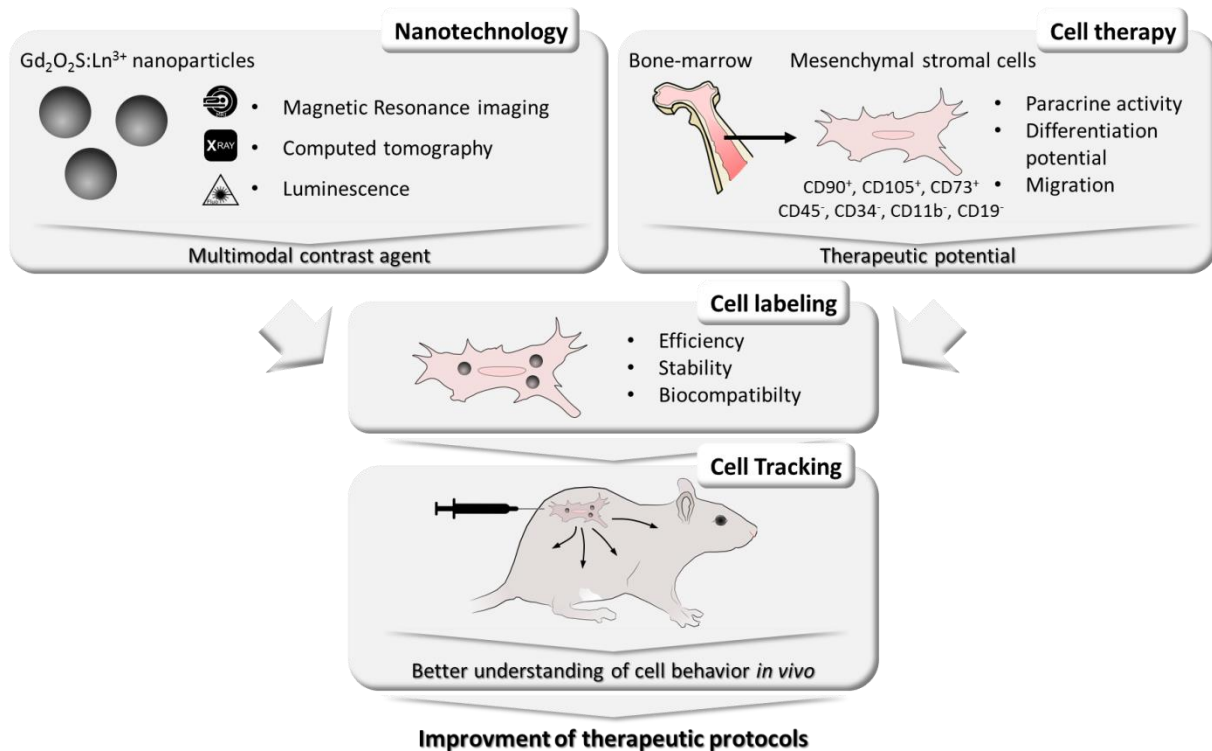


Figure VI.1. Schéma bilan de l'utilisation des nanoparticules d'oxysulfure de gadolinium pour l'imagerie biologique et le suivi cellulaire.

VII. Perspectives

Dans une optique d'utilisation à large échelle des NPs d'oxysulfure de gadolinium en imagerie biomédicale, un certain nombre d'améliorations sont à envisager.

A. Améliorations du système d'imagerie proche infrarouge

Comme nous l'avons démontré, le système d'imagerie développé par nos soins permet de détecter les NPs *in vivo* mais la configuration actuelle ne renseigne pas sur la profondeur du signal. En effet, comme présenté en Figure VII.1, selon la localisation anatomique de la cible, le signal capté en surface pourra être plus ou moins étendu à cause de la diffusion des photons dans les tissus.

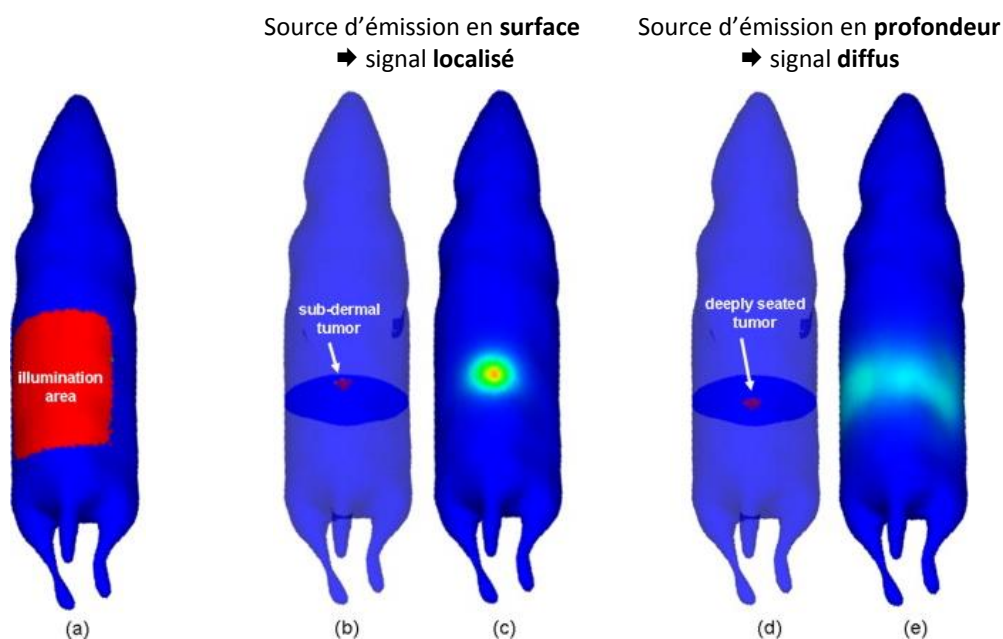


Figure VII.1. Impact de la diffusion des photons en imagerie de fluorescence. Modèles numériques de souris présentant une tumeur sphérique localisée dans l'abdomen proche de la surface (b) et proche du centre axial de l'animal (d) visualisées par imagerie de fluorescence à large faisceau d'excitation (a). Les signaux sortants correspondants détectés en surface de la peau sont présentés en (c) et (e). D'après Leblond et collaborateurs¹⁸⁴.

Pour pallier cette limitation, nous avons prévu d'équiper le système d'un « pinhole » qui, comme en microscopie confocale, permet d'éliminer les faisceaux incidents se trouvant en dehors du plan focal. Seuls les faisceaux du plan observé seront alors captés, ce qui permettra de mettre en évidence la profondeur de la cible. D'importantes améliorations pourront également être apportées sur la source d'excitation. En effet, l'utilisation de laser a

forte puissance et le filtrage imparfait de longueur d'ondes parasites conduit à la formation de bruit de fond et à la perte de sensibilité de la méthode. L'implémentation d'un mode d'excitation en temps retardé via l'utilisation d'un hacheur optique (chopper), par exemple, permettra de découpler l'excitation et l'acquisition du signal et ainsi améliorera grandement le contraste en supprimant l'excitation laser rétrodiffusée¹⁸⁵

B. Améliorations de la tolérance des NPs

Au cours de l'étude de la biodistribution des NPs, nous avons mis en avant une rapide captation par le foie, la rate et le poumon. La dégradation très lente qui s'ensuit permet certes un marquage à très long terme mais pourrait également avoir des conséquences néfastes sur une exposition plus longue que celle que nous avons mesurée ici.

Si cette persistance est un atout indéniable pour réaliser l'étude de mécanismes à long terme, notamment en recherche préclinique, la translation pour une utilisation chez l'Homme pourra se heurter à des aspects réglementaires. Dans les futures études, il serait donc intéressant de tester des stratégies de réduction du temps de transit de ces NPs dans l'organisme. Pour une utilisation en diagnostic par exemple, la diminution du diamètre des NPs par adaptation ou modification du protocole de synthèse permettrait une élimination plus rapide et donc limiterait les risques associés à une trop longue exposition. Afin de conserver leur avantage de suivi à long terme, un compromis devra cependant être trouvé car un diamètre inférieur à 8 nm conduirait à une clairance rénale rapide après examen clinique¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Nous pouvons donc proposer un diamètre de quelques dizaines de nanomètres (30 à 60) pour l'optimum permettant un marquage de plusieurs semaines avec une élimination hépatobiliaire complète en quelques mois.

C. Améliorations du marquage cellulaire

L'utilisation des NPs en tant que traceur cellulaire est une application prometteuse, cependant, des améliorations sont envisageables notamment par revêtement de surface. Des résultats préliminaires obtenus au cours de ces travaux (résultats non montrés) ont mis en évidence qu'un revêtement à la transferrine (protéine endogène de transport du fer) permettait de réduire drastiquement le temps de marquage des cellules de 24h à 2h, ce qui

facilite grandement l'utilisation des NPs et est un apport non négligeable lors de la mise en place de protocoles précliniques et cliniques.

D. Améliorations du suivi des cellules injectées

L'injection directe de cellules dans un organe solide conduit bien souvent à une mort cellulaire importante^{182,183}. Cela est notamment dû aux forces de cisaillement induites lors du passage dans l'aiguille et à l'arrivée des cellules dans un environnement « inconnu ». De fait, le suivi des cellules n'est plus possible. Différentes stratégies sont donc concevables. D'une part, il a été montré que l'utilisation de gels comme véhicule des cellules lors de l'injection permettait de réduire ces forces de cisaillement et d'améliorer la viabilité¹⁸² ainsi que d'éviter la fuite des cellules après injection¹⁸⁶. D'autre part, l'utilisation de « patchs » biocompatibles peuplés par les cellules apparaît comme une amélioration non négligeable des protocoles de greffes cellulaires en thérapie cellulaire et neutralise la nécessité de recourir à une injection classique¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. La faisabilité d'un tel protocole a récemment été démontré par le suivi in vivo de MSCs marquées avec des NPs à up-conversion après ensemencement dans un hydrogel et injection sous-cutanée chez la souris nude¹⁹⁰. A l'avenir, nous envisageons donc d'expérimenter ces stratégies pour améliorer la viabilité des cellules greffées et de véritablement suivre leur devenir dans un protocole préclinique de thérapie cellulaire régénératrice rénale ou cardiaque. Ceci permettrait d'apporter la preuve qu'une amélioration de la pathologie est bien imputable à la présence des cellules. A terme, cela permettrait de soutenir voire améliorer les essais cliniques initiés par l'équipe^{191,192}.

E. Applications biomédicales

A l'avenir, nous pouvons envisager des applications très générales de ces nouveaux agents de contrastes comme par exemple une utilisation en théranostic (combinaison de diagnostic et de thérapie) avec localisation anatomique par IRM ou TDM de zones tumorales marquées par les NPs (préalablement modifiées avec un agent de ciblage cellulaire) suivi d'une chirurgie guidée par fluorescence pour exérèse précise de la tumeur¹⁹³.

VIII. Valorisation des travaux

A. Publications scientifiques

- Multimodal Gadolinium Oxysulfide Nanoparticles: a Versatile Contrast Agent for Mesenchymal Stem Cell Labeling.

Julien Santelli, Séverine Lechevallier, Houda Baaziz, Marine Vincent, Cyril Martinez, Robert Mauricot, Angelo Parini, Marc Verelst, Daniel Cussac. En cours de soumission chez Nanoscale.

- New near-infrared $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ Nanophosphors for Bioimaging.

Julien Santelli, Carole Lepoix, Séverine Lechevallier, Cyril Martinez, Daniel Cussac, Denis Calise, Sebastien Moyano, Marc Verelst, Robert Mauricot. En cours de rédaction.

- In vivo tracking of mesenchymal stromal cells with upconverting multimodal $Gd_2O_2S:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ nanoparticles.

Julien Santelli, Séverine Lechevallier, Denis Calise, Dimitri Marsal, Aurore siegfried, Marine Vincent, Cyril Martinez, Robert Mauricot, Angelo Parini, Marc Verelst, Daniel Cussac. En cours de rédaction.

B. Brevets

- Particule d'embolisation comprenant des nanoparticules.

Marc Verelst, Séverine Lechevallier, Robert Mauricot, Julien Santelli, Robin Garcia, Boris Guiu. Brevet d'invention FR 17/59229, CHROMALYS / CNRS / UNIVERSITE PAUL SABATIER.

C. Communications orales

- Multimodal nanoparticles and mesenchymal stem cell tracking. Colloque Nanohybrides 12. Bastia, France. Mai 2015.
- Elaboration of a new in vivo imaging system based on multimodal upconversion nanoparticles. Colloque Nanohybrides 13. Porquerolles, France. Mai 2016.

Valorisation des travaux

- Elaboration of a new in vivo imaging system based on multimodal upconversion nanoparticles. International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology – ICONAN. Paris, France. Septembre 2016.

Annexes

IX. Techniques de caractérisation

A. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet d'identifier la nature des phases présentes dans un matériau et d'obtenir des informations sur sa structure cristalline. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques présentant des longueurs d'onde proches des distances interatomiques des solides que l'on désire analyser. Ainsi, lorsqu'un faisceau de rayons X est envoyé sur un cristal, il y a diffraction par les atomes du réseau et on obtient un diagramme de diffraction présentant des pics, renseignant sur la nature de l'échantillon. A l'aide de la loi de Bragg, donnant les conditions d'interférence constructives, il est alors possible d'interpréter chaque pic du DRX.

$$\text{Loi de Bragg : } 2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

Où : d_{hkl} est la distance entre 2 plans cristallins d'indice h, k et l ; θ est l'angle que fait le faisceau incident avec les plans (hkl) ; λ est la longueur d'onde du faisceau incident et n est un entier relatif, correspondant à l'ordre de la diffraction.

Le diffractogramme de rayons X correspond ainsi à l'intensité du rayonnement diffracté en fonction de la position du détecteur. A partir de la position des pics, il est alors possible de remonter aux différents d_{hkl} d'un cristal et ainsi de connaître la structure cristalline.

Les diagrammes de diffraction ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 advance, en configuration de Bragg-Brentano ($\theta - 2\theta$), travaillant avec la radiation $K\alpha$ du cuivre ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$). Les échantillons ont été préparés en déposant une fine couche de poudre sur un porte-échantillon en plastique de 1 cm^2 spécialement usiné à cette fin.

B. Spectrophotométrie

Cette technique est utilisée pour déterminer les spectres de luminescence d'excitation et d'émission des particules. L'appareil autorise des mesures sur des échantillons solides, déposés sous forme de poudre dans des portes échantillons spécialement usinés à cet effet,

ou sur des échantillons liquides, dans des cuves en quartz. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Horiba Fluorolog FL3-22, équipé d'un photomultiplicateur Hamamatsu R928. L'excitation est réalisée par une lampe Xe 450 W pour le dopant europium et par un laser 980 nm pour le couple ytterbium/thulium. Les bandes spectrales sont sélectionnées par des monochromateurs comportant chacun un jeu de deux fentes motorisées dont l'ouverture peut être sélectionnée de manière continument variable entre 0 et 7 mm. Le Fluorolog-3 comporte également un détecteur de référence (une photodiode) qui reçoit une fraction de la lumière incidente et permet la normalisation du signal de fluorescence par rapport à l'intensité d'excitation reçue. Cette référence est très utile pour corriger les spectres d'excitation des fluctuations de radiance de la lampe en fonction des longueurs d'ondes. Les spectres de luminescences ont été acquis sur poudres sèches après synthèse.

C. Microscopie électronique

La microscopie électronique consiste en l'utilisation d'électrons à la place de photons (utilisés en microscopie optique classique). Ceux-ci ayant une longueur d'onde bien plus courte que les photons, la résolution est bien meilleure. L'excitation d'une source (filament de tungstène ou crystal LaB₆) à l'aide de haut champ électrique permet de produire des électrons et de les expulser dans une colonne maintenue sous vide. La focalisation du faisceau d'électrons produits se fait à l'aide de lentilles électromagnétiques (condensateurs). En cas d'observation d'échantillon biologiques, ceux-ci doivent être fixés et métallisés avant introduction dans le microscope.

1. Microscopie électronique à transmission

Le faisceau d'électrons traversant l'échantillon, celui-ci doit être relativement mince.

La taille moyenne et la morphologie des NPs ont été mesurées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Philips CM20 Feg) fonctionnant à 200 kV. La préparation des échantillons consiste à déposer une goutte de suspension de NPs dans l'éthanol sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Le diamètre moyen des différents lots de NPs a été déterminé par analyse d'au moins 100 NPs différentes par échantillon (Voir XI.A).

2. Microscopie électronique à balayage

Cette méthode permet d'étudier la surface des échantillons car l'image est formée à partir des électrons réfléchis et non transmis.

La morphologie des NPs a été étudiée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Zeiss 1540 XB) fonctionnant à 20 kV. La préparation des échantillons consiste à déposer une quantité uniforme de NPs sur un scotch carbone double face.

D. Spectrométrie à plasma induit

Les techniques analytiques à plasma induit (inductively coupled plasma, ICP) sont parmi les plus avancées pour la détection de traces et d'ultratraces d'éléments chimiques au sein d'un échantillon. Les échantillons solides subissent une étape de minéralisation acide (généralement digestion dans l'acide nitrique) pour détruire la matrice afin de libérer les éléments et les mettre en solution sous forme ionique. Ils sont ensuite vaporisés au cœur d'un plasma induit d'argon pouvant atteindre des températures de 8000°C suffisantes pour exciter les éléments présents. La détection des éléments au-delà de la torche plasma peut se faire par deux techniques à sensibilité différentes :

1. Spectrométrie à Emission Optique couplée à l'ICP (ICP-OES)

L'ICP-OES repose sur l'excitation thermique des ions dans le plasma et l'analyse de la lumière émise par ces ions excités. Chaque élément émet des longueurs d'onde caractéristiques. Les longueurs d'onde sont alors séparées, identifiées et leurs intensités mesurées par un spectromètre. La concentration élémentaire est ensuite déterminée par confrontation à une calibration externe. Cette technique permet une détection de l'ordre du ppb (partie par milliard soit 10^{-9} , équivalent à 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$).

2. Spectrométrie de Masse couplée à l'ICP (ICP-MS)

L'ICP-MS repose quant à elle sur la séparation des ions générés par le plasma d'argon en fonction de leur rapport masse sur charge m/z . Les ions ainsi séparés sont alors identifiés et comptabilisés, ce qui permet un calcul des concentrations élémentaires présentes dans le matériau par l'intermédiaire d'une calibration externe. Cette technique permet une détection de l'ordre du ppt (partie par billion soit 10^{-12} , équivalent à 1 ng/Kg) pour un large éventail d'éléments.

X. Procédures expérimentales

A. Réactifs

Réactifs	Fournisseur
Précurseurs nitrates 99,99% (europium, thulium).	Rhodia
Précurseur nitrate ytterbium 99,99%.	Alfa aesar
Précurseur nitrate gadolinium 99,99%.	Strem
Urée ; Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT); 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (rouge neutre) ; pénicilline/streptomycine ; Insuline ; Dexamethasone; Methylisobutylxanthine; Indomethacine; Acide Ascorbique (Ascorbate-2-phosphate) ; Proline ; ITS+ ; Glycérol phosphate ; Acide nitrique ; peroxyde d'hydrogène, acide nitrique, peroxyde d'hydrogène, triton X 100, éthanol.	Sigma-Aldrich
Standard ICP Gadolinium	SCP science
LysoTracker® Red DND-99 (LysoTracker) ; 5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFSE).	Molecular probes
Milieu MEM α , DMEM; DMEM high glucose; M199.	Gibco
Sérum de veau foetal.	PAA
Pyruvate.	Fluka
Recombinant Bone morphogenic protein-2 (BMP2); Transforming growth factor β 3(TGF- β 3).	Peprotech

B. Préparation des nanoparticules

1. Synthèse des carbonates de gadolinium

Les NPs luminescentes de $\text{Gd}(\text{OH})\text{CO}_3 \cdot \text{Ln}$ ($\text{Ln}=\text{Eu}^{3+}$ ou $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) ont été synthétisées à partir des précurseurs nitrates en milieu aqueux comme décrit au paragraphe III.B. Nous avons sélectionné les conditions de synthèse par co-précipitation les mieux appropriées pour l'obtention de particules sphériques monodisperses en taille. Les concentrations utilisées sont : $5,6 \cdot 10^{-3}$ M pour les précurseurs de lanthanides (gadolinium et europium ou

Procédures expérimentales

ytterbium/thulium) avec un rapport Gd/Eu = 0,95/0,05 ou Gd/Yb/Tm = 0,959/0,04/0,001 et 0,5 M en urée. Une synthèse typique est réalisée pour 4 L de solvants, ce qui correspond aux quantités suivantes :

Gd(OH)CO₃ :Eu³⁺	Gd(OH)CO₃ :Yb³⁺/Tm³⁺
120 g d'urée	120 g d'urée
800 mL d'éthanol	800 mL d'éthanol
3,2 L d'eau distillée	3,2 L d'eau distillée
9,6 g de Gd(NO ₃) ₃ .6H ₂ O	9,6949 g de Gd(NO ₃) ₃ .6H ₂ O
694 µL de Eu(NO ₃) ₃ (OT=284 g/L)	418,6 mg de Yb(NO ₃) ₃ .6H ₂ O
	21,6 µL de Tm(NO ₃) ₃ (OT=200 g/L)

2. PEGylation pour injection in vivo

Les solutions injectables de NPs PEGylées ont été préparées comme suit : 189 mg de NPs broyées finement ont été mélangés avec 600 mg de polyéthylène glycol (PEG) de 3000 g/mol dans 20 mL d'eau distillée. Après 1 h de dispersion par ultrasons, la solution a été placée sous agitation à 50°C pendant 24 h puis soniquée à nouveau pendant 1 h. Pour finir, la solution a été centrifugée à 600 g pendant 5 min et le surnageant contenant les NPs non agrégées a été conservé. La suspension finale présente un rapport $[Gd]/[PEG] = 5^{145}$. La suspension a ensuite été concentrée à l'évaporateur rotatif en prenant garde de ne pas évaporer trop d'eau pour ne pas déstabiliser la suspension. Afin de déterminer précisément la concentration en NPs de cette suspension, 1 mL a été prélevé et centrifugé 10 min à 13000 g afin de précipiter les NPs. Le surnageant a ensuite été éliminé et remplacé par 1 ml d'une solution d'acide nitrique 4% afin de dissoudre les NPs et de solubiliser les ions gadolinium qui ont alors été dosés par ICP-OES. Une fois la concentration en NPs dans la suspension déterminée, cette dernière a été diluée avec une solution de glucose stérile concentrée à 70% pour obtenir la concentration finale en NPs désirée supplémentée à 5 % en glucose. La solution obtenue a été utilisée dans les deux jours après préparation. Cette procédure prévient la formation d'agrégats, empêchant les problèmes d'embolisation dans la circulation sanguine et améliorant le temps de circulation.

C. Système d'imagerie proche infrarouge personnalisé

L'imagerie proche infrarouge a été conduite à l'aide d'un système d'imagerie personnalisé comprenant

- Excitation : diode laser 980 nm (MDL-N-980/6000~1000mW) couplé à une fibre optique, un filtre laser clean up (LD01-975/10, Semrock) (Figure X.1a) et un élargisseur de faisceau (BE05M-B, Thorlabs) en sortie de fibre optique. La largeur du faisceau est estimée à 2,8 cm de diamètre.
- Acquisition : une caméra CCD à bas bruit (Andor iKon-M 934) refroidie par effet Peltier à -80°C présentant une efficacité quantique maximale de 95% à 800nm et une haute résolution de 1024 par 1024 pixels. Devant le capteur est monté un objectif de longueur focale 35 mm (LM35XC), deux filtres bandpass (FF01-842/SP25, Semrock), un filtre short pass blocking edge (FF01-890/SP25 Semrock) et un miroir dichroïque (DMSP950R, Thorlabs) (Figure X.1b). Ces filtres ont été placés devant la lentille pour couper la lumière réfléchiée en provenance de la source d'excitation et laisser passer la lumière visible.

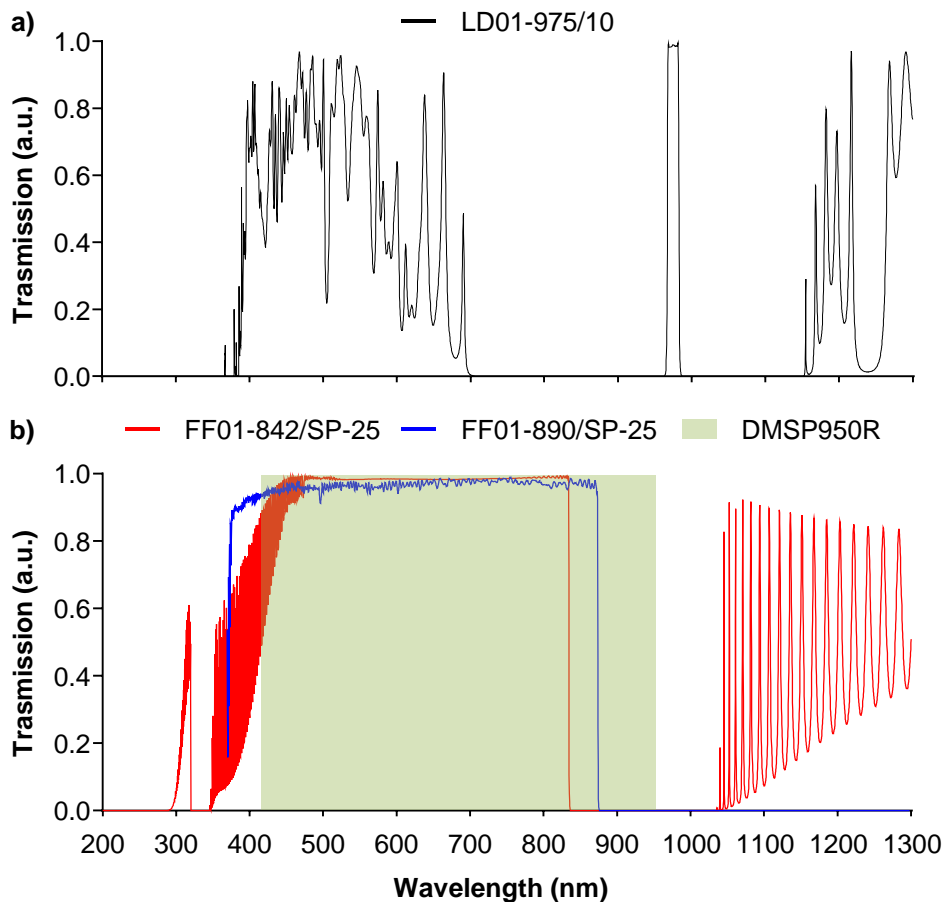


Figure X.1. Spectres de transmission des filtres utilisés pour le système d'imagerie personnalisé. a) filtre du laser. b) filtres du système d'acquisition.

La mesure de la puissance délivrée par le laser en surface des échantillons a été mesurée à l'aide d'un puissance-mètre PM130D (Thorlabs) et d'un capteur de diamètre 93 mm. Les mesures correspondantes aux puissances utilisées en surface de la peau et des organes sont présentées en Figure X.2. La répartition de l'intensité est sous forme de gaussienne à partir du centre de la zone d'impact du laser.

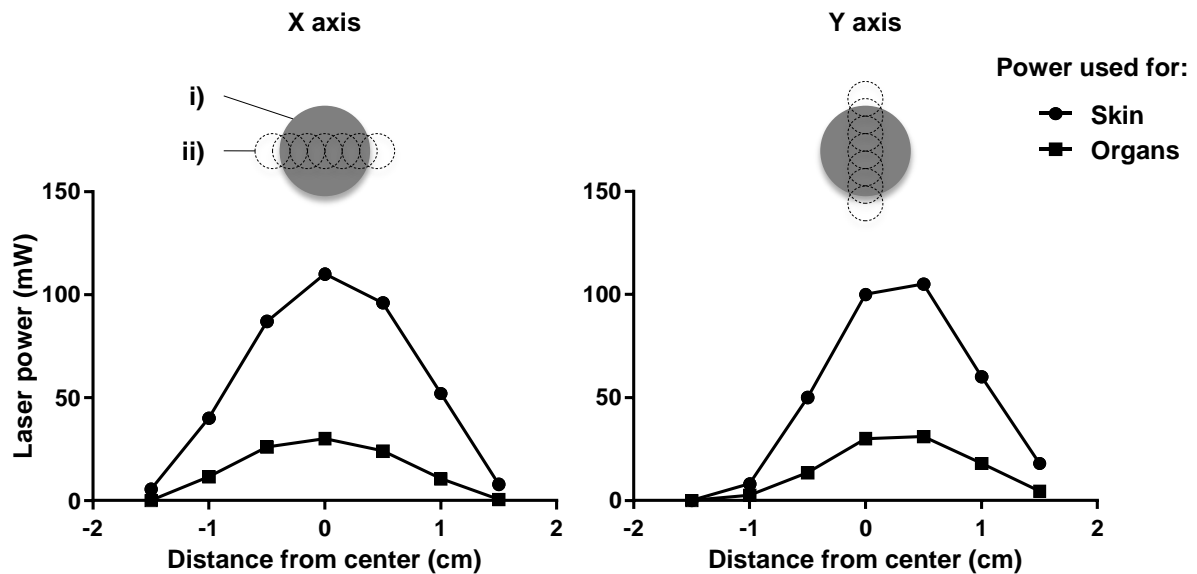


Figure X.2. Mesures de puissance laser délivrées en surface des échantillons selon les axes X et Y de la zone d'impact du laser. i) zone d'impact du laser. ii) zone de mesure du puissance-mètre.

Toutes les acquisitions ont été réalisées avec une exposition laser et un temps de pose de 20 secondes. Les animaux ont été rasés avant imagerie pour éviter la diffusion du laser le long du pelage.

D. Représentation visuelle des clichés d'imagerie proche infrarouge

Dans le but de présenter les clichés obtenus en imagerie proche infrarouge de manière à refléter la véritable intensité du signal obtenu sans sacrifier la sensibilité de la technique, une méthode dédiée a été mise au point. En effet, les représentations visuelles en fausses couleurs existantes (avec ImageJ notamment) sont trop restreintes pour prendre en compte à la fois les très faibles et les très fortes intensités. Ainsi, nous avons créé un système de représentation plus vaste basé sur des paliers d'intensité du signal. En fonction de la moyenne d'intensité du signal mesuré, un code couleur sera attribué représentant des valeurs de luminosités croissantes (voir Figure X.3).



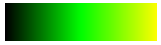

Moyenne d'intensité mesurée (niveau de gris)	≤ 100	>100 ≤ 450	< 450 ≤ 2000	> 2000
Valeurs de luminosités représentées (unité arbitraire)	0 - 200	0 - 600	0 - 6000	0 - 30000
Code couleur correspondant				

Figure X.3. Représentation visuelle en fausses couleurs de l'intensité de fluorescence.

E. Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été conduites en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne (86/609/EEC) pour la protection des animaux d'expérimentation et ont été approuvées par un comité d'éthique local. Les expériences concernant l'utilisation de l'imageur proche infrarouge sont enregistrées sous le numéro de protocole 2016012817403531. Au cours de ces travaux, les souris C57BL/6J mâles de 6 semaines (Janvier Labs), les lapins mâles et femelles cri:KBL(NZW) de douze semaines (Charles River laboratories) et les rats lewis mâles et femelles de sept semaines (Janvier Labs) ont été hébergés dans des chambres sous air conditionné avec un cycle jour/nuit de 12 h en environnement contrôlé à une température de 22 ± 2 °C et une humidité relative de 45%. Les animaux ont occupé des cages standardisées avec accès à l'eau et la nourriture *ad libitum*.

Les anesthésies gazeuses ont été induites dans une boîte à induction par un mélange d'O₂ et d'isoflurane à 3% puis maintenue par la suite à 1-2% au masque. 0,33 mL/Kg d'analgésique (Buprenorphine, Buprecare, 0,3 mg/mL) ont été injectés avant toute intervention chirurgicale. Les euthanasies ont été réalisées par injection de pentobarbital à 150 mg/Kg (Ceva santé animale, 54,7 mg/mL).

Les solutions de NPs PEGylées ont été injectées en intraveineuse à raison de 4 mL/Kg.

F. Utilisation des NPs PEG- Gd₂O₂S :Eu³⁺ *in vivo*

1. Suivi de la biodistribution par IRM chez la souris

Les expériences ont été conduites avec un appareil Biospec (Bruker) horizontal de 4,7 T. Le système était équipé d'un insert à gradient de 12 cm doué d'une puissance maximale de 200 mT/min et d'un temps de montée de 120 ms¹⁹⁴.

Des dilutions de la solution de NPs PEGylée ont été préparées et dispersées dans un gel d'agarose avant d'effectuer des mesures de relaxation T_1 et T_2 selon le protocole précédemment décrit¹⁹⁵.

Après injection de la solution de NPs PEGylée (4 mL/Kg) dans la veine caudale des souris, des acquisitions corps entier ont été réalisées pendant une heure aux jours 0, 7, 14 et 90. Le ratio signal/bruit dans les différents organes a été déterminé par division de la moyenne de la valeur des pixels de la région d'intérêt par l'erreur standard du bruit¹⁹⁶ sur 6 coupes différentes avec trois souris différentes par image. Immédiatement après l'injection, le monitoring de la demi-vie de circulation des NPs au niveau des carotides a été effectué pendant 90 minutes.

2. Etude de l'excrétion et des effets secondaires chez le lapin

Quatre lapins (2 males et 2 femelles pour prendre en compte d'éventuels effets hormonaux) ont été injectés avec la solution de NPs PEGylée dans la veine marginale de l'oreille et différents paramètres ont été monitorés sur une période d'un mois. Les animaux ont été observés quotidiennement pour déterminer leur état clinique à l'aide du système de notation suivant :

Procédures expérimentales

Signes cliniques observés		Score
Aspect général	Absence de toilettage	1
	Piloérection	1
	Dos courbé	1
	Tête tournée vers le bas de la cage, photophobie	1
	Yeux fermés	1
	Ecoulement oculaire	1
	Ecoulement nasal	1
Système digestif	Anorexie ou hyporexie	1
	Déshydratation	1
	Diarrhée ou fèces liquides	1
	Constipation	1
Condition corporelle	Os iliaque, cotes et colonne vertébrale sont proéminents au toucher ; perte musculaire et absence de couverture grasseuse ; la croupe est courbée vers l'intérieur	2
	Os iliaque, cotes et colonne vertébrale sont facilement palpables ; perte musculaire et très légère couverture grasseuse ; la croupe est plate	1
	Os iliaque, cotes et colonne vertébrale sont palpables en exerçant une pression ; légère couverture grasseuse ; la croupe est arrondie	1
	Difficultés à sentir l'os iliaque, les cotes et la colonne vertébrale ; ventre pendant ; croupe gonflée	2
Système neuro-musculo-squelettique	Prostration ou forte hypoactivité	1
	Paralysie partielle	1
	Difficultés de locomotion	1
	Absence de réponse à la stimulation ou stupeur	1
	Convulsions ou spasmes	2
	paraplégie	4
Système respiratoire	Respiration irrégulière/difficile	1
	Cyanose/ extrémités bleutées (oreille, patte, queue)	1
Autre signes	Hypothermie	1
	Vocalisations ou agressivité lors de la manipulation	1
	Autres signes cliniques anormaux (à spécifier)	1

Procédures expérimentales

Le poids corporel a également été mesuré et le sang (500 µL – 1,3 mL au niveau de la veine marginale de l'oreille), les urines (1 mL) et les fèces (200 mg) ont été collectés régulièrement.

G. Utilisation des NPs PEG- Gd₂O₂S :Yb³⁺/Tm³⁺ *in vivo*

1. Suivi de la biodistribution par fluorescence proche-infrarouge chez le rat

Les expériences ont été conduites à l'aide de l'imageur proche infrarouge. 4 mL/Kg de la solution de PEG-Gd₂O₂S:Yb³⁺/Tm³⁺ ont été injectés dans veine jugulaire droite de 6 rats Lewis femelles à l'aide d'une canule 32G et d'un catheter PE10 connecté à un pousse-seringue. La vitesse d'injection a été maintenue à 5 mL/h.

2. Etude de l'excrétion et des effets secondaires chez le rat

Les urines et les fèces ont été régulièrement collectées en plaçant les animaux dans des cages à métabolisme individuelles pendant 9 h avec libre accès à la boisson et à la nourriture *ad libitum*. 150-200 µL de sang ont été prélevés au niveau de la veine caudale sous anesthésie générale après chaque séance d'imagerie à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 25 G pré-remplie de 20 µL d'héparine.

H. Coupes histologiques

Après euthanasie des animaux, les organes ont été minutieusement prélevés puis fixés à 1% de PFA à 4°C pendant 48 h. Les organes ont ensuite été déshydratés dans des bains successifs d'alcool puis inclus en paraffine. Des sections de 6 µm ont par la suite été réalisées au microtome avant coloration à l'hémalum-éosine et au rouge sirius.

I. Préparation des échantillons pour dosage ICP

Tous les échantillons ont été conservés à -20°C avant préparation pour dosage ICP-MS. Les échantillons ont d'abord été dissouts en milieu acide :

- l'urine et le sang ont été dissouts à température ambiante avec un rapport 1 :20 dans un mélange comprenant 0,05 N d'acide nitrique, 0,05% de Triton X-100 et 1 %

Procédures expérimentales

d'éthanol dilués dans l'eau. Après dissolution, l'urine a été diluée 1 :20 et le sang filtré (0,2 µm) puis dilué 1 :10 dans de l'eau.

- Les fèces et les organes ont été incubés pendant 8 h à 85°C dans un mélange d'acide nitrique 12 N et d'H₂O₂ 5% (1mL / 100 mg d'échantillon). Après refroidissement et dilution 1 :12 à l'eau, les solutions ont été centrifugées (5 min, 5 000 g) pour débarrasser le surnageant des résidus non dissouts. Le surnageant a ensuite été filtré (0,2 µm) avant dilution finale dans l'eau (1 :10 pour les organes, 1 :5 pour les fèces).

De l'eau ultrapure milliQ a été utilisée à chaque étape de la préparation.

Les échantillons dissouts ont ensuite été dosés à l'aide d'un appareil ICP-MS 7500 series (Agilent) muni d'un passeur robotisé ASX-500 series (Agilent). La concentration en Gd a été déterminée par comparaison avec un standard (SCP science, 1000 µg/mL) dilué dans les différents milieux utilisés pour la dissolution des échantillons.

J. Culture cellulaire

Les cellules mésenchymateuses stromales de la moelle osseuse de rats (MSCs) ont été obtenues selon le protocole précédemment mis au point dans l'équipe^{181,188} : des rats Lewis males pesant 180-200 g ont été euthanasiés par injection péritonéale de pentobarbital. Après désinfection de l'abdomen à l'éthanol, les deux pattes arrières sont prélevées et les fémurs dégagés de la peau et des muscles. Par la suite, les épiphyses sont sectionnées sous atmosphère stérile et la moelle osseuse est chassée à l'aide de milieu de culture complet. Ce milieu est composé de MEM α supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS), 100 unité/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (soit 1% P/S à partir du stock commercial). La moelle est ensuite dissociée et mise en culture dans des flasques à 37°C et 5% de CO₂ à raison de 200 000 cellules/cm². Les MSCs représentent 0,01% des cellules totales de la moelle et ont un temps de doublement de quatre jours. Après trois jours de culture, le surnageant est éliminé et les MSCs sont sélectionnées par leur propriété d'adhérence au plastique. La caractérisation des MSCs isolées suivant ce protocole a précédemment été décrite par Mias et al¹⁵⁴. Le milieu de culture est ensuite changé tous les trois jours. Les MSCs sont utilisées entre les passages 3 et 6. Chaque décollement à la trypsine des cellules adhérentes et réensemencement ultérieur est considéré comme un passage. Cela permet de renseigner grossièrement sur l'âge des cellules en culture.

Procédures expérimentales

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), H9c2 (cardiomyoblaste de rat), HeLa (cancer du col de l'utérus humain) et HK2 (tubule proximal/cortex rénal humain) ont été acquises chez ATCC et les HUVEC (cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain) chez PromoCell. Les macrophages murins ont été obtenus par lavage péritonéal de souris C57BL/6J comme précédemment décrit¹⁹⁷. Les MSCs humains ont été obtenus à partir de moelle osseuse de donneur sains comme décrit ailleurs¹⁹⁸.

Les cellules HK2 ont été cultivées en milieu DMEM F12, les HUVEC en milieu M199, les MSCs humaines en milieu MEM α et les autres lignées cellulaires en DMEM glutamax. Tous les milieux ont été supplémentés avec 10% de FBS et 1% de P/S.

K. Marquage cellulaire *in vitro* avec nanoparticules

Les cellules ont étéensemencées en plaque de culture à raison de 10 000 cellules/cm² et incubées sur la nuit pour adhérence avant marquage. Les NPs sous forme de poudre préalablement broyée ont été dispersées dans du milieu de culture complet à l'aide d'un bain à ultrasons (Advantage Lab) à 250 μ g/mL pendant 30 min. Le milieu de culture des cellules a ensuite été remplacé par la suspension diluée aux concentrations appropriées. Un paramètre important à prendre en compte lors de cette étape est la quantité de NPs disponible pour chaque cellule en fonction de différentes surfaces de plaque de culture utilisées (plaques 6,12,24...puits et flasques). En effet, les volumes de milieu usuellement introduits dans les puits ne sont pas rationalisés par rapport au nombre de cellules présentes mais par rapport à un volume facilement prélevable. Afin de normaliser la quantité de NPs que chaque cellule reçoit lors du traitement, nous avons fixé un volume par cellule correspondant à une quantité de NPs. Ainsi, un traitement à 125 μ g/mL correspond à 3 ng de NPs dans 24 nL de milieu par cellule quel que soit le contenant. Après 24 h de marquage, le milieu a été éliminé et les cellules lavées au PBS (avec calcium et magnésium pour éviter le détachement) afin d'éliminer les NPs non internalisées. Du milieu frais ou le réactif d'un test ultérieur a été ajouté.

L. Etude du marquage cellulaire

1. Vidéomicroscopie

Le suivi de la cinétique de marquage a été réalisé à l'aide d'un vidéomicroscope Zeiss Cell Observer HS équipé d'une platine permettant le contrôle de la température et du CO₂ mimant les conditions de culture normales.

2. Microscopie de fluorescence

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre placées dans des plaques de culture et marquées avec les NPs. Après rinçage au PBS et fixation au PFA 4%, les lamelles ont été ôtées des plaques et montées sur des lames de microscopie à l'aide de fluoromount (Sigma). Les images ont été acquises sur un microscope Zeiss Axio Observer Z1 équipé d'une lampe HXP. Un cube filtre personnalisé a été utilisé pour la visualisation des NPs (Excitation :G365 ; émission :BP 605/70). La quantification du marquage a été réalisée par traçage du contour des cellules et mesure du pourcentage de surface cellulaire recouvert par les NPs (voir XI.B.1).

3. Microscopie électronique

Les cellules ont été cultivées en plaques 6 puits et préparées par fixation au glutaraldéhyde 2%, post-fixation à l'OsO₄ 1% et pré-marquage à l'acétate d'uranyle 2%¹⁹⁹. Après inclusion en résine époxy, sections ultrafines et post-marquage à l'acétate d'uranyle 3% et au citrate de plomb 8,5%²⁰⁰, les échantillons ont été examinés à l'aide d'un MET Hitachi HT 7700 opérant à 80 kV.

4. Marquage des lysosomes

Les compartiments acides des cellules en culture ont été marqués par incubation avec du LysoTracker® dans le milieu de culture (500 nM, 2 h, 37°C).

5. Etude de la rétention cellulaire

Les MSCs en suspension ont été séparés en deux flasques différentes et marquées soit aux NPs soit au CFSE (5 µM, 5min, température ambiante). Après rinçage, les deux groupes ont été ensemencées ensemble en plaque 6 puits en proportion 1:1 et des clichés de fluorescence ont été acquis régulièrement.

6. Phantoms cellulaires pour IRM

Après marquage aux NPs, les MSCs ont été décollées à la trypsine, comptées et resuspendues à différentes concentrations dans 20 μ L de PBS contenant 10% de gélatine. Les suspensions ont alors été déposées sous forme de gouttelettes sur une boîte de pétri et placées à 4°C pour gélifier. Celles-ci ont ensuite été incorporées entre deux couches de gélatine 10% dans un eppendorf.

L'imagerie par résonance magnétique a été conduite à l'aide d'un imageur clinique 3 T Philips Achieva. Les images pondérées T_2 ont été acquises sur plusieurs coupes (épaisseur 2 mm, espace 0 mm) avec une séquence spin-echo, un temps de répétition/temps d'écho (TR/TE) de 150/40 ms et un angle de bascule de 90°.

M. Evaluation de la toxicité cellulaire des NPs $Gd_2O_3:Eu^{3+}$

1. MTT

Le MTT (tétrazolium jaune) introduit dans le milieu de culture est réduit par les cellules métaboliquement actives en cristaux de formazan (violet et insoluble) grâce à l'action de la succinate déshydrogénase (enzyme de la chaîne respiratoire de la mitochondrie). La quantité de cristaux produits est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et/ou à l'activité métabolique de chaque cellule.

Les cellules ont été incubées pendant 4 h avec du milieu de culture contenant 10% de MTT dilué à partir d'une solution stock (5 mg/mL dans le PBS). Les cristaux de formazan nouvellement formés ont ensuite été solubilisés dans du DMSO et l'absorbance a été lue au spectrophotomètre (Tecan) à 570nm.

2. Rouge neutre

Le rouge neutre est un colorant supravital utilisé comme marqueur de l'intégrité membranaire^{140,201}. Il s'agit d'un colorant cationique faible qui traverse les membranes plasmiques par diffusion et s'accumule dans les lysosomes. Si la membrane est altérée, son absorption est diminuée et celui-ci peut s'échapper du lysosome. Il est ainsi possible de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes.

Procédures expérimentales

Le milieu de culture contenant 1% de rouge neutre (à partir d'un stock à 4 mg/mL) a été préparé le jour avant utilisation et incubé à 37°C sur la nuit comme décrit par Repetto et al.²⁰¹. Après 2 h d'incubation avec les cellules et rinçage au PBS, une solution de solubilisation du colorant a été ajoutée (50% éthanol, 49% eau pure, 1% acide acétique) et l'absorbance a été lue au spectrophotomètre (Tecan) à 570nm.

3. Wound healing

Le test de cicatrisation du tapis cellulaire (wound healing scratch assay) est un moyen efficace et peu coûteux pour évaluer les propriétés de migration et de prolifération de cellules en culture. Par extension, il peut être utilisé pour estimer l'impact de différents traitements sur ces compétences cellulaires. Il est particulièrement adapté aux cellules présentant des propriétés migratoires intrinsèques comme les MSCs²⁰².

Les cellules ont été cultivées en plaque 6 puits. Après traitement aux NPs et culture à confluence, le tapis cellulaire a été gratté de manière longitudinal à l'aide d'un cône de pipette 200 µL avec un angle de 45° et guidé par une règle pour conserver une linéarité. Les cellules ont été rincées deux fois au PBS pour éliminer les débris cellulaires. Des clichés de contraste de phase ont été réalisés aux temps 0, 12 et 24h. Cinq images par conditions à localisations déterminées ont été analysées à chaque temps. Afin de faciliter la localisation de zones d'acquisitions identiques au cours du temps, des marques sont créées sur le fond de la boîte²⁰³.

Pour l'évaluation de la vitesse de cicatrisation du tapis cellulaire, l'analyse de la zone sans cellules a été conduite à l'aide du logiciel FIJI²⁰⁴ (voir XI.B.2).

4. Différenciation

Les protocoles de différenciation ont été adaptés de Neuhuber et al²⁰⁵ comme précédemment décrit¹⁸⁷ :

a) Adipogenèse

Les MSCs ont étéensemencées en plaques 6 puits à raison de 20 000 cellules/cm² et cultivées jusqu'à confluence. Après rinçage le milieu de culture classique a été remplacé par du milieu d'induction adipogénique pendant 3 jours puis remplacé par du milieu de maintien adipogénique pendant 1 jour. Après trois cycles d'alternance, les cellules ont été laissées en

Procédures expérimentales

milieu de maintien pendant 7 jours puis fixées au PFA 4%. Les lipides neutres ont ensuite été colorés à l'huile rouge O 0,2% avant observation au microscope.

Milieu d'induction : milieu DMEM high glucose (4,5g/L) ; sérum de veau fœtal 10% ; sérum de lapin 5% ; P/S 1% ; isobutylmethylxanthine 0,5 mM ; dexaméthasone 1 mM, insuline 10 mg/mL et indométhacine 1mM.

Milieu de maintien : milieu DMEM high glucose (4,5g/L) ; sérum de veau fœtal 10% ; sérum de lapin 5% ; P/S 1% ; insuline 10 mg/mL.

b) Chondrogenèse

Une suspension de 500 000 MSCs dans 500 µL de milieu a d'abord été centrifugée à 400 g pendant 5 min dans des tubes de 15 mL pour former des culots. Après 24 h de stabilisation en condition normale de culture, les culots ont ensuite été décollés et le milieu a été remplacé par du milieu de différenciation chondrogénique. Ce milieu a par la suite été changé trois fois par semaine. Au jour 21, les culots ont été fixés à la solution de Carnoy (60% éthanol, 30% chloroforme, 10% acide acétique) puis inclus en paraffine et des sections de 5 µm ont été déposés sur lame. Les mucopolysaccharides et glycosaminoglycans ont ensuite été colorés au bleu alcian (1g dans 100 mL H₂O et 3mL acide acétique) pendant 30 minutes avant observation.

Milieu de différenciation : DMEM high glucose (4,5 g/L) ; sérum de veau fœtal 1% ; P/S 1% ; dexaméthasone 100 nM ; ascorbate-2-phosphate 50µg/mL ; proline 40 µg/mL ; pyruvate 2mM ; ITS+ (insuline/transferrine/sélénium/acide linoléique) 1/100 ; TGF-β3 10 ng/mL ; BMP-2 200 ng/mL.

c) Ostéogenèse

Les MSCs ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 3 000 cellules/cm². Après deux jours, le milieu de culture a été remplacé par du milieu de différenciation ostéogénique. Celui-ci a par la suite été changé deux fois par semaine. Après 18 jours, les cellules ont été fixées au PFA 4% et les dépôts de calcium ont été colorés au rouge Alizarin S 2% avant observation.

Milieu de différenciation : MEMα ; FBS 10 % ; P/S 1% ; dexaméthasone 10 nM ; ascorbate-2-phosphate 50 µg/mL ; glycérol phosphate 10 mM.

N. Suivi des MSCs *in vivo* avec NPs Gd₂O₂S :Yb³⁺/Tm³⁺

1. Préparation et injection des cellules

Les MSCs adhérentes ont été marquées aux NPs Gd₂O₂S :Yb³⁺/Tm³⁺ selon le protocole mis en place avec les NPs Gd₂O₂S :Eu³⁺.

Le marquage aux quantum dots des MSCs en suspension (Qtracker 655 labeling kit, Invitrogen) a été conduit selon les instructions du fournisseur à 10 nM pendant une heure à 37°C sous agitation.

Les cellules ont ensuite été rincées puis centrifugées (5 min, 400 g) puis comptées et reprises dans du milieu de culture (MEM α) sans sérum et conservées à 37°C avant injection.

2. Injection de cellules dans le parenchyme rénal

Après rasage et laparotomie, le rein gauche des rats Lewis femelles a été exposé et maintenu en place à l'aide de compresses humidifiées. Une injection unique de 2.10⁶ suspendues dans 30 μ L de milieu de culture a été réalisée dans le parenchyme rénal à l'aide d'une seringue à insuline 30 G (nécessaire pour éviter le volume mort). L'aiguille a été insérée au niveau du pôle inférieur du rein, le long de la grande courbure pour atteindre le pôle supérieur où les cellules ont été transplantées.

3. Imagerie multimodale

Tout comme les acquisitions en imagerie proche infrarouge, les animaux ont été maintenus sous anesthésie gazeuse (1.5-2% isoflurane dans un mélange 1:1 air/O₂).

a) Tomodensitométrie

Des scans corps entier ont été conduits sous anesthésie gazeuse à l'aide d'un appareil Nanoscan PET/CT (Mediso) selon les paramètres suivants ; scan semi-hélicoïde, 50kVp, 520 mA, temps de rotation du portique 300 ms, épaisseur des coupes 251 μ m et binning 1 :4.

La fonction respiratoire des animaux a été surveillée tout au long de l'acquisition à l'aide d'un ballonnet placé sous l'abdomen des animaux.

b) IRM

Les acquisitions IRM ont été conduites avec un appareil Biospec 7 T (Bruker). Une antenne de volume en quadrature de diamètre interne 70 mm a été utilisée pour la transmission de radiofréquences et une antenne de surface de 30 mm a été utilisée pour la réception du signal. Les images ont été acquises en utilisant une séquence multicoupe multiecho spin echo T_2 -TurboRARE : 9 coupes horizontales contiguës d'1 mm d'épaisseur ; TR = 700 ms ; Te = 23 ms ; FOV 50x50 mm² avec une matrice d'acquisition 256x256, résultant en une résolution dans le plan de 0,195x0,195 mm² ; NA = 16 ; temps d'acquisition : 6 min.

0. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard (SEM). La comparaison statistique des données a été évaluée à l'aide d'un test de student (t-test) pour la comparaison entre deux groupes. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

XI. Analyses semi-automatique des images avec imageJ/FIJI

Au cours de cette thèse, une quantité très importante d'images a été acquise avec différents appareils lors de différentes expériences. L'analyse rapide, efficace et le moins opérateur-dépendant possible était donc essentielle. Pour ce faire, le logiciel ImageJ et plus précisément son portage FIJI²⁰⁴ (Fiji Is Just ImageJ) a été largement exploité. L'apport régulier d'améliorations par la communauté scientifique et la facilité de réalisation de macros (compilation de lignes de commandes informatiques) pour automatiser le traitement des images nous ont permis de mener à bien les analyses. La retranscription des différentes étapes de traitements des images incluses dans les macros créées au cours de ces travaux de thèse sont détaillées ci-dessous.

A. Diamètre des nanoparticules

L'analyse du diamètre peut être réalisée manuellement par traçage d'ellipses autour des NPs sur des clichés de microscopie électronique. Cependant cette méthode est extrêmement longue, c'est pourquoi nous avons mis au point la méthode suivante

- 1- Image originale
- 2- Subtract Background...; rolling ball radius=bruit de fond; light background; sliding paraboloid : Soustraction du bruit de fond de l'image (dont la valeur est mesurée sur des zones sans NPs).
- 3- Gamma...; value=5 : améliore le contraste des NPs en les obscurcissant.
- 4- AutoThreshold("Default"); BlackBackground, false : Binarisation de l'image par seuillage automatique.
- 5- Ellipse Split plugin ; standard watershed; add to manager ; remove blobs on edges ; overlap threshold =95% ; major axis length = 80-Infinity ; minor axis length = 80-Infinity aspect ratio = 1-2 : ajuste des ellipses autour des NPs après segmentation des objets suivant les lignes de partage (watershed). Les ellipses individuelles sont compilées sous forme de zones de sélection (ROI). Les dimensions miniums des

objets analysés ainsi que le ratio longueur/largeur sont définis par en fonction du type de NPs.

- 6- Les ROIs non spécifiques sont supprimées manuellement.
- 7- Toutes les autres ROIs sont mesurées pour déterminer le diamètre correspondant.
- 8- Comparaison avec le comptage manuel.

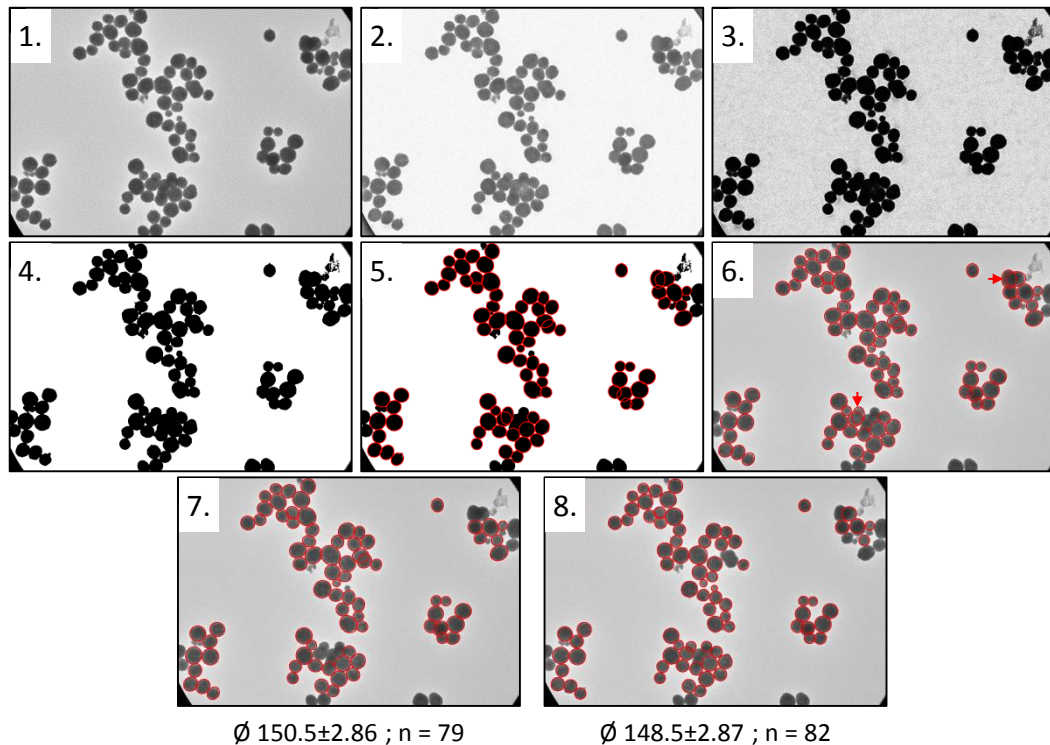


Figure XI.1. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du diamètre des nanoparticules sur clichés de microscopie électronique à transmission.

B. Segmentation du contraste de phase

La première étape commune aux analyses des images acquises en contraste de phase consiste en la segmentation de celles-ci afin de créer un masque délimitant le contour cellulaire :

- 1- Image originale : l'arrière-plan n'est pas homogène comme le montre le profil. Ceci peut être dû à une uniformité du plastique de la plaque de culture et/ou une illumination irrégulière lors de l'acquisition.
- 2- Pseudo Flat-Field Plugin (Biovoxxel toolbox); radius=100 : Création d'une image « plate » artificielle à partir de l'image originale avec un coefficient de floutage de 100 pixels et soustraction à cette dernière.

Analyses semi-automatique des images avec imageJ/FIJI

- 3- Non Local Means Denoising Plugin (Biomedgroup); Sigma=15, Smoothing factor=1 : Débruitage de l'image.
- 4- Area Filter Plugin (Image Edge); Median=3, Deriche=1, Hysteresis_high=100, hysteresis_low=50 : Détection des bords par filtrage Canny-deriche et binarisation de l'image.
- 5- Erode (x2) : retire des pixels au bord des objets afin de mieux délimiter les cellules
- 6- Close- : Dilatation puis érosion pour lisser les objets et remplir les petits vides.
- 7- Invert LUT : inverse la valeur des pixels. Transforme les pixels noir en blanc et inversement dans une image binarisée.
- 8- Close-
- 9- Invert LUT : retour aux valeurs initiales des pixels
- 10- Analyze particles ; Size (pixel²)=5000-Infinity, circularity=0.00-1.00, add : Analyse des objets pour créer une délimitation de l'espace autour des cellules (ROI).
- 11- Selection brush tool : Correction manuelle de la ROI.

1. Marquage cellulaire

Après segmentation du contraste de phase, la ROI est transférée sur l'image de fluorescence pour quantifier le marquage :

- 12- Make Inverse : La ROI est inversée pour délimiter les cellules et non l'espace environnant.
- 13- Gamma..., value=0.25 : ajustement de l'histogramme pour égaliser la brillance des objets (ici les NPs).
- 14- Threshold ; Mean threshold, BlackBackground, false : Binarisation de l'image par seuillage manuel.
- 15- Measure : mesure du paramètre « Area fraction » à l'intérieur de la ROI. Soit le pourcentage de surface occupé par les NPs à l'intérieur des cellules.

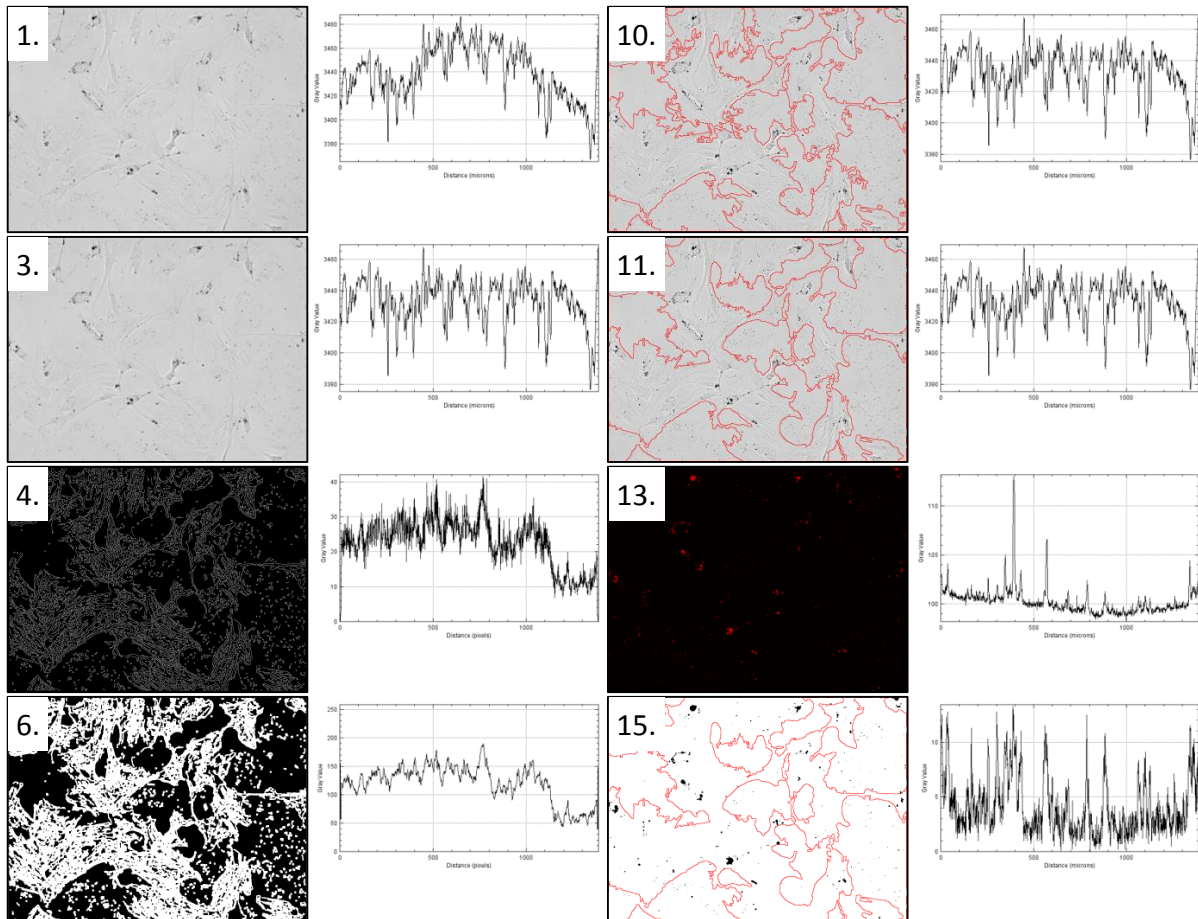


Figure XI.2. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du marquage cellulaire. Images et profils d'intensité moyens des pixels sur l'image.

2. Wound healing

12- La ROI corrigée permet ainsi l'analyse finale de la surface libre dans le tapi cellulaire.

Analyses semi-automatique des images avec imageJ/FIJI

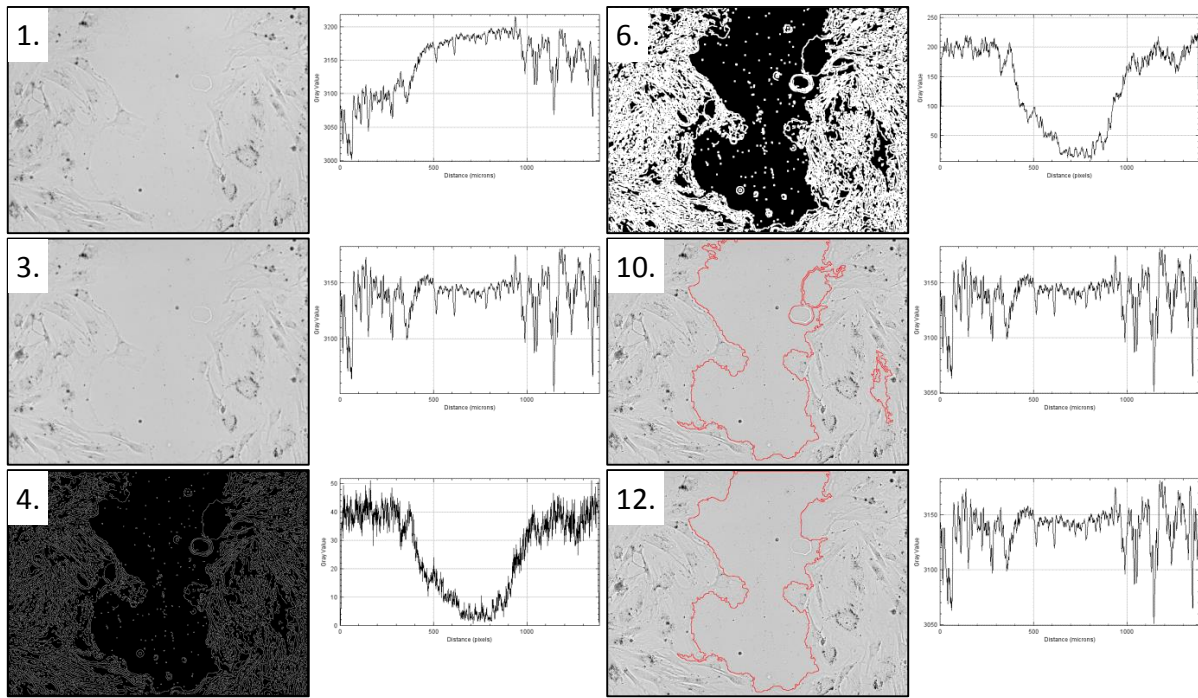


Figure XI.3. Images représentatives des différentes étapes d'analyse du wound healing. Images et profils d'intensité moyens des pixels sur l'image.

XII. Références bibliographiques

1. Heiligtag, F. J. & Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today* **16**, 262–271 (2013).
2. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **8**, 2101–2141 (2011).
3. Heath, J. R. Nanotechnologies for biomedical science and translational medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 14436–14443 (2015).
4. Nanosciences et progrès médical. Available at: <http://www.senat.fr/rap/r03-293/r03-293.html>. (Accessed: 8th November 2017)
5. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
6. Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **307**, 93–102 (2006).
7. Wang, C., Cheng, L. & Liu, Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. *Biomaterials* **32**, 1110–1120 (2011).
8. Pitek, A. S. *et al.* Transferrin coated nanoparticles: study of the bionano interface in human plasma. *PloS One* **7**, e40685 (2012).
9. Clark, A. J. & Davis, M. E. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 12486–12491 (2015).
10. Babic, M. *et al.* Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjug. Chem.* **19**, 740–750 (2008).

Références bibliographiques

11. Josephson, L., Tung, C. H., Moore, A. & Weissleder, R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates. *Bioconjug. Chem.* **10**, 186–191 (1999).
12. Lewin, M. *et al.* Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 410–414 (2000).
13. Shi, Z. *et al.* (Carboxymethyl)chitosan-Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging of Stem Cells. *Acs Appl. Mater. Interfaces* **1**, 328–335 (2009).
14. Bakhru, S. H. *et al.* Enhanced cellular uptake and long-term retention of chitosan-modified iron-oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 4613–4623 (2012).
15. Hachani, R., Lowdell, M., Birchall, M. & Thanh, N. T. K. Tracking stem cells in tissue-engineered organs using magnetic nanoparticles. *Nanoscale* **5**, 11362–11373 (2013).
16. Wang, Y., Xu, C. & Ow, H. Commercial Nanoparticles for Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **3**, 544–560 (2013).
17. Taylor, A. *et al.* Assessing the Efficacy of Nano- and Micro-Sized Magnetic Particles as Contrast Agents for MRI Cell Tracking. *Plos One* **9**, e100259 (2014).
18. Fay, F. & Scott, C. J. Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Immunotherapy* **3**, 381–394 (2011).
19. Weissig, V., Pettinger, T. K. & Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part I): products on the market. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4357–4373 (2014).
20. Zhang, L. *et al.* Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–769 (2008).

Références bibliographiques

21. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 751–760 (2007).
22. Zhang, L. & Webster, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* **4**, 66–80 (2009).
23. Barnes, C. P., Sell, S. A., Boland, E. D., Simpson, D. G. & Bowlin, G. L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1413–1433 (2007).
24. Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S. & Langer, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 13–22 (2011).
25. Chithrani, D. B. *et al.* Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiat. Res.* **173**, 719–728 (2010).
26. Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Currell, F. J. & Prise, K. M. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* **4**, 4830–4838 (2012).
27. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 317–324 (2011).
28. Zhang, G.-J. & Ning, Y. Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: a review. *Anal. Chim. Acta* **749**, 1–15 (2012).
29. Duan, X. *et al.* Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 401–407 (2012).
30. Huang, W.-Y. & Davis, J. J. Multimodality and nanoparticles in medical imaging. *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003* **40**, 6087–6103 (2011).

Références bibliographiques

31. Law, G.-L. & Wong, W.-T. An Introduction to Molecular Imaging. in *The Chemistry of Molecular Imaging* (eds. Long, N. & Wong, W.-T.) 1–24 (John Wiley & Sons, Inc, 2014). doi:10.1002/9781118854754.ch1
32. Naumova, A. V., Modo, M., Moore, A., Murry, C. E. & Frank, J. A. Clinical imaging in regenerative medicine. *Nat. Biotechnol.* **32**, 804–818 (2014).
33. Liu, Q., Feng, W., Yang, T., Yi, T. & Li, F. Upconversion luminescence imaging of cells and small animals. *Nat. Protoc.* **8**, 2033–2044 (2013).
34. Altinoğlu, E. I. & Adair, J. H. Near infrared imaging with nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2**, 461–477 (2010).
35. Ow, H. *et al.* Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 113–117 (2005).
36. Smith, A. M., Mancini, M. C. & Nie, S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 710–711 (2009).
37. Masedunskas, A. *et al.* Intravital microscopy. *Bioarchitecture* **2**, 143–157 (2012).
38. Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538–544 (2005).
39. Li, J. & Zhu, J.-J. Quantum dots for fluorescent biosensing and bio-imaging applications. *The Analyst* **138**, 2506–2515 (2013).
40. Lin, S. *et al.* Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *BMC Biotechnol.* **7**, 67 (2007).
41. Progatzy, F., Dallman, M. J. & Lo Celso, C. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus* **3**, (2013).
42. Quek, C.-H. & Leong, K. W. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for in Vivo Optical Imaging. *Nanomaterials* **2**, 92–112 (2012).

Références bibliographiques

43. Vogel, A. & Venugopalan, V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chem. Rev.* **103**, 577–644 (2003).
44. Dong, H. *et al.* Lanthanide Nanoparticles: From Design toward Bioimaging and Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10725–10815 (2015).
45. Gargas, D. J. *et al.* Engineering bright sub-10-nm upconverting nanocrystals for single-molecule imaging. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 300–305 (2014).
46. Kunjachan, S., Ehling, J., Storm, G., Kiessling, F. & Lammers, T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem. Rev.* **115**, 10907–10937 (2015).
47. Lohrke, J. *et al.* 25 Years of Contrast-Enhanced MRI: Developments, Current Challenges and Future Perspectives. *Adv. Ther.* **33**, 1–28 (2016).
48. Modo, M. *et al.* Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *NeuroImage* **21**, 311–317 (2004).
49. Li, S. C. *et al.* A biological global positioning system: considerations for tracking stem cell behaviors in the whole body. *Stem Cell Rev.* **6**, 317–333 (2010).
50. Ahrens, E. T. & Bulte, J. W. M. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 755–763 (2013).
51. Hermann, P., Kotek, J., Kubíček, V. & Lukes, I. Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003** 3027–3047 (2008). doi:10.1039/b719704g
52. Oksendal, A. N. & Hals, P. A. Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **3**, 157–165 (1993).

Références bibliographiques

53. Ersoy, H. & Rybicki, F. J. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **26**, 1190–1197 (2007).
54. Rogosnitzky, M. & Branch, S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals* **29**, 365–376 (2016).
55. Geraldes, C. F. G. C. & Laurent, S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 1–23 (2009).
56. Estelrich, J., Jesus Sanchez-Martin, M. & Antonia Busquets, M. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 1727–1741 (2015).
57. European Medicines Agency. Gadolinium-containing contrast agents. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Gadolinium-containing_contrast_agents/human_referral_prac_000056.jsp&mid=WC0b01ac05805c516f.
58. Port, M. *et al.* Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *BioMetals* **21**, 469–490 (2008).
59. Kanda, T. *et al.* Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* **276**, 228–232 (2015).
60. McDonald, R. J. *et al.* Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* **275**, 772–782 (2015).

Références bibliographiques

61. Hifumi, H., Yamaoka, S., Tanimoto, A., Citterio, D. & Suzuki, K. Gadolinium-Based Hybrid Nanoparticles as a Positive MR Contrast Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15090–15091 (2006).
62. Singh, A. & Sahoo, S. K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug Discov. Today* **19**, 474–481 (2014).
63. Li, L. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* **3**, 595–615 (2013).
64. Corot, C., Robert, P., Idée, J.-M. & Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1471–1504 (2006).
65. Kevles, B. *Naked to the Bone: Medical Imaging in the Twentieth Century.* (Rutgers University Press, 1997).
66. Lusic, H. & Grinstaff, M. W. X-Ray Computed Tomography Contrast Agents. *Chem. Rev.* **113**, (2013).
67. Lee, N., Choi, S. H. & Hyeon, T. Nano-Sized CT Contrast Agents. *Adv. Mater.* **25**, 2641–2660 (2013).
68. Haller, C. & Hizoh, I. The cytotoxicity of iodinated radiocontrast agents on renal cells in vitro. *Invest. Radiol.* **39**, 149–154 (2004).
69. Eck, W., Nicholson, A. I., Zentgraf, H., Semmler, W. & Bartling, S. Anti-CD4-targeted Gold Nanoparticles Induce Specific Contrast Enhancement of Peripheral Lymph Nodes in X-ray Computed Tomography of Live Mice. *Nano Lett.* **10**, 2318–2322 (2010).
70. Kim, D., Jeong, Y. Y. & Jon, S. A Drug-Loaded Aptamer-Gold Nanoparticle Bioconjugate for Combined CT Imaging and Therapy of Prostate Cancer. *Acs Nano* **4**, 3689–3696 (2010).

Références bibliographiques

71. Chou, S.-W. *et al.* In Vitro and in Vivo Studies of FePt Nanoparticles for Dual Modal CT/MRI Molecular Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 13270–13278 (2010).
72. McDonald, M. A. & Watkin, K. L. Small particulate gadolinium oxide and gadolinium oxide albumin microspheres as multimodal contrast and therapeutic agents. *Invest. Radiol.* **38**, 305–310 (2003).
73. Liu, Z. *et al.* PEGylated hybrid ytterbia nanoparticles as high-performance diagnostic probes for in vivo magnetic resonance and X-ray computed tomography imaging with low systemic toxicity. *Nanoscale* **5**, 4252–4261 (2013).
74. Gambhir, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 683–693 (2002).
75. Jennings, L. E. & Long, N. J. 'Two is better than one'--probes for dual-modality molecular imaging. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 3511–3524 (2009). doi:10.1039/b821903f
76. Calliada, F., Campani, R., Bottinelli, O., Bozzini, A. & Sommaruga, M. G. Ultrasound contrast agents: basic principles. *Eur. J. Radiol.* **27 Suppl 2**, S157-160 (1998).
77. Hernot, S. & Klibanov, A. L. Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1153–1166 (2008).
78. Deckers, R. & Moonen, C. T. W. Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery. *J. Controlled Release* **148**, 25–33 (2010).
79. Key, J. & Leary, J. F. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 711–726 (2014).
80. González-Béjar, M., Francés-Soriano, L. & Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles for Bioimaging and Regenerative Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **4**, (2016).

Références bibliographiques

81. Catana, C. *et al.* Simultaneous in vivo positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3705–3710 (2008).
82. Judenhofer, M. S. *et al.* Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nat. Med.* **14**, 459–465 (2008).
83. Binnemans, K. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. *Chem. Rev.* **109**, 4283–4374 (2009).
84. Eliseeva, S. V. & Bünzli, J.-C. G. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 189–227 (2010).
85. Bünzli, J.-C. G. & Piguet, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 1048–1077 (2005).
86. Wei, W. *et al.* Cross Relaxation Induced Pure Red Upconversion in Activator- and Sensitizer-Rich Lanthanide Nanoparticles. *Chem. Mater.* **26**, 5183–5186 (2014).
87. Wang, F. & Liu, X. Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF₄ nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5642–5643 (2008).
88. Kobayashi, H. *et al.* In vivo multiple color lymphatic imaging using upconverting nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **19**, 6481–6484 (2009).
89. Xiong, L.-Q. *et al.* Synthesis, characterization, and in vivo targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. *Biomaterials* **30**, 5592–5600 (2009).
90. Hilderbrand, S. A., Shao, F., Salthouse, C., Mahmood, U. & Weissleder, R. Upconverting luminescent nanomaterials: application to in vivo bioimaging. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 4188–4190 (2009). doi:10.1039/b905927j

Références bibliographiques

91. Xiong, L., Yang, T., Yang, Y., Xu, C. & Li, F. Long-term in vivo biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials* **31**, 7078–7085 (2010).
92. Cao, T. *et al.* High-quality water-soluble and surface-functionalized upconversion nanocrystals as luminescent probes for bioimaging. *Biomaterials* **32**, 2959–2968 (2011).
93. Zhou, J., Liu, Z. & Li, F. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1323–1349 (2012).
94. Gu, W. *et al.* Chlorotoxin-conjugated, PEGylated Gd₂O₃ nanoparticles as a glioma-specific magnetic resonance imaging contrast agent. *RSC Adv.* **4**, 50254–50260 (2014).
95. Jung, J. *et al.* Europium-doped gadolinium sulfide nanoparticles as a dual-mode imaging agent for T₁-weighted MR and photoluminescence imaging. *Biomaterials* **33**, 5865–5874 (2012).
96. Xing, H. *et al.* Ultrasmall NaGdF₄ nanodots for efficient MR angiography and atherosclerotic plaque imaging. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **26**, 3867–3872 (2014).
97. Liu, Y. *et al.* A high-performance ytterbium-based nanoparticulate contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **51**, 1437–1442 (2012).
98. Yang, Y. *et al.* Long-term in vivo biodistribution and toxicity of Gd(OH)₃ nanorods. *Biomaterials* **34**, 508–515 (2013).
99. Liu, C. *et al.* Magnetic/upconversion fluorescent NaGdF₄:Yb,Er nanoparticle-based dual-modal molecular probes for imaging tiny tumors in vivo. *ACS Nano* **7**, 7227–7240 (2013).

Références bibliographiques

100. Ni, D. *et al.* Dual-Targeting Upconversion Nanoprobes across the Blood–Brain Barrier for Magnetic Resonance/Fluorescence Imaging of Intracranial Glioblastoma. *ACS Nano* **8**, 1231–1242 (2014).
101. Ma, J. *et al.* Folic Acid-Conjugated LaF₃:Yb,Tm@SiO₂ Nanoprobes for Targeting Dual-Modality Imaging of Upconversion Luminescence and X-ray Computed Tomography. *J. Phys. Chem. B* **116**, 14062–14070 (2012).
102. Sun, Y., Peng, J., Feng, W. & Li, F. Upconversion Nanophosphors NaLuF₄: Yb, Tm for Lymphatic Imaging In Vivo by Real-Time Upconversion Luminescence Imaging under Ambient Light and High-Resolution X-ray CT. *Theranostics* **3**, 346–353 (2013).
103. Salem, H. K. & Thiemermann, C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* **28**, 585–596 (2010).
104. Hall, P. A. & Watt, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Dev. Camb. Engl.* **106**, 619–633 (1989).
105. Blum, B. & Benvenisty, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res.* **100**, 133–158 (2008).
106. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
107. Bersenev, A. Results of regenerative medicine clinical studies from 2014. *Cell Trials* (2015). Available at: <http://celltrials.info/2015/03/01/results-regenmed-studies-2014/>. (Accessed: 7th October 2016)
108. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230–247 (1968).

Références bibliographiques

109. Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–3506 (2007).
110. Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. & Jacobs, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal. CCS* **9**, 12 (2011).
111. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
112. Meirelles, L. da S., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 419–427 (2009).
113. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **9**, 641–650 (1991).
114. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71–74 (1997).
115. Chapel, A. *et al.* Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J. Gene Med.* **5**, 1028–1038 (2003).
116. Mouseddine, M. *et al.* Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br. J. Radiol.* **80**, S49–S55 (2007).
117. Gu, E., Chen, W.-Y., Gu, J., Burridge, P. & Wu, J. C. Molecular Imaging of Stem Cells: Tracking Survival, Biodistribution, Tumorigenicity, and Immunogenicity. *Theranostics* **2**, 335–345 (2012).

Références bibliographiques

118. Wang, X. *et al.* Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* **102**, 3478–3482 (2003).
119. Sheikh, A. Y. *et al.* Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 2677–2684 (2007).
120. Tumber, T. *et al.* Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**, 359–363 (2004).
121. Gyöngyösi, M. *et al.* Serial Noninvasive In Vivo Positron Emission Tomographic Tracking of Percutaneously Intramyocardially Injected Autologous Porcine Mesenchymal Stem Cells Modified for Transgene Reporter Gene Expression. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **1**, 94–103 (2008).
122. Bulte, J. W. M. In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies. *AJR Am. J. Roentgenol.* **193**, 314–325 (2009).
123. Zhu, J., Zhou, L. & XingWu, F. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2376–2378 (2006).
124. Wolfs, E. *et al.* ¹⁸F-FDG labeling of mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells for PET imaging: effects on ultrastructure and differentiation capacity. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54**, 447–454 (2013).
125. Wu, C. *et al.* In vivo cell tracking via ¹⁸F-fluorodeoxyglucose labeling: a review of the preclinical and clinical applications in cell-based diagnosis and therapy. *Clin. Imaging* **37**, 28–36 (2013).
126. Muller-Borer, B. J., Collins, M. C., Gunst, P. R., Cascio, W. E. & Kypson, A. P. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J. Nanobiotechnology* **5**, 9 (2007).
127. Villa, C. *et al.* Stem Cell Tracking by Nanotechnologies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1070–1081 (2010).

Références bibliographiques

128. Liang, C., Wang, C. & Liu, Z. Stem Cell Labeling and Tracking with Nanoparticles. *Part. Part. Syst. Charact.* **30**, 1006–1017 (2013).
129. Abdul Jalil, R. & Zhang, Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. *Biomaterials* **29**, 4122–4128 (2008).
130. Wang, C., Cheng, L., Xu, H. & Liu, Z. Towards whole-body imaging at the single cell level using ultra-sensitive stem cell labeling with oligo-arginine modified upconversion nanoparticles. *Biomaterials* **33**, 4872–4881 (2012).
131. Ma, Y. *et al.* Labeling and long-term tracking of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro using NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ upconversion nanoparticles. *Acta Biomater.* **42**, 199–208 (2016).
132. Hill, J. M. *et al.* Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* **108**, 1009–1014 (2003).
133. Wang, Y. *et al.* High MR sensitive fluorescent magnetite nanocluster for stem cell tracking in ischemic mouse brain. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **7**, 1009–1019 (2011).
134. Detante, O. *et al.* Magnetic resonance imaging and fluorescence labeling of clinical-grade mesenchymal stem cells without impacting their phenotype: study in a rat model of stroke. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 333–341 (2012).
135. Cheng, L. *et al.* Multifunctional Upconversion Nanoparticles for Dual-Modal Imaging-Guided Stem Cell Therapy under Remote Magnetic Control. *Adv. Funct. Mater.* **23**, 272–280 (2013).
136. Prasad, P. N. Bioimaging: Applications. in *Introduction to Biophotonics* 255–310 (John Wiley & Sons, Inc., 2003). doi:10.1002/0471465380.ch8

Références bibliographiques

137. Soenen, S. J. *et al.* Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* **6**, 446–465 (2011).
138. Elsaesser, A. & Howard, C. V. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 129–137 (2012).
139. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. in *Assay Guidance Manual* (eds. Sittampalam, G. S. *et al.*) (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004).
140. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **4**, 26–49 (2008).
141. Bridot, J.-L. *et al.* Hybrid Gadolinium Oxide Nanoparticles: Multimodal Contrast Agents for in Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5076–5084 (2007).
142. Lechevallier, S. Synthèse et caractérisation de nanoparticules luminescentes à base de lanthanides : vers de nouveaux bio-marqueurs. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2010).
143. Osseni, S. A. Nanoplateformes hybrides multimodales pour l'imagerie médicale. (Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2012).
144. Osseni, S. A. *et al.* New nanoplatform based on Gd₂O₂S:Eu³⁺ core: synthesis, characterization and use for in vitro bio-labelling. *J. Mater. Chem.* **21**, 18365–18372 (2011).
145. Osseni, S. A. *et al.* Gadolinium oxysulfide nanoparticles as multimodal imaging agents for T₂-weighted MR, X-ray tomography and photoluminescence. *Nanoscale* **6**, 555–564 (2014).

Références bibliographiques

146. Zhan, Q. *et al.* Using 915 nm laser excited $\text{Tm}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ -doped NaYbF_4 upconversion nanoparticles for in vitro and deeper in vivo bioimaging without overheating irradiation. *ACS Nano* **5**, 3744–3757 (2011).
147. Francolon, N. *et al.* Preparation of core/shell $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ @dendrons nanoparticles with enhanced upconversion luminescence for in vivo imaging. *Nanomedicine-Nanotechnol. Biol. Med.* **12**, 2107–2113 (2016).
148. Wang, Y.-F. *et al.* Nd^{3+} -sensitized upconversion nanophosphors: efficient in vivo bioimaging probes with minimized heating effect. *ACS Nano* **7**, 7200–7206 (2013).
149. Matijevic, E. & Hsu, W. Preparation and Properties of Monodispersed Colloidal Particles of Lanthanide Compounds .1. Gadolinium, Europium, Terbium, Samarium, and Cerium(iii). *J. Colloid Interface Sci.* **118**, 506–523 (1987).
150. Algethami, M., Blencowe, A., Feltis, B. & Geso, M. Bismuth Sulfide Nanoparticles as a Complement to Traditional Iodinated Contrast Agents at Various X-Ray Computed Tomography Tube Potentials. *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.* **2017**, (2017).
151. Sovers, O. J. & Yoshioka, T. Host Cation Effects on the Fluorescence Spectrum of Eu^{3+} in Oxysulfides. *J. Chem. Phys.* **51**, 5330–5336 (1969).
152. Arppe, R. *et al.* Quenching of the upconversion luminescence of $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ and $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb^{3+} in non-radiative relaxation. *Nanoscale* **7**, 11746–11757 (2015).
153. Pleijhuis, R. G. *et al.* Near-infrared fluorescence (NIRF) imaging in breast-conserving surgery: Assessing intraoperative techniques in tissue-simulating breast phantoms. *Ejso* **37**, 32–39 (2011).

Références bibliographiques

154. Mias, C. *et al.* Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells* **26**, 1749–1757 (2008).
155. Alfarano, C. *et al.* Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis After Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. *Cell Transplant.* **21**, 2009–2019 (2012).
156. van Onna, M. *et al.* Assessment of disease activity in patients with rheumatoid arthritis using optical spectral transmission measurements, a non-invasive imaging technique. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 511–518 (2016).
157. Wang, Y.-X. J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant. Imaging Med. Surg.* **1**, 35–40 (2011).
158. Roohi, F., Lohrke, J., Ide, A., Schütz, G. & Dassler, K. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 4447–4458 (2012).
159. Beaumont, M. *et al.* Characterization of Tumor Angiogenesis in Rat Brain Using Iron-Based Vessel Size Index MRI in Combination with Gadolinium-Based Dynamic Contrast-Enhanced MRI. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 1714–1726 (2009).
160. Feliu, N. *et al.* In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* (2016). doi:10.1039/c5cs00699f
161. Yu, M. & Zheng, J. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. *Acs Nano* **9**, 6655–6674 (2015).
162. Ernsting, M. J., Murakami, M., Roy, A. & Li, S.-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J. Controlled Release* **172**, 782–794 (2013).

Références bibliographiques

163. Longmire, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomed.* **3**, 703–717 (2008).
164. Papasani, M. R., Wang, G. & Hill, R. A. Gold nanoparticles: the importance of physiological principles to devise strategies for targeted drug delivery. *Nanomedicine-Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 804–814 (2012).
165. Cacheris, W. P., Quay, S. C. & Rocklage, S. M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magn. Reson. Imaging* **8**, 467–481 (1990).
166. Firsching, F. & Brune, S. Solubility Products of the Trivalent Rare-Earth Phosphates. *J. Chem. Eng. Data* **36**, 93–95 (1991).
167. Frenzel, T., Lengsfeld, P., Schirmer, H., Hütter, J. & Weinmann, H.-J. Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37 degrees C. *Invest. Radiol.* **43**, 817–828 (2008).
168. Ruiz, A. *et al.* Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. *Nanoscale* **5**, 11400–11408 (2013).
169. Frangioni, J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 626–634 (2003).
170. Sun, Y., Feng, W., Yang, P., Huang, C. & Li, F. The biosafety of lanthanide upconversion nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 1509–1525 (2015).
171. Trounson, A. & McDonald, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* **17**, 11–22 (2015).

Références bibliographiques

172. Trounson, A. & DeWitt, N. D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 194–200 (2016).
173. Shapiro, E. M., Skrtic, S. & Koretsky, A. P. Sizing it up: Cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn. Reson. Med.* **53**, 329–338 (2005).
174. Petros, R. A. & DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 615–627 (2010).
175. Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M. & Lee, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomed.* **6**, 929–941 (2011).
176. Chou, L. Y. T., Ming, K. & Chan, W. C. W. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 233–245 (2011).
177. Skotland, T., Sontum, P. C. & Oulie, I. In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan((TM))), a contrast agent for magnetic resonance imaging. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 323–329 (2002).
178. Dumont, M. F. *et al.* DNA surface modified gadolinium phosphate nanoparticles as MRI contrast agents. *Bioconjug. Chem.* **23**, 951–957 (2012).
179. Guldris, N. *et al.* Magnetite Nanoparticles for Stem Cell Labeling with High Efficiency and Long-Term in Vivo Tracking. *Bioconjug. Chem.* **28**, 362–370 (2017).
180. Ngen, E. J. *et al.* Imaging transplanted stem cells in real time using an MRI dual-contrast method. *Sci. Rep.* **5**, 13628 (2015).
181. Mias, C. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction. *Stem Cells* **27**, 2734–2743 (2009).

Références bibliographiques

182. Aguado, B. A., Mulyasmita, W., Su, J., Lampe, K. J. & Heilshorn, S. C. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng. Part A* **18**, 806–815 (2012).
183. Zhang, M. *et al.* Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: Graft cell death and anti-death strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 907–921 (2001).
184. Leblond, F., Davis, S. C., Valdés, P. A. & Pogue, B. W. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J. Photochem. Photobiol. B* **98**, 77–94 (2010).
185. Zheng, X. *et al.* High-Contrast Visualization of Upconversion Luminescence in Mice Using Time-Gating Approach. *Anal. Chem.* **88**, 3449–54 (2016).
186. Burdick, J. A., Mauck, R. L. & Gerecht, S. To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies. *Cell Stem Cell* **18**, 13–15 (2016).
187. Ceccaldi, C. *et al.* Alginate Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell Cardiac Therapy: Influence of Alginate Composition. *Cell Transplant.* **21**, 1969–1984 (2012).
188. Ceccaldi, C. *et al.* Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta Biomater.* **10**, 901–911 (2014).
189. Ceccaldi, C. *et al.* Elaboration and evaluation of alginate foam scaffolds for soft tissue engineering. *Int. J. Pharm.* **524**, 433–442 (2017).
190. Li, J. *et al.* Near-infrared light-triggered release of small molecules for controlled differentiation and long-term tracking of stem cells in vivo using upconversion nanoparticles. *Biomaterials* **110**, 1–10 (2016).

Références bibliographiques

191. Guijarro, D. *et al.* Intramyocardial transplantation of mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia and impaired left ventricular function: Results of the MESAMI 1 pilot trial. *Int. J. Cardiol.* **209**, 258–265 (2016).
192. Administration of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Chronic Ischemic Cardiomyopathy (MESAMI2) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02462330>. (Accessed: 28th January 2018)
193. Vahrmeijer, A. L., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., van de Velde, C. J. H. & Frangioni, J. V. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 507–518 (2013).
194. Bled, E. *et al.* Real-time 3D MRI of contrast agents in whole living mice. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 275–281 (2011).
195. Ribot, E. J. *et al.* Study of the MR relaxation of microglia cells labeled with Gd-DTPA-bearing nanoparticles. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 109–117 (2009).
196. Firbank, M. J., Coulthard, A., Harrison, R. M. & Williams, E. D. A comparison of two methods for measuring the signal to noise ratio on MR images. *Phys. Med. Biol.* **44**, N261-264 (1999).
197. Douin-Echinard, V. *et al.* Estradiol administration controls eosinophilia through estrogen receptor-alpha activation during acute peritoneal inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 145–154 (2011).
198. Poitevin, S. *et al.* Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity. *Cardiovasc. Res.* **103**, 121–130 (2014).
199. Payré, B. *et al.* Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3707–3718 (2008).

Références bibliographiques

200. de Medina, P. *et al.* Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 1165–1173 (2004).
201. Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–1131 (2008).
202. Latifi-Pupovci, H. *et al.* In vitro migration and proliferation ('wound healing') potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271(+) bone marrow mononuclear cells. *J. Transl. Med.* **13**, 315 (2015).
203. Liang, C.-C., Park, A. Y. & Guan, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333 (2007).
204. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
205. Neuhuber, B., Swanger, S. A., Howard, L., Mackay, A. & Fischer, I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp. Hematol.* **36**, 1176–1185 (2008).

Summary

Lanthanide-based multimodal nanoparticles for biomedical imaging and mesenchymal cells tracking.

The objective of these works was to put into practice the use of lanthanide-based multimodal nanoparticles (NPs) for biomedical imaging in general and mesenchymal cells (MSCs) tracking in particular. To that purpose, two types of NPs have been used, both presenting a gadolinium oxysulfide ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$) matrix allowing magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography. The addition of dopant elements brings fluorescence properties: europium ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$) is more appropriate for an *in vitro* examination whereas the combination ytterbium/thulium ($\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$) is more appropriate for an *in vivo* examination through the up-conversion process.

First, we have demonstrated the possibility of visualizing those NPs over-time in a living organism with complementary methods (MRI and fluorescence). The complete study of their biodistribution and ways of elimination allowed us to highlight a hepatobiliary metabolization associated with a slow feces excretion.

The labeling of a wide variety of cell types (lines and primary cells from different species) has also pointed out their potential as a universal cell tracer.

Thereafter, we focused our research on mesenchymal cells tracking in a cell therapy context. Short, medium and long term biocompatibility was validated via a series of analyses (MTT, neutral red, wound healing and differentiation) and the reliability of the tracer was confirmed by detailed study of the cell labeling.

Finally, after developing a custom-made system dedicated to up-conversion imaging in small animals, we were able to perform over-time tracking of those labeled cells after injection in a solid organ. We achieved multimodal imaging of the MSCs with MRI, computed tomography and up-conversion.

Altogether, these results underline the potential of these nanoparticles for long term imaging in preclinical and/or clinical studies.

Key words: lanthanide oxysulfide nanoparticles; multimodal biomedical imaging; fluorescence; magnetic resonance imaging; computed tomography; mesenchymal cells tracking.

Résumé

Nanoparticules multimodales à base de lanthanides pour l'imagerie biomédicale et le suivi de cellules mésenchymateuses.

L'objectif de ces travaux a été de mettre en pratique l'utilisation de nanoparticules multimodales (NPs) à base de lanthanides pour l'imagerie biomédicale en général et le suivi de cellules mésenchymateuses (MSCs) en particulier. Dans cette optique, deux types de NPs ont été utilisées, présentant toutes deux une matrice d'oxysulfure de gadolinium (Gd_2O_2S) permettant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie. L'ajout d'éléments dopants apporte des propriétés de fluorescence : l'euporium ($Gd_2O_2S :Eu^{3+}$), plus adapté à un examen *in vitro* et le couple ytterbium/thulium ($Gd_2O_2S :Yb^{3+}/Tm^{3+}$) à un examen *in vivo* grâce au phénomène de conversion ascendante de photons (up-conversion).

Nous avons, dans un premier temps, démontré la possibilité de visualiser ces NPs au cours du temps au sein d'un organisme vivant par des méthodes complémentaires (IRM et fluorescence). L'étude complète de leur distribution et des voies d'élimination nous a permis de mettre en évidence une métabolisation hépatobiliaire associée à une lente excrétion dans les fèces.

Le marquage d'un grand nombre de types cellulaires (lignées et cellules primaires d'espèces différentes) a également mis en avant leur potentiel en tant que traceur cellulaire universel.

Nous avons par la suite concentré nos travaux sur le suivi de cellules mésenchymateuses dans un contexte de thérapie cellulaire. La biocompatibilité cellulaire à court, moyen et long terme a été validée par une série d'analyses (MTT, rouge neutre, wound healing, différenciation) et la fiabilité du traceur a été confirmée par l'étude approfondie du marquage cellulaire.

Enfin, après mise au point d'un système personnalisé dédié à l'imagerie par up-conversion chez le petit animal, nous avons pu réaliser le suivi de ces cellules marquées, au cours du temps après injection dans un organe solide. Nous avons alors été en mesure de visualiser les MSCs par imagerie multimodale : IRM ; tomodensitométrie et fluorescence par up-conversion.

L'ensemble de ces résultats met en avant le potentiel de ces nanoparticules pour l'imagerie à long terme dans des études précliniques et/ou cliniques.

Mots clés : nanoparticules d'oxysulfure de lanthanides ; imagerie biomédicale multimodale ; fluorescence ; imagerie par résonance magnétique ; tomodensitométrie ; suivi de cellules mésenchymateuses.