



HAL
open science

Nanohybrides superparamagnétiques à luminescence persistante : conception et application au marquage cellulaire pour la vectorisation magnétique *in vivo*

Eliott Teston

► **To cite this version:**

Eliott Teston. Nanohybrides superparamagnétiques à luminescence persistante : conception et application au marquage cellulaire pour la vectorisation magnétique *in vivo*. Imagerie. Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT: . tel-02395159

HAL Id: tel-02395159

<https://hal.science/tel-02395159>

Submitted on 5 Dec 2019

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.



Ecole Doctorale : MTCI - ED 563

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Interface chimie-biologie

présentée par

Elliott TESTON

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Nanohybrides superparamagnétiques à luminescence
persistante : conception et application au marquage
cellulaire pour la vectorisation magnétique *in vivo*

Soutenue le 14 avril 2016

devant le jury composé de :

M. Jean-Olivier DURAND	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
Mme Christine MENAGER	Professeur, CNRS	Rapporteur
M. Jean-Luc COLL	Directeur de Recherche, Inserm	Examineur
M. Thierry GACOIN	Directeur de Recherche, CNRS	Examineur
Mme Amanda SILVA	Chargée de Recherche, CNRS, Paris VII	Examineur
M. Cyrille RICHARD	Chargé de Recherche, CNRS, Paris V	Directeur de Thèse

Préface

En 1959, Richard Feynman avait tenté d'imaginer les applications potentielles d'une science miniature, d'une physique nous permettant de manipuler les atomes un par un afin de construire avec précision des outils moléculaires aussi petits que possible.* Il venait ainsi d'introduire l'idée des nanotechnologies, terme introduit en 1974 par Norio Taniguchi.**

Aujourd'hui, les nanotechnologies connaissent des applications dans des domaines scientifiques variés et de nombreuses applications existent en recherche médicale. La possibilité d'utiliser ces technologies pour comprendre des phénomènes biologiques était déjà pressentie par Richard Feynman comme une potentielle révolution.* De nombreuses nanoparticules ont déjà été utilisées comme outil d'imagerie moléculaire, cellulaire ou à l'échelle du petit animal, mais peu ont montré une efficacité pour le suivi cellulaire *in vivo*.

La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules comme médicament injectable dans le but de favoriser la réparation d'un tissu ou d'un organe. Certaines cellules possèdent la propriété de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Elles présentent un intérêt pour le développement d'un traitement des ischémies des membres inférieurs ou du myocarde.

Déterminer le devenir de ces cellules après injection *in vivo* est important pour comprendre les mécanismes responsables de l'efficacité d'un tel traitement. Cependant, il est difficile à observer et très peu décrit dans la littérature. Quelques exemples d'utilisation de nanotechnologies sont rapportés pour suivre des cellules *in vivo*. Mais des facteurs limitant tels qu'une complexité de mise en oeuvre de ces techniques ou leur trop faible sensibilité rend difficile leur utilisation *in vivo*.

Ce travail de thèse propose de décrire le développement de nanoparticules originales associant les modalités d'imagerie optique et d'IRM afin de marquer simplement des cellules ayant un potentiel thérapeutique. Les protocoles développés ont permis de vectoriser et suivre en temps réel des cellules après injection chez la souris.

* R. P. Feynman. There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics. Engineering and Science. 1960, 22.

** N. Taniguchi. On the basic concept of "Nano-technology". Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo. 1974, 18.

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Daniel Scherman et Cyrille Richard pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leur laboratoire

J'adresse aussi mes remerciements à Biospace Lab et le CNRS pour avoir accepté de financer ce projet

Je souhaite remercier vivement Thomas, qui m'a fait découvrir son sujet de thèse, m'a donné l'opportunité de travailler avec lui sur le projet ODICEO, m'a énormément appris et soutenu dans les moments de doute

Merci à tous les membres de l'équipe "Thérapeutiques innovantes en hémostasie" qui ont pris de leur temps pour m'aider dans mes manip cellulaires et répondre à mes nombreuses questions : Catherine, Anna, Elène, Nour, Isabelle, Dominique et Blandine

J'ai beaucoup apprécié travailler et discuter avec Didier et Bruno, de l'IRCP, merci beaucoup pour votre disponibilité, votre gentillesse et vos éclairages avisés

Merci aux membres du MSC pour m'avoir accueilli pour quelques expériences et de nombreuses heures de rédaction, notamment Iris et Jeanne

J'ai été ravi de rencontrer et travailler avec toutes les personnes incluses dans le projet ODICEO : Florence, Laurence, Olivier et Yoann

Merci à Hélène pour les noix et l'ambiance dans le bureau

Merci à Virginie et Pascal pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire pour mon stage de M2 et m'avoir appris la culture cellulaire

Merci à toutes les personnes, doctorants, post-doctorants, ingénieurs et chercheurs avec qui j'ai pu travailler ou avoir des discussions enrichissantes : Marie, Johanne, Nelly, Nathalie, Alice, Simona, Katia, Max, Mickaël, Magali, Céline, Antoine, Dimitri, Julie...

Merci à Maxime, Federica, Gonzalo et Chantévy qui sont passés m'aider dans mes expériences au détour d'un stage ou de leur thèse

Merci à toute l'équipe du Palais de la Découverte pour m'avoir accueilli et pour les bons moments passés à jouer avec l'air liquide : Sokunthéa, Ludovic, Claire, Florence, Frédérique, Véronique, Gérard (sans qui ce ne serait pas possible) et Monica

Merci aux Nanotres pour tous ces moments nanoparticuliers

Un immense merci à toutes les personnes qui m'ont aidé dans mes expériences : René et Bruno de la plateforme de MET, Laetitia et Gwenn à l'HEGP, Dan au MSC

Enfin, je ne saurais remercier assez toutes les personnes qui m'ont soutenu ces dernières années, ma famille, mes amis : Dhanyavad, Kopun Kap et Yech'ed mat

Table des matières

INTRODUCTION

I. <u>L'IMAGERIE OPTIQUE</u>	p. 15
A. <u>PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LUMINESCENCE</u>	p. 17
∇	
1) <u>La photoluminescence : fluorescence ou phosphorescence ?</u>	p. 18
2) <u>Cas particuliers de photoluminescence</u>	p. 20
a) <u>Fluorescence anti-Stokes et optique non linéaire</u>	p. 20
i. <u>La conversion ascendante de photons</u>	p. 21
- α . <u>L'addition de photons par transfert d'énergie</u>	p. 21
- β . <u>L'avalanche de photons</u>	p. 21
- γ . <u>L'absorption d'un état excité</u>	p. 22
ii. <u>L'absorption à deux photons ou fluorescence biphotonique</u>	p. 22
iii. <u>Le doublage de fréquence ou génération de seconde harmonique</u>	p. 22
b) <u>Le confinement quantique</u>	p. 25
3) <u>Autres phénomènes de luminescence</u>	p. 28
a) <u>La chimiluminescence</u>	p. 28
b) <u>L'électroluminescence</u>	p. 29
c) <u>La mécanoluminescence</u>	p. 29
i. <u>La triboluminescence</u>	p. 30
ii. <u>La piézoluminescence</u>	p. 30
iii. <u>La sonoluminescence</u>	p. 31
d. <u>La thermoluminescence</u>	p. 32
4) <u>La luminescence persistante</u>	p. 33
a) <u>Historique</u>	p. 33
b) <u>Mécanisme général</u>	p. 35
i. <u>Les défauts</u>	p. 35
ii. <u>Conséquence de l'illumination</u>	p. 36
iii. <u>Emission lumineuse</u>	p. 37
c) <u>Les matériaux utilisés au laboratoire</u>	p. 37
i. <u>Les silicates</u>	p. 38
ii. <u>Le gallate de zinc</u>	p. 40
B. <u>APPLICATIONS EN IMAGERIE OPTIQUE</u>	p. 44
R	
1) <u>Les nanoparticules pour la modalité optique</u>	p. 44
a) <u>Notions de base en imagerie optique</u>	p. 44
i. <u>Les fenêtres de transparence des tissus</u>	p. 44
ii. <u>Le phénomène d'autofluorescence</u>	p. 45

iii. Diffusion et résolution spatiale.....	p. 46
b) Quels outils pour la modalité optique ?.....	p. 49
i. Utilisations et limites des fluorophores organiques moléculaires.....	p. 49
ii. Nanoparticules pour la modalité optique.....	p. 51
- α . Nanoparticules "cargos" de fluorophores organiques.....	p. 51
Les nanoparticules de silice.....	p. 51
Les nanoparticules de phosphate de calcium.....	p. 53
Les dendrimères.....	p. 53
Les nanoparticules polymériques.....	p. 54
Les polymersomes.....	p. 55
Les liposomes.....	p. 56
Les lipoprotéines.....	p. 58
Les virus.....	p. 60
Les vésicules cellulaires.....	p. 61
- β . Nanoparticules fluorescentes.....	p. 62
Les nanoparticules de carbone.....	p. 62
Les boîtes quantiques, ou quantum-dots.....	p. 67
L'optique non linéaire.....	p. 69
- γ . Nanoparticules à luminescence persistante.....	p. 72
c) Les nanoparticules luminescentes pour le suivi cellulaire.....	p. 77
II. L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE.....	p. 81
A. PRINCIPE PHYSIQUE.....	p. 82
∇	
1) <u>La résonance magnétique nucléaire</u>	p. 83
a) Le moment magnétique de spin.....	p. 83
b) La précession de Larmor.....	p. 84
c) Les relaxations.....	p. 85
2) <u>Application médicale</u>	p. 87
a) Historique.....	p. 87
b) Détails techniques.....	p. 87
i. Aimants et champs.....	p. 87
ii. Que voit-on en T_1	p. 88
iii. ... et en T_2 ?.....	p. 88
c) Les agents de contraste.....	p. 89
B. APPLICATIONS EN NANOTECHNOLOGIE.....	p. 91
B	
1) <u>Les agents de contraste positif</u>	p. 91
a) Les complexes ioniques.....	p. 91
b) Les nanoparticules.....	p. 93
2) <u>Les agents de contraste négatif</u>	p. 95

a) Les oxydes de fer	p. 95
b) Les dérivés du Dysprosium	p. 96
3) Les nanoparticules magnétiques pour le suivi cellulaire	p. 97
a) Le suivi cellulaire en T ₁ ...	p. 97
b) ... et en T ₂	p. 98
III. LA MULTIMODALITE	p. 101
1) Principe général	p. 103
2) Les nanoparticules multimodales pour l'imagerie optique et l'IRM	p. 103
a) Association nanoparticules magnétiques et fluorophores	p. 103
b) Association nanoparticules luminescentes et gadolinium	p. 104
3) Les agents multimodaux pour le suivi cellulaire	p. 106
4) Les agents multimodaux pour la vectorisation cellulaire	p. 106
CONCLUSION DE L'INTRODUCTION	p. 111

RESULTATS

IV. SYNTHESE D'UN NANO-OUTIL MULTIMODAL	p. 117
1) Introduction	p. 119
2) Synthèse, composition, morphologie et caractéristiques physicochimiques	p. 119
a) Synthèse et composition	p. 120
b) Propriétés hydrodynamiques	p. 122
c) Porosité des MPNH	p. 123
3) Propriétés optiques et magnétiques des nanohybrides	p. 123
a) Propriétés d'absorption et d'émission des MPNH	p. 123
b) Déclins de luminescence	p. 124
c) Caractérisations magnétiques	p. 125
4) Comportement <i>in vivo</i> des nanohybrides	p. 128
a) Fonctionnalisation des MPNH	p. 128
b) Imagerie optique et IRM <i>in vivo</i>	p. 129
c) Luminescence <i>ex vivo</i>	p. 131
5) Marquage cellulaire et toxicité	p. 132
6) Conclusion	p. 133

7) <u>Limites et perspectives</u>	p. 134
8) <u>Section expérimentale</u>	p. 134
V. MARQUAGE ET SUIVI CELLULAIRE	p. 139
1) <u>Introduction</u>	p. 142
a) <u>Le marquage cellulaire</u>	p. 142
i. <u>Le marquage passif</u>	p. 143
ii. <u>Le marquage actif</u>	p. 144
b) <u>La toxicité</u>	p. 145
i. <u>Le MTT</u>	p. 145
ii. <u>Le WST-8</u>	p. 146
iii. <u>L'Alamar Blue</u>	p. 147
iv. <u>La cytométrie en flux</u>	p. 147
v. <u>Le bleu de trypan</u>	p. 148
c) <u>Le suivi cellulaire <i>in vivo</i></u>	p. 148
2) <u>Travaux préliminaires : marquage et toxicité des ZGO</u>	p. 149
a) <u>Internalisation</u>	p. 149
b) <u>Toxicité</u>	p. 152
i. <u>Le problème de l'absorbance : influence sur le MTT</u>	p. 153
ii. <u>Interaction nanoparticules/MTT et WST-8</u>	p. 157
iii. <u>Alamar Blue</u>	p. 162
iv. <u>Cytométrie en flux</u>	p. 166
v. <u>Le test au bleu de trypan</u>	p. 167
c) <u>Suivi cellulaire <i>in vivo</i></u>	p. 167
3) <u>Marquage cellulaire et toxicité <i>in vitro</i> des MPNH</u>	p. 169
a) <u>Toxicité</u>	p. 169
i. <u>Tests MTT</u>	p. 170
ii. <u>Tests Alamar Blue</u>	p. 174
iii. <u>Comment expliquer les différences MMT/AB</u>	p. 177
iv. <u>Tests de prolifération cellulaire</u>	p. 178
b) <u>Internalisation</u>	p. 180
i. <u>Microscopie électronique</u>	p. 180
ii. <u>Expérience de magnétophorèse</u>	p. 184
iii. <u>Expérience d'IRM</u>	p. 185
iv. <u>Mesure de luminescence</u>	p. 186
c) <u>Evaluation des propriétés cellulaires</u>	p. 187
i. <u>Capacité de migration</u>	p. 187
ii. <u>Capacité à former des ébauches vasculaires</u>	p. 190
4) <u>Vectorisation magnétique <i>in vivo</i></u>	p. 193
5) <u>Conclusion</u>	p. 199

6) <u>Limites et perspectives de la vectorisation cellulaire avec les MPNH</u>	p. 200
7) <u>Section expérimentale</u>	p. 201
<u>VI. LIMITES ET PERSPECTIVES</u>	p. 207
1) <u>Suivi de la dégradation des MPNH</u>	p. 209
a) <u>Dégradation <i>in vitro</i></u>	p. 209
i. <u>Introduction</u>	p. 209
ii. <u>Evolution des propriétés de luminescence</u>	p. 210
iii. <u>Evolution du signal de RPE</u>	p. 211
iv. <u>Suivi de la dégradation en MET</u>	p. 211
b) <u>Toxicité et dégradation <i>in vivo</i></u>	p. 214
c) <u>Luminescence</u>	p. 217
d) <u>Conclusion</u>	p. 221
e) <u>Section expérimentale</u>	p. 221
2) <u>Pistes d'amélioration de la synthèse des ZGO</u>	p. 222
a) <u>La voie de synthèse micro-ondes</u>	p. 223
i. <u>Introduction</u>	p. 223
ii. <u>Synthèse, composition et caractéristiques physicochimiques</u>	p. 223
iii. <u>Propriétés de luminescence et utilisation <i>in vivo</i></u>	p. 227
iv. <u>Toxicité</u>	p. 229
v. <u>Conclusion</u>	p. 229
b) <u>Synthèse par combustion</u>	p. 230
c) <u>Amélioration de la synthèse hydrothermale</u>	p. 233
i. <u>Empêcher le frittage</u>	p. 233
ii. <u>Optimiser les paramètres</u>	p. 235
d) <u>Conclusion</u>	p. 239
e) <u>Section expérimentale</u>	p. 239
<u>VII. CONCLUSION GENERALE</u>	p. 243
<u>VIII. ANNEXES</u>	p. 247

Liste des abréviations

AB	Alamar Blue
BC	Bande de conduction
BV	Orbitale électronique la plus basse vacante
CLOA	Combinaison linéaire d'orbitales atomiques
CNT	Acronyme anglais des nanotubes de carbone (carbon nanotubes)
CMSO	CaMgSi ₂ O ₆ composition de la première génération de NPLP améliorée
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
CZMSO	Ca _{0,2} Zn _{0,9} Mg _{0,9} Si ₂ O ₆ , composition de la première génération de NPLP
DEL	Diode électro-luminescente
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRX	Diffraction de rayons X
Eau mQ	Eau milliQ
EDTA	Acide éthylène Diamine Tétracétique
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine (fluorescein isothiocyanate)
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GFP	Acronyme anglais de la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein)
h	Heure
HBSS	Hank's balanced salt solution
HO	Orbitale électronique la plus haute occupée par des électrons
HRTEM	Microscopie électronique à transmission haute résolution
HUVEC	Cellules endothéliales ombilicales humaines
IC₁₀	Concentration inhibitrice de 10 % d'un processus biologique
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 % d'un processus biologique
IONP	Nanoparticules d'oxyde de fer
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDH	Lactate déshydrogénase
min	Minute
MPNH	Nanohybride mésoporeux
MET	microscopie électronique à transmission
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NPLP	Nanoparticules à luminescence persistante
OA	Orbitale atomique
OM	Orbitale moléculaire
PBD	Polybutadiène
PEG	Polyéthylène glycol
PEO	Oxyde de polyéthylène
PMS	5-méthylphénazinium méthyl sulfate
PO-PEG	Polyéthylène glycol phosphonate
QD	Quantum-dots, nom anglais des boîtes quantiques
RMN	Résonance magnétique nucléaire
USNPLP	Ultra small NPLP (très petites NPLP)
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques de moins de 5 nm)
UV	Ultraviolets
WST	(2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium de sodium
ZGO	Oxyde de zinc et de gallium de composition ZnGa ₂ O ₄ dopé au Cr ³⁺

INTRODUCTION

I. L'IMAGERIE OPTIQUE

A. PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LUMINESCENCE	p. 17
1) La photoluminescence : fluorescence ou phosphorescence ?	p. 18
2) Cas particuliers de photoluminescence	p. 20
a) Fluorescence anti-Stokes et optique non linéaire	p. 20
i. La conversion ascendante de photons	p. 21
- α . L'addition de photons par transfert d'énergie	p. 21
- β . L'avalanche de photons	p. 21
- γ . L'absorption d'un état excité	p. 22
ii. L'absorption à deux photons ou fluorescence biphotonique	p. 22
iii. Le doublage de fréquence ou génération de seconde harmonique	p. 22
b) Le confinement quantique	p. 25
3) Autres phénomènes de luminescence	p. 28
a) La chimiluminescence	p. 28
b) L'électroluminescence	p. 29
c) La mécanoluminescence	p. 29
i. La triboluminescence	p. 30
ii. La piézoluminescence	p. 30
iii. La sonoluminescence	p. 31
d. La thermoluminescence	p. 32
4) La luminescence persistante	p. 33
a) Historique	p. 33
b) Mécanisme général	p. 35
i. Les défauts	p. 35
ii. Conséquence de l'illumination	p. 36
iii. Emission lumineuse	p. 37
c) Les matériaux utilisés au laboratoire	p. 37
i. Les silicates	p. 38
ii. Le gallate de zinc	p. 40
B. APPLICATIONS EN IMAGERIE OPTIQUE	p. 44
1) Les nanoparticules pour la modalité optique	p. 44
a) Notions de base en imagerie optique	p. 44
i. Les fenêtres de transparence des tissus	p. 44
ii. Le phénomène d'autofluorescence	p. 45
iii. Diffusion et résolution spatiale	p. 46
b) Quels outils pour la modalité optique ?	p. 49
i. Utilisations et limites des fluorophores organiques moléculaires	p. 49
ii. Nanoparticules pour la modalité optique	p. 51

- α . Nanoparticules "cargos" de fluorophores organiques.....	p. 51
Les nanoparticules de silice.....	p. 51
Les nanoparticules de phosphate de calcium.....	p. 53
Les dendrimères.....	p. 53
Les nanoparticules polymériques.....	p. 54
Les polymersomes.....	p. 55
Les liposomes.....	p. 56
Les lipoprotéines.....	p. 58
Les virus.....	p. 60
Les vésicules cellulaires.....	p. 61
- β . Nanoparticules fluorescentes.....	p. 62
Les nanoparticules de carbone.....	p. 62
Les boîtes quantiques, ou quantum-dots.....	p. 67
L'optique non linéaire.....	p. 69
- γ . Nanoparticules à luminescence persistante.....	p. 72
c) Les nanoparticules luminescentes pour le suivi cellulaire.....	p. 77

A. PRINCIPES FONDAMENTAUX DE LUMINESCENCE

Cette première partie très générale sur les phénomènes de luminescence est inspirée d'un des trois exposés que j'ai eu la chance de présenter au Palais de la Découverte pendant deux ans. Cet exposé grand public, intitulé "une chimie lumineuse", a été construit en grande partie à l'aide de deux livres de Bernard Valeur, Professeur émérite au Conservatoire National des Arts et Métiers : Lumière et luminescence et Invitation à la fluorescence moléculaire.

La luminescence est, par opposition à l'incandescence, une émission "froide" de lumière. Lorsqu'une substance est suffisamment chauffée, on obtient une émission de lumière qui est intrinsèquement liée à la température : c'est le phénomène d'incandescence. La plupart de la lumière qui nous entoure est produite par incandescence, le soleil, le feu et les ampoules à incandescence en sont de bons exemples. Instinctivement, nous sommes capables de lier une couleur d'un matériau incandescent à sa température : nous devinons qu'un matériau légèrement rougeoyant est moins chaud qu'un autre jaune vif voire blanc. La longueur d'onde d'émission maximale est donnée par la loi de Wien.

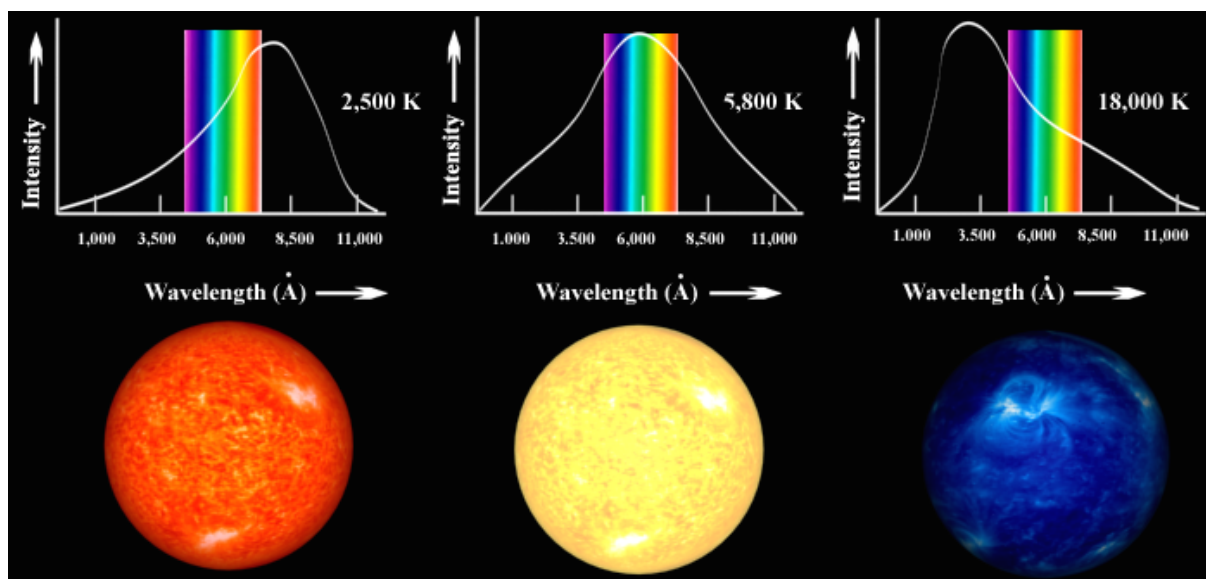


Figure 1.1. Phénomène d'incandescence illustré par les spectres d'émission caractéristiques de différentes étoiles. La couleur dominante est liée à la température de surface (les couleurs sont exagérées). De gauche à droite : une géante rouge telle que Bételgeuse (étoile α de la constellation d'Orion), une naine jaune comme le soleil et une géante bleu telle que Bellatrix (étoile γ de la constellation d'Orion), les températures de surface respectives sont 2500, 5800 et 18000 K.

Cependant, la luminescence, qui résulte d'interactions entre particules électriquement chargées, est plus fréquente que ce que l'on peut penser. La plupart du temps, la lumière émise provient de transitions électroniques ayant lieu dans des atomes, des molécules ou des cristaux. Cette énergie, libérée sous forme de photons, peut être initialement fournie sous forme chimique, mécanique, électrique et même lumineuse. Ces différents modes d'excitation permettent de distinguer une dizaine de sous-catégories de luminescences, présentées dans ce premier chapitre.

1) La photoluminescence : fluorescence ou phosphorescence ?

C'est la forme la plus courante de luminescence : l'énergie initiale est fournie par de la lumière qui est absorbée et entraîne ensuite une émission lumineuse. Elle se divise en deux types distincts, la fluorescence et la phosphorescence. Ces phénomènes sont schématisés sur la Figure 1.2 : dans les deux cas, l'illumination, ou excitation (flèches bleues pleines), mène d'un état fondamental (appelé S_0) à un état excité dit singulet (S_1). Ce phénomène d'absorption a une durée de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s). Il est suivi par une relaxation non radiative (flèches bleues pointillées) qui dure de l'ordre de la picoseconde (10^{-12} s). La différence notable entre la fluorescence et la phosphorescence se produit lors du mécanisme de retour à l'état d'origine S_0 .

Ces deux états, S_0 et S_1 , sont caractérisés par un même spin, ce qui autorise une transition avec absorption ou émission de photon entre ces deux états (le niveau d'énergie change, transition 0- \rightarrow 1, sans que le spin ne change, ces deux changements ne peuvent s'effectuer lors d'une même transition). On dit qu'une telle transition optique respecte les règles de sélection. La fluorescence est un retour rapide à l'état S_0 avec émission de lumière (flèches vertes pleines), l'ordre de grandeur de la durée caractéristique d'un tel phénomène est la nanoseconde (10^{-9} s).

Pour certains matériaux, on observe une interaction entre le spin d'électrons et leurs mouvements, ce phénomène est appelé couplage ou interaction spin-orbite. Il peut être la cause d'une transition supplémentaire entre l'état S_1 et un état T_1 , appelée conversion intersystème (CIS, flèche jaune pointillée), lors de laquelle le spin de l'électron s'inverse. Cet état T_1 , appelé état triplet, n'a pas le même spin que l'état fondamental S_0 et une

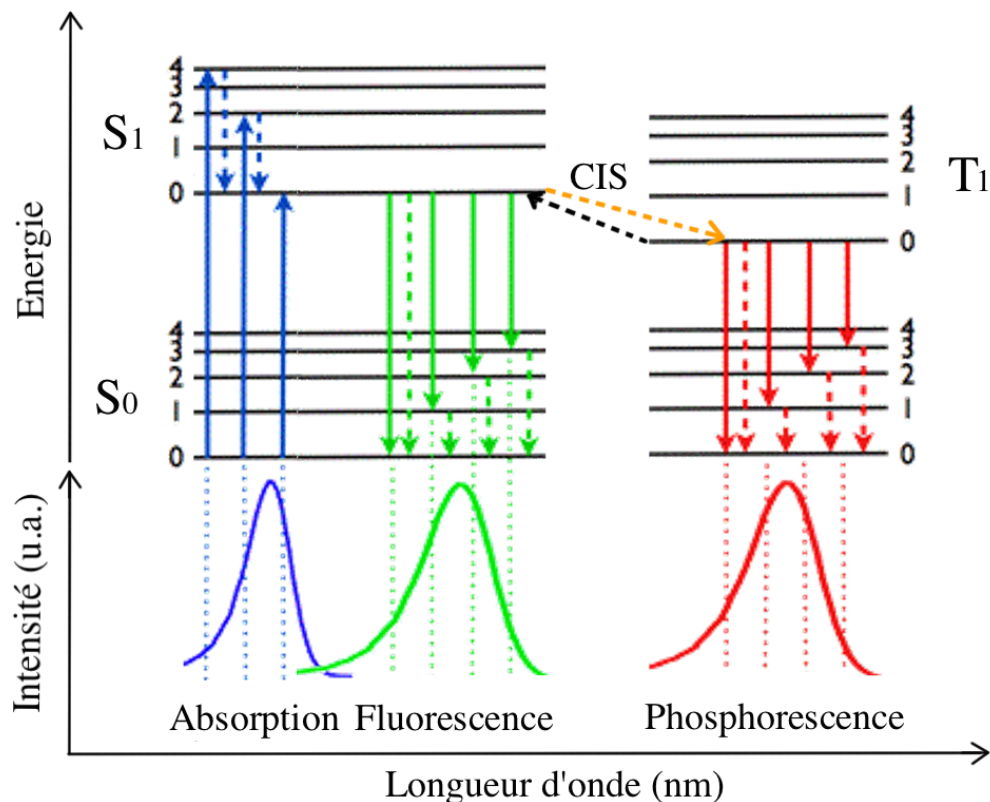


Figure 1.2. Diagrammes de Jablonski représentant les phénomènes de fluorescence, phosphorescence et fluorescence retardée. Les flèches pleines correspondent à des transitions énergétiques radiatives (absorption ou émission d'un photon). Les flèches pointillées correspondent à des transitions non radiatives.

transition $T_1 \rightarrow S_0$ nécessiterait en même temps un changement de spin et une émission de photon (un changement de niveau d'énergie), ce qui est interdit par les règles de sélection. "Interdit", en physique quantique, se traduit par une probabilité beaucoup plus faible de se produire, ce qui a pour conséquence de "ralentir" le phénomène de désexcitation qui va alors avoir lieu sur une durée de l'ordre de la milliseconde pour la plupart des matériaux phosphorescents (flèches rouges pleines). Certaines substances ont des états triplets qui peuvent persister pendant plusieurs minutes ou heures, et, à condition que le rendement quantique soit assez élevé, ils peuvent être utilisés en biologie, dans des peintures, des montres ou des jouets (Figure 1.3).

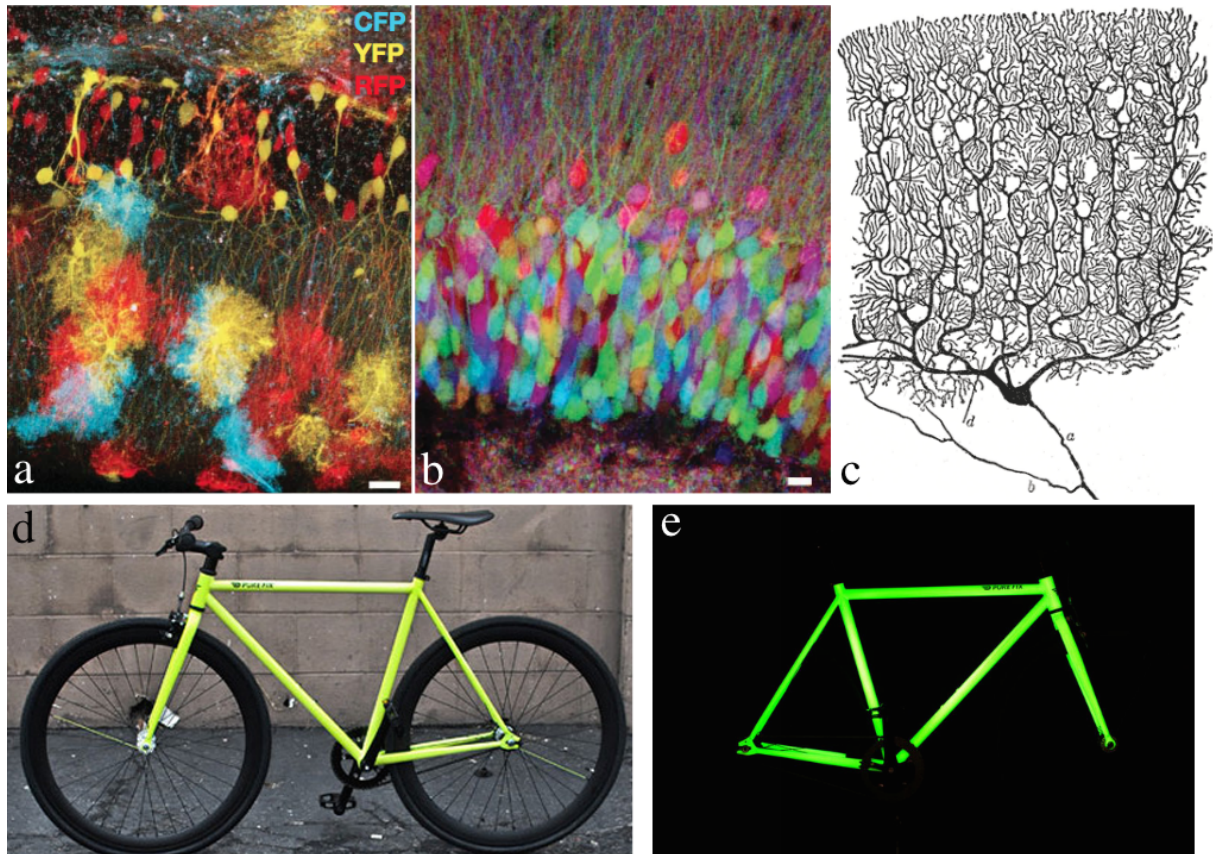


Figure 1.3. Exemple d'utilisations de la fluorescence et de la phosphorescence. a-b) Images de fluorescence de coupes du gyrus denté, zone du cortex cérébral responsable notamment de la formation des souvenirs. Les neurones ont été transfectés pour exprimer trois protéines fluorescentes différentes : une cyan (CFP), une jaune (YFP) et une rouge (RFP) pouvant être excitées à différentes longueurs d'onde (440, 515 et 568 nm, respectivement).¹ Leur mélange permet théoriquement d'obtenir au moins 10 couleurs différentes. Les barres représentent 10 μm . Si les images de "brainbow" obtenues en fluorescence permettent de déterminer les réseaux architecturaux spatiaux ou les circuits synaptiques du cerveau, les premiers marquages de neurones remontent aux colorations argentiques de Golgi utilisées par Santiago Ramon y Cajal (c) et lui permirent de mettre en évidence leur existence (ici une représentation de cellule de Purkinje). d-e) Vélo "fixie" au cadre phosphorescent vu à la lumière du jour (d) ou dans le noir (e).

Un cas particulier peut survenir : il peut y avoir une transition $T_1 \rightarrow S_1$ de l'état triplet vers l'état singulet (flèche noire pointillée), soit par activation thermique, soit par interaction de deux molécules dans ce même état triplet produisant une seule molécule dans l'état singulet. Il s'ensuit une désexcitation $S_1 \rightarrow S_0$ comme pour la fluorescence, mais ce phénomène est appelé fluorescence retardée. Dans le cas où la transition $T_1 \rightarrow S_1$ est stimulée thermiquement, on dit qu'il s'agit de fluorescence retardée de type E. Les

¹ Jean Livet et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. Nature, 2007, 450, 56.

populations d'état S_1 et T_1 étant en équilibre thermique, les durées de vie de la fluorescence retardée de type E et de la phosphorescence concomitante sont identiques. Lorsque cette fluorescence retardée est due à l'interaction de deux états triplets (annihilation triplet-triplet), on dit qu'elle est de type P. Dans ce cas, la demi-vie de la fluorescence retardée est deux fois inférieure à celle de la phosphorescence.²

Quelques remarques supplémentaires peuvent être faites :

- il peut y avoir une transition d'un état excité (S_1 ou T_1) vers l'état fondamental (S_0) sans émission de photon. Ce phénomène est appelé quenching (ou, moins communément, désactivation en français). Cela peut-être favorisé par des conditions environnementales particulières comme le pH, la force ionique ou la présence de certaines substances quenchers (désactivatrices).

- il existe de nombreux états vibrationnels pour chaque niveau d'énergie (représentés par des niveaux 1, 2, 3 et 4 sur la Figure 1.2). Des transitions non radiatives entre ces niveaux surviennent en quelques picosecondes, avant tout nouveau changement de niveau d'énergie. Ainsi, toute désexcitation (pour tous les phénomènes de photoluminescence) ira du niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité vers un niveau vibrationnel aléatoire du niveau fondamental (règle de Kasha). Cela a pour conséquence principale que, dans la plupart des cas, l'énergie des photons émis sera inférieure à celle des photons absorbés (qui vont généralement du niveau vibrationnel le plus bas de l'état S_0 à un niveau vibrationnel quelconque du niveau S_1), entraînant un décalage du spectre d'émission vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption. Ce phénomène est accentué pour la phosphorescence car l'état triplet T_1 a une énergie inférieure à l'état singulet S_1 (les différences de longueurs d'onde entre maxima d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence sont exagérées sur la Figure 1.2, ces décalages sont appelés déplacements de Stokes). De plus, le retour à l'état fondamental peut se faire via un grand nombre d'états vibrationnels (aux énergies très proches) de cet état, expliquant l'obtention d'un spectre continu et non discret.

2) Cas particuliers de photoluminescence

Les deux paragraphes suivants présentent des phénomènes de luminescence légèrement différents de ceux évoqués précédemment. Ces phénomènes sont pourtant appelés "fluorescence", mais les mécanismes physiques qui ont lieu ne sont pas ceux de la fluorescence classique.

a) Fluorescence anti-Stokes et optique non linéaire

*"Les divergences avec la loi de Stokes pourraient, d'après une suggestion d'Einstein, provenir d'un emprunt d'énergie de l'électron libéré au mouvement d'agitation thermique moléculaire. Kowalski a montré que ces divergences s'atténuent fortement dans l'air liquide"*³

Au paragraphe précédent, j'ai introduit le concept de déplacement de Stokes, qui est la différence entre la longueur d'onde du pic d'émission de fluorescence et celle du pic

² IUPAC Goldbook. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. ISBN 0-9678550-9-8.

³ Maurice Curie. Photoluminescence des solutions solides. J. Phys. Radium, 1924, 5 (3), 65.

d'absorption du fluorophore considéré. Pour des raisons de "pertes d'énergie" non radiatives ayant lieu entre l'absorption et l'émission, ce déplacement est a priori positif. Pourtant, certains matériaux ont un pic d'émission de fluorescence de longueur d'onde inférieure au pic d'absorption, et donc un déplacement de Stokes négatif ou anti-Stokes. Ce phénomène, loin de violer le principe de conservation de l'énergie, peut apparaître lorsqu'un supplément d'énergie est fourni au fluorophore en même temps qu'il absorbe un photon. Cette énergie peut provenir d'une collision entre deux molécules de fluorophores ou d'un phonon au sein d'un cristal qui vont modifier l'état vibrationnel au sein d'un même niveau d'énergie. Dans le premier cas, ce phénomène s'observe à haute température et en phase gazeuse. Dans ces deux exemples l'augmentation de l'énergie du photon ensuite émis est faible, mais il existe des cas pour lesquels le déplacement anti-Stokes est bien plus important : les matériaux à conversion ascendante de photons (ou upconversion), à absorption à deux photons (ou biphotonique), ou encore à doublage de fréquence (ou génération de seconde harmonique).

i. La conversion ascendante de photons

Ce phénomène d'upconversion peut survenir selon trois mécanismes différents :

- α . L'addition de photons par transfert d'énergie (APTE), ou effet Auzel, s'observe aux fortes densités optiques dans des cristaux dopés par des ions de transition ou des terres rares. Ces matériaux sont généralement utilisés pour réaliser des lasers solides, et une non linéarité est observée entre l'efficacité du pompage optique et l'augmentation de la puissance de la source excitatrice aux fortes densités optiques. Une partie de l'énergie absorbée par l'ion dopant, normalement en partie dissipée de manière non radiative via des défauts du matériau, est parfois transférée à un autre ion dopant excité, aboutissant à la promotion de l'un d'eux à un état d'énergie pouvant être la somme des énergies des deux ions avant interaction. Ce phénomène, qui peut donner naissance à une fluorescence anti-Stokes, est observé dans le cas de terres rares incorporées dans des matrices cristallines ($M_{0,995}Sm_{0,005}ClF$, $M=Ba$ ou Sr).⁴ Or, s'il était initialement considéré comme indésirable car diminuant l'efficacité des lasers solides dans lesquels il a été découvert, il s'est avéré intéressant dans des applications ultérieures d'imageries biomédicales. Nous en discuterons dans la partie I.B de l'introduction, intitulée "Applications en imagerie optique". Toutefois, le mécanisme d'upconversion est encore débattu, bien que des pistes aient été avancées récemment.

- β . L'avalanche de photons s'observe lorsqu'un transfert d'énergie par relaxation croisée entre un ion donneur et un accepteur se fait efficacement. La condition nécessaire pour que ce phénomène soit efficace est une bonne coïncidence entre les deux gaps d'énergie. Le processus typique est représenté dans la Figure 1.4 ci-contre.⁵ Une absorption entraîne tout d'abord une transition $1 \rightarrow 2'$,

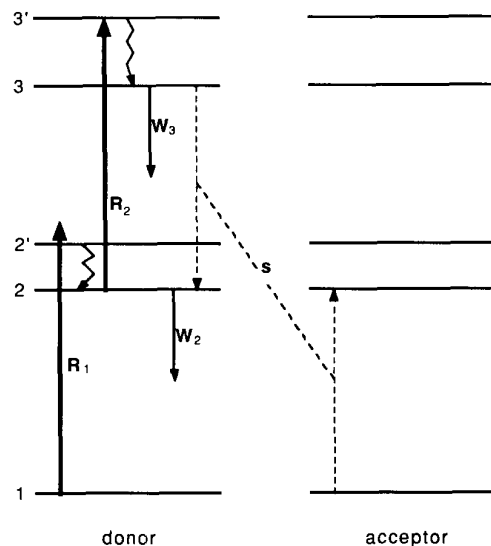


Figure 1.4 Mécanisme schématique général du phénomène d'avalanche de photons. (Adapté de 5)

⁴ J.-C. Gâcon et al. Addition de photons par transfert d'énergie et absorption dans l'état excité des matériaux $MClF: Sm^{2+}$ ($M=Ba, Sr$). *Journal de Physique*, 1986, 47 (2), 279.

⁵ M.-F. Joubert et al. The photon-avalanche effect : review, model and application. *Opt. Mater.* 1994, 4, 43.

suivie par une relaxation non radiative vers le niveau métastable 2, avant qu'une seconde absorption (dite de résonance) entraîne une transition 2->3' aussi suivie par une relaxation non radiative 3'->3. L'étape suivante est une relaxation croisée (flèches pointillées) qui a pour effet de peupler très efficacement les niveaux 2 et de favoriser une absorption 2->3' qui sera suivie par une relaxation non radiative 3'->3 et une transition radiative 3->1. De plus, les étapes d'absorption et de relaxation sont bien plus rapides que celles d'émissions radiatives (voir paragraphe 1), le mécanisme ainsi présenté entraîne un très bon remplissage des niveaux 2. Tous ces niveaux 2 peuplés permettent de nombreuses transitions 2->3' lors d'absorption, puis une émission importante de photons lors des transitions 3->1,⁵ d'où le terme "avalanche de photons".

- γ . L'absorption d'un état excité, ou absorption séquentielle a lieu lorsqu'un ion dans son état fondamental absorbe deux photons dans un intervalle de temps inférieur à la durée de vie du premier état excité. Pour pouvoir observer cela, il faut une grande densité et cohérence optique. Il a donc fallu attendre l'excitation par laser avant d'identifier ce phénomène qui est le moins efficace des trois présentés ici.

Ces trois phénomènes sont des phénomènes d'optique non linéaire.

ii. L'absorption à deux photons ou fluorescence biphotonique

Ce phénomène responsable d'une fluorescence anti-Stokes est à distinguer de l'absorption séquentielle expliquée ci-dessus. En effet, dans le cas précédent, il y avait un passage effectif par un état intermédiaire, tandis que l'absorption biphotonique est observée lorsque deux photons de même énergie sont absorbés en même temps. Schématiquement, il est habituel de représenter la transition entre l'état fondamental et l'état excité en passant par un état intermédiaire virtuel (Figure 1.5.a), car ne correspondant pas à un niveau d'énergie du matériau. L'efficacité de ce phénomène étant proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse, il peut devenir prépondérant aux hautes intensités lumineuses. Il s'agit donc aussi d'un cas d'optique non linéaire. Suite à l'absorption des deux photons, la substance excitée libère le surplus d'énergie sous la forme d'un photon de fluorescence. L'énergie du photon émis sera inférieure à la somme de l'énergie des deux photons absorbés car une partie de l'énergie est dissipée lors de transitions non radiatives comme dans le cas de la fluorescence classique (transitions Δ_1 et Δ_0 , Figure 1.5.a).⁶

iii. Le doublage de fréquence ou génération de seconde harmonique

Tout comme l'absorption biphotonique, l'efficacité du phénomène de génération de second harmonique est proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse. Ce troisième phénomène d'optique non linéaire est basé sur l'effet de "génération de fréquence somme" lors duquel deux photons de pulsations différentes (ω_1 et ω_2) s'annihilent alors qu'un nouveau photon de pulsation $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ est créé. Ce phénomène ne peut avoir lieu que dans certaines conditions : on l'observe lorsque les photons interagissent avec un matériau asymétrique comme une molécule hautement polarisable. Alors on peut obtenir un photon de fréquence plus élevée, et dans le cas où les deux premiers photons ont une même pulsation, on a $\omega_3 = 2\omega_1$, soit un doublement de la fréquence. Pour être vraiment rigoureux, il faut signaler une condition supplémentaire pour avoir une bonne

⁶ T. Pons & J. Mertz. Imager dans la profondeur des tissus : les microscopies biphotoniques. Images de la physique 2005. CNRS-SFP.

efficacité : les deux photons doivent avoir la même phase pour avoir une somme sans perte des deux fréquences.⁷

Ce phénomène est très différent de l'absorption biphotonique : l'énergie des deux photons incidents n'est pas absorbée, et il n'y a pas de phénomène de dissipation non radiative, ni d'émission de fluorescence, donc pas de dépôt d'énergie dans le milieu. Il se produit en réalité une diffusion de type Rayleigh, lors de laquelle le faisceau incident est converti en un faisceau ayant pour fréquence la somme des deux fréquences incidentes. Ce phénomène ne peut se produire au contact d'une substance symétrique, car la diffusion Rayleigh qui aurait lieu se ferait sans changement de fréquence. Au contact d'une substance asymétrique, par exemple une molécule présentant une distribution non homogène des électrons, la réponse du dipôle sera asymétrique, bien que toujours périodique. Il en résultera l'apparition de composantes non linéaires de pulsation 2ω en plus de la composante ω habituelle. Cette diffusion appelée hyper-Rayleigh sera observée si trois conditions sont réunies. La première condition concerne la polarisabilité de la substance illuminée : une absence de polarisabilité ne permettra pas une asymétrie d'oscillation des électrons. La deuxième condition est que cette substance soit en concentration suffisante à l'endroit de l'illumination (Figure 1.5.c). La troisième condition est liée à la disposition dans l'espace de ces substances : si elles sont réparties aléatoirement, tous les rayonnements de second harmonique émis auront une phase différente, et vont donc interférer de manière destructive. Il est donc indispensable que l'organisation spatiale des substances illuminées se fasse de telle sorte que les rayonnements de seconde harmonique interfèrent de manière cohérente et donc constructive. Dans les tissus vivants, cela s'observe notamment au niveau d'interfaces tels que des membranes cellulaires où de nombreuses substances peuvent s'insérer parallèlement.^{6,8}

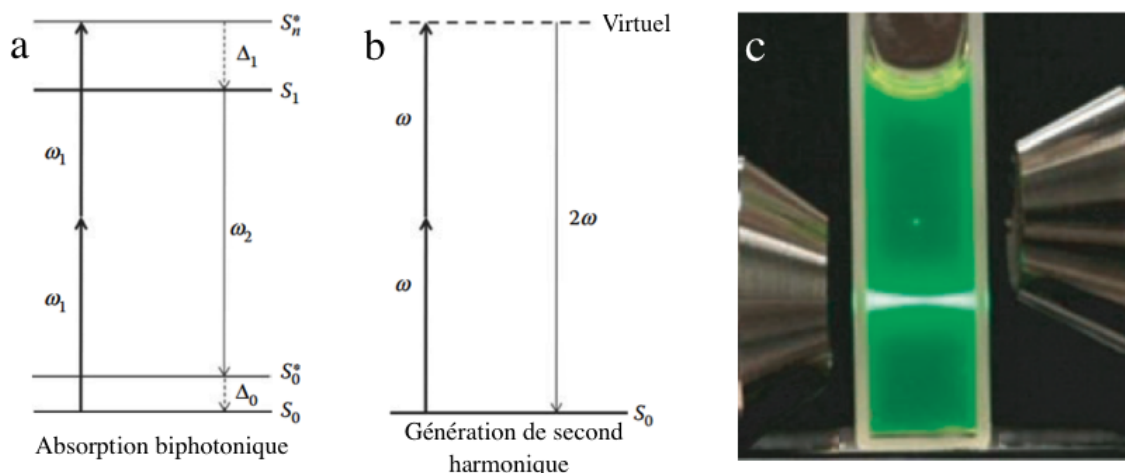


Figure 1.5. Phénomènes d'optique non linéaire. a) Mécanisme de la fluorescence biphotonique. On voit que la pulsation ω_2 du photon émis est inférieure à deux fois la pulsation ω_1 des photons absorbés. b) Mécanisme de la génération de seconde harmonique, il n'y a pas de dissipation d'énergie car le phénomène physique mis en jeu n'est pas celui d'absorption/émission de fluorescence mais celui de diffusion dite hyper-Rayleigh. c) Illustration expérimentale de la différence entre fluorescence classique et fluorescence biphotonique. L'excitation classique d'une solution de fluorescéine ($50 \mu\text{M}$) à 380 nm engendre de la fluorescence tout le long du trajet du laser en solution, tandis que l'excitation biphotonique à 760 nm engendre uniquement de la fluorescence dans le volume focal.⁹

⁷ R. W. Boyd. Nonlinear Optics. Acad. Press. 2003. ISBN 978-0-12-121682-5.

⁸ L. Moreaux et al. Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy. Biophys. J. 2001, 80 (3), 1568.

⁹ A. Ustione & D. W. Piston. A simple introduction to multiphoton microscopy. J. Microsc. 2011, 243 (3), 221.

L'avantage majeur de la fluorescence biphotonique et de la génération de seconde harmonique en microscopie est que l'excitation se fait dans le proche infrarouge. Ces longueurs d'onde ne sont pas dommageables pour les tissus observés. Au contraire, la fluorescence classique utilise parfois des ultraviolets ou du bleu, dégradant progressivement les substances observées. Et comme le montre la Figure 1.5.c, un microscope à deux photons n'excite qu'une zone très restreinte de l'échantillon, de l'ordre du femtolitre (10^{-15} L). Cela limite le photoblanchiment de tout l'échantillon observé en fluorescence classique.¹⁰

Mais le début de la microscopie basée sur l'optique non linéaire¹¹ a fait apparaître un désavantage de l'absorption biphotonique ou de la génération de second harmonique : la faible efficacité du phénomène d'absorption à deux photons. Cette technique nécessite donc l'utilisation de lasers pulsés puissants, appelés lasers femtoseconde. Néanmoins, la microscopie à deux photons permet l'observation de structures micrométriques telles que celle d'une cellule neuronale, y compris les épines dendritiques (Figure 1.6.a)¹² ou des réseaux de neurones dans le néocortex de souris (Figure 1.6.b), quelle qu'en soit la profondeur.¹³ Elle permet aussi de discriminer un tissu sain d'un tissu pathologique, en caractérisant par exemple l'organisation du collagène et de l'élastine dans une sous muqueuse humaine saine ou cancéreuse.¹⁴

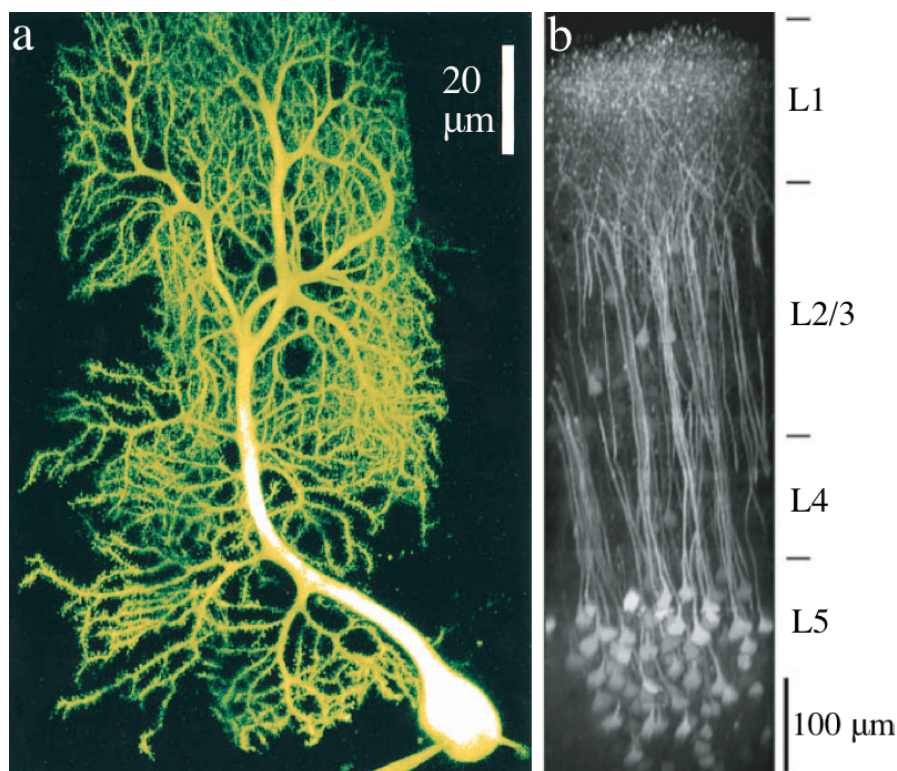


Figure 1.6. Images de microscopie à deux photons : projections de superpositions d'images d'une cellule de Purkinje remplie de fluorescéine (on voit l'aiguille en bas de l'image) (a) et de neurones pyramidaux profonds dans le néocortex d'une souris transgénique exprimant la Clomeleon, une protéine permettant de détecter les ions chlorure en imagerie optique (b). Les couches L1-5 correspondent à 5 des 6 couches utilisées pour délimiter le néocortex sur le plan histologique. (Adapté de 12 et 13)

¹⁰ B. E. Cohen. Biological imaging: beyond fluorescence. Nature. 2010, 467, 407.

¹¹ W. Denk et al. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science. 1990, 248, 73.

¹² W. Denk, K. Svoboda. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. Neuron. 1997, 18, 351.

¹³ F. Helmchen, W. Denk. Deep tissue two-photon microscopy. Nat. Methods. 2005, 2 (12), 932.

¹⁴ W. S. Chen et al. Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. J. Microsc. 2014, 253 (1), 79.

Etant donné que la microscopie par génération de seconde harmonique est uniquement observable lorsque certaines organisations moléculaires sont présentes, elle permet d'obtenir des informations sur l'évolution ou l'altération de ces structures sans avoir besoin de les marquer à l'aide d'un fluorophore exogène. Certaines protéines endogènes telles que le collagène (Figure 1.7.a et b), la myosine (une protéine essentielle à la contraction musculaire) (Figure 1.7.c)¹⁵ ou les microtubules sont ainsi visibles en utilisant ce type de microscopie.¹⁶ Ces techniques permettent de mieux comprendre la physiologie de pathologies telles que les fibroses pulmonaires idiopathiques.¹⁷

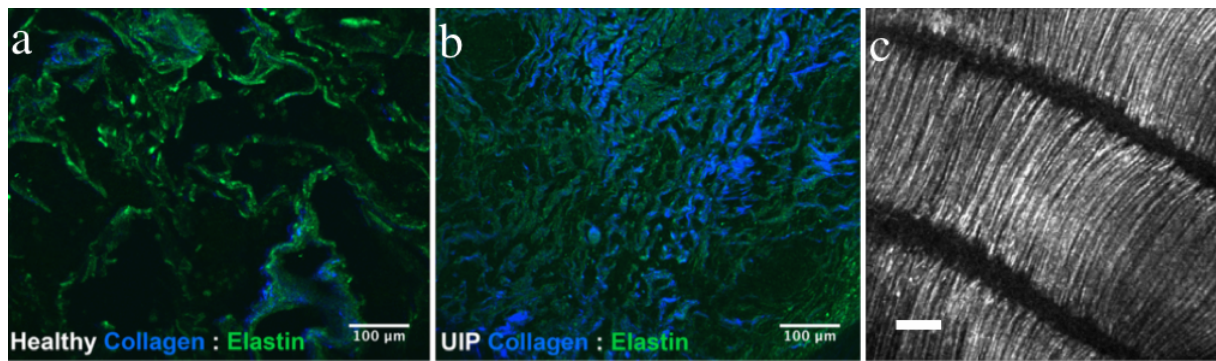


Figure 1.7. Images de microscopie par fluorescence biphotonique et génération de seconde harmonique. Images de tissu pulmonaire sain (a) et fibrosé (b) obtenues par superposition d'acquisitions de l'autofluorescence biphotonique de l'élastine (vert) et de génération de second harmonique permettant d'observer le collagène fibrillaire (bleu). Dans le cas de la pneumopathie interstitielle (b), on observe une diminution significative de la quantité d'élastine mature ainsi qu'une augmentation de la quantité de collagène composant la matrice extracellulaire. L'illumination est réalisée à l'aide d'un laser à 810 nm (100 fs par impulsion, 80 MHz), la fluorescence de l'élastine est observée avec d'un filtre à 535 nm, celle du collagène avec un filtre à 405 nm. c) Génération de seconde harmonique de myosine de muscles dorsaux d'un embryon de poulet de 7 jours. Illumination à 810 nm (200 fs, 75 MHz), détection à 405. Barre d'échelle : 100 µm. (Adapté de 15 et 17)

Si la fluorescence biphotonique peut être réalisée en ajoutant un fluorophore, des travaux montrent la possibilité d'augmenter l'efficacité de la génération de seconde harmonique en marquant une protéine avec un acide aminé synthétique fortement polarisable¹⁸ ou en utilisant des nanoparticules de titanate de baryum.

b) Le confinement quantique

Pour expliquer le phénomène de confinement quantique, il faut introduire rapidement la théorie des bandes. Lorsque plusieurs atomes se lient, ils forment des orbitales moléculaires (OM) par recouvrement d'orbitales atomiques (OA). Cela est modélisé par combinaison linéaire d'orbitales atomiques (CLOA) et si n OA se combinent, elles forment alors n OM. Les électrons initialement présents dans les OA vont se répartir sur les OM de plus basses énergies, correspondant généralement aux orbitales liantes (qui sont au nombre de $n/2$), tandis que les $n/2$ orbitales les plus hautes en énergie, dites antiliantes, restent majoritairement vides. Le nombre d'OM augmente donc avec le nombre

¹⁵ C. Odin et al. Collagen and myosin characterization by orientation field second harmonic microscopy. Opt. Exp. 2008, 16 (20), 16151.

¹⁶ D. A. Dombeck et al. Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second harmonic generation microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003, 100 (12), 7081.

¹⁷ R. M. Kottmann et al. Second harmonic generation microscopy reveals altered collagen microstructure in usual interstitial pneumonia versus healthy lung. Respir. Res. 2015, 16, 61.

¹⁸ J. S. Salafsky, B. Cohen. A second-harmonic-active unnatural amino acid as a structural probe of biomolecules on surfaces. J. Phys. Chem. B. 2008, 112, 15103.

d'atomes liés, la conséquence étant un écart plus faible entre chaque OM, y compris celui entre la plus haute OM occupée par des électrons (orbitale haute occupée, ou HO) et la plus basse OM vide (orbitale basse vacante, BV).

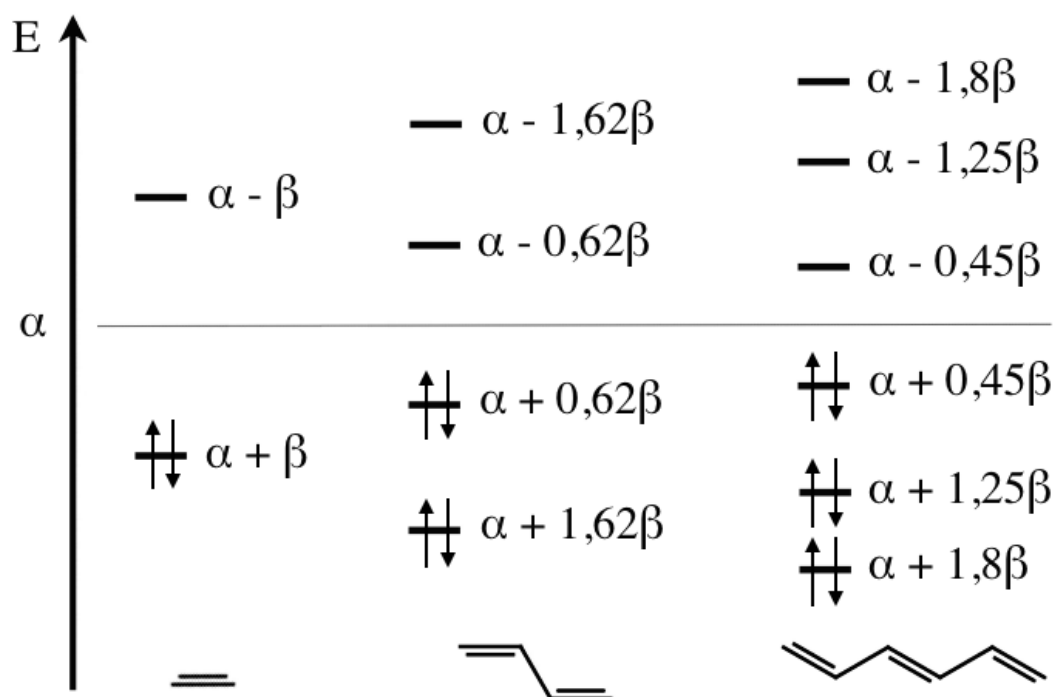


Figure 1.8. Parallèle avec les systèmes conjugués décrits par la méthode de Hückel simple. Celle-ci permet de déterminer les niveaux d'énergie des OM des molécules d'éthylène, de butadiène et d'hexatriène.

Cet écart HO-BV détermine les propriétés électroniques de molécules conjuguées car il donne une information sur la facilité avec laquelle un électron peut s'y déplacer : il est nul pour un conducteur, relativement faible pour un semi-conducteur (quelques eV) et important pour un isolant ($> 9\text{eV}$). La Figure 1.6 illustre cela à partir de la construction de diagrammes d'énergie d'OM de systèmes conjugués grâce à la méthode de Hückel simplifiée. α et β sont deux intégrales d'énergie : α correspond à l'énergie des OA des carbones participant à la liaison et β est l'énergie d'interaction entre les OA de deux carbones voisins formant la liaison. α et β ont toutes deux des valeurs négatives, ce qui explique que l'énergie la plus basse est obtenue pour $\alpha + \beta$ et non $\alpha - \beta$ pour l'éthylène. On voit que la différence d'énergie HO-BV diminue bien au fur et à mesure que le nombre d'atomes augmente : elle vaut 2β pour l'éthylène, $1,24\beta$ pour le butadiène et $0,9\beta$ pour l'hexatriène. Dans un matériau macroscopique, les OM sont extrêmement rapprochées et nombreuses : on ne parle plus de niveaux d'énergie discrets mais de "bandes" séparées par un gap d'énergie. Ce gap est aussi appelé bande interdite. Pour des semi-conducteurs inorganiques de 10^2 à $3 \cdot 10^4$ atomes (1,2 à 11,5 nm), la largeur de la bande interdite dépend encore du nombre d'OA et donc du nombre d'atomes constituant la particule.¹⁹ Ces particules sont appelées des boîtes quantiques ou quantum dots (QD). Or, lors de l'excitation d'un QD, un exciton (une paire électron-trou) est créé, caractérisé par son rayon de Bohr (la demi-distance entre l'électron et le trou). Ce rayon est généralement supérieur à la taille du QD, qui impose donc à l'exciton un confinement spatial : on parle de confinement quantique. Dans ce cas les orbitales ne se comportent pas encore comme des bandes continues et plus la taille des QD est faible, moins il y a

¹⁹ C. B. Murray et al. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 8706.

d'OA, donc d'OM, et plus le gap est grand. Or, lors de la transition radiative de l'électron des OM de conduction vers les OM de valence, l'énergie émise est liée à la taille du gap, et donc à la taille des particules. La conséquence est que, pour une composition donnée, la longueur d'onde d'émission des QD peut être modifiée en changeant uniquement leur taille (Figure 1.9)^{20,21}

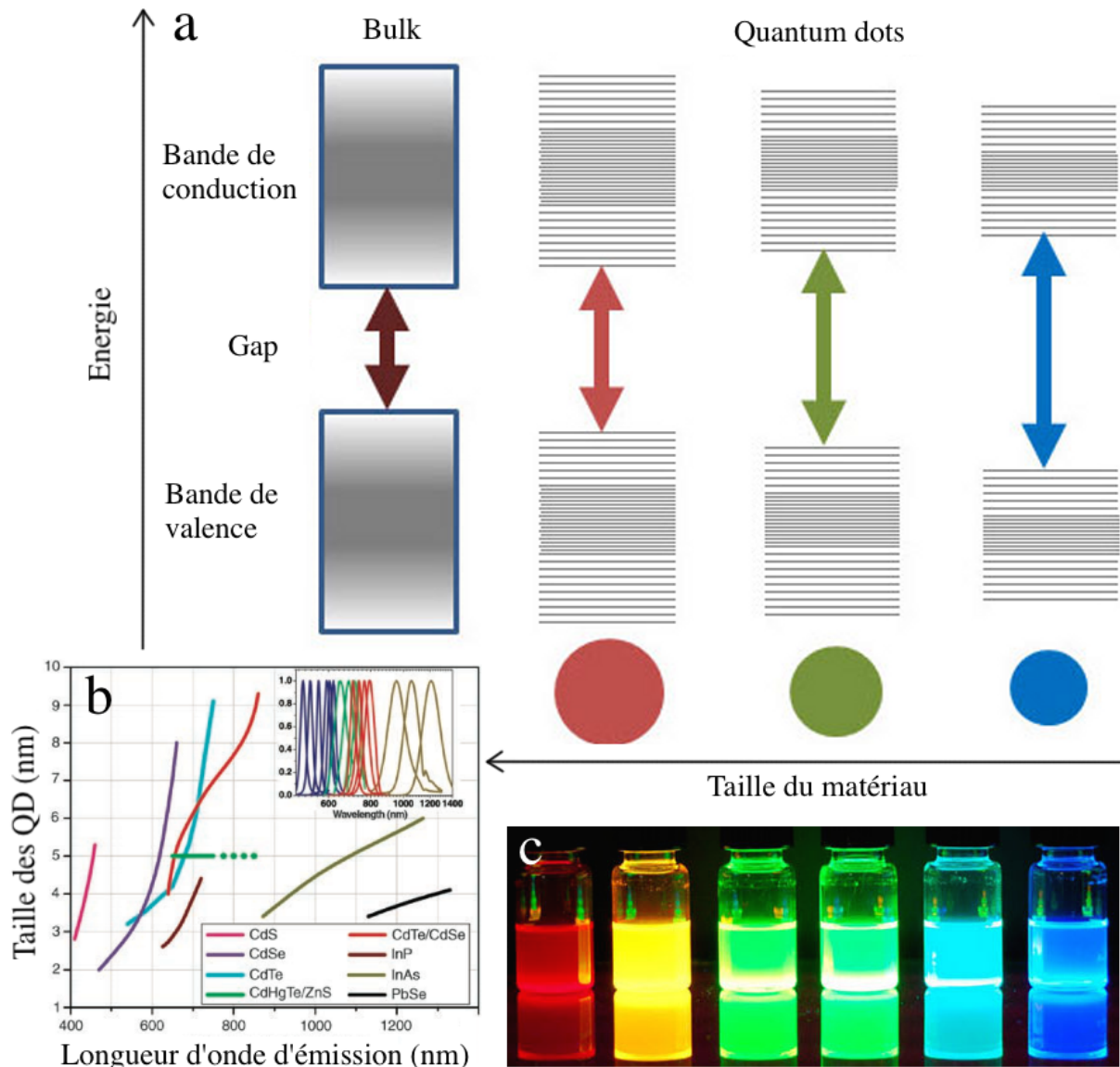


Figure 1.9. Précisions sur les quantum-dots. a) Schéma illustrant le phénomène de confinement quantique qui augmente avec la diminution de la taille des QD. Outre une discrétisation des niveaux d'énergie de "valence" et de "conduction", on observe une augmentation de la différence d'énergie entre les plus hauts niveaux occupés et les plus bas niveaux libres lorsque la taille du cristal diminue. Pour une composition donnée, la conséquence est qu'une énergie plus importante est émise par radiation lorsque la recombinaison d'un exciton se produit dans un petit QD que dans un grand : plus un QD est petit, plus sa fluorescence sera décalée vers le bleu. b) Il existe différentes familles de QD, chaque famille ayant une composition particulière et donc une émission propre. Au sein d'une famille, la longueur d'onde de fluorescence évolue plus ou moins fortement avec la taille. c) Illustration de l'influence de la composition (et non de la taille) de QD sur leur luminescence. QD de 6 nm et de composition $\text{CdS}_x\text{Se}_{1-x}/\text{ZnS}$ émettant de 630 nm (CdSe/ZnS) à 450 nm (CdS/ZnS). (Adapté de 20 et Sigma-Aldrich).

²⁰ A. P. Alivisatos. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. J. Phys. Chem. 1996, 100, 13226.

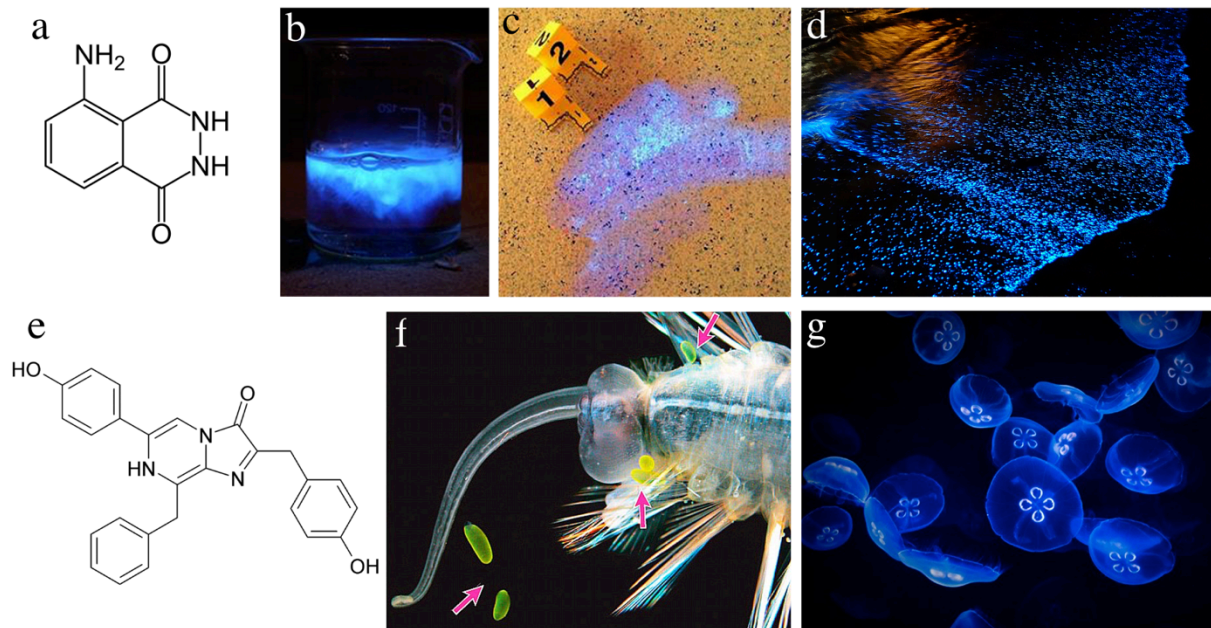
²¹ X. Michalet et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging and diagnostics. Science. 2005, 307, 538.

3) Autres phénomènes de luminescence

"D'après Jean Perrin, toute transformation chimique amenant un système de corps d'un état A à un état B, ou inversement, est accompagné d'absorption ou d'émission de radiation [...] M. Perrin admet d'ailleurs que certains chocs peuvent remplacer l'action du quantum lumineux"³

a) La chimiluminescence

C'est une réaction chimique dont les produits sont dans un état excité, et qui vont soit se désexciter en émettant de la lumière, soit transmettre de l'énergie à une autre molécule (par exemple un fluorophore) qui émettra alors un photon. Un cas particulier de la chimiluminescence est observé lorsque la réaction chimique est produite par un être vivant, on parle de bioluminescence et cette réaction est alors enzymatique. La réaction la plus connue de chimiluminescence est celle du luminol (Figure 1.10.a) avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), catalysée par le fer (III) (Figure 1.10.b). Elle est notamment utilisée par la police scientifique car le fer de l'hémoglobine est difficile à enlever et reste présent bien que l'on ne puisse plus voir de traces. Sur une scène de crime présumée, les enquêteurs pulvérisent un mélange luminol/ H_2O_2 et observent éventuellement une lumière bleue là où du sang a été nettoyé (Figure 1.10.c).



²² K.J. Osborn et al. Deep-sea, swimming worms with luminescent "bombs". Science. 2009, 325 (5943), 964.

²³ O. Shimomura. Bioluminescence : chemical principles and methods. 2006, p.168. ISBN 978-981-256-801-4.

Beaucoup d'espèces animales ou végétales produisent de la lumière, notamment dans les abysses. Les substances responsables de cette chimiluminescence *in vivo* sont regroupées sous la dénomination de luciférines. Après une oxydation catalysée par des enzymes appelées luciférases, les luciférines se retrouvent dans un état excité avant d'émettre un photon en retournant à son état fondamental.

Un autre cas particulier de chimiluminescence concerne la cristallisation d'une substance ou la dissolution d'un cristal avec libération de lumière, ce phénomène est appelé cristalloluminescence dans le premier cas et lyoluminescence dans le second. Ce sont deux sous-catégories de chimiluminescence car la lumière provient d'une modification de liaisons chimiques. On peut citer comme exemple la dissolution de l'anhydride arsénieux (As_2O_3) ou du sulfate de potassium (K_2SO_4). Or il se trouve qu'un broyage de cristaux secs de As_2O_3 ou K_2SO_4 libère aussi de la lumière.²⁴ Cela est alors appelé triboluminescence (voir plus bas). La nomenclature de ces effets montre ainsi quelques limites, car la lumière provient dans les deux cas d'une rupture des liaisons interatomiques et seule change la façon dont ces liaisons sont rompues.

b) L'électroluminescence

Dans certains cas le matériau émet de la lumière en réponse au passage d'un courant ou d'un champ électrique. Cela se produit au sein de semi-conducteurs agencés en jonctions appelées p-n : deux semi-conducteurs dopés afin d'obtenir un déficit (dopage p) ou un surplus (dopage n) d'électrons sont mis en contact. Une zone dite de déplétion apparaît alors où les électrons en surplus de la zone n diffusent vers les défauts positifs de la zone p, la concentration en porteurs libres y est presque nulle. Lorsqu'une tension est appliquée aux bornes d'une telle jonction, les électrons de la zone n se recombinent avec les trous de la zone p au sein de la zone de déplétion en émettant un photon. Ce phénomène, qui se produit sans échauffement, est utilisé dans des appareils comme des écrans ou des éclairages à base de diodes électro-luminescentes (DEL).

Un autre type d'électroluminescence est appelé cathodoluminescence. Elle est utilisée dans les anciens écrans de télévision, d'oscilloscopes ou de microscopes électroniques, où les électrons accélérés par un champ électrique transmettent leur énergie cinétique à un matériau en venant le percuter. Ces matériaux peuvent être des semi-conducteurs ou des isolants, et le transfert d'énergie entre l'électron incident et un électron de la bande de valence du matériau peut entraîner la création d'une paire électron-trou (l'électron passe alors dans la bande de conduction) qui peut se recombiner en émettant un photon. Le spectre d'émission d'un matériau soumis à un faisceau d'électrons donne des informations sur son gap et la présence de défauts au sein de la bande interdite.

c) La mécanoluminescence

Mécanoluminescence est un terme peu employé qui rassemble les phénomènes lumineux observés lorsqu'un système émet de la lumière après avoir été soumis à une contrainte mécanique. On peut citer la piézoluminescence, la triboluminescence et la sonoluminescence.

²⁴ J. Guinchant. Sur les phénomènes de luminescence. J. Phys. Theor. Appl. 1905, 4 (1), 413.

i. La triboluminescence

La triboluminescence est issue de frottements (la tribologie est la science qui étudie les frottements). Tout le monde a déjà essayé de frotter une règle en plexiglas sur un pull en laine afin d'attirer de petits morceaux de papier. Cette charge électrostatique du matériau peut parfois entraîner une émission lumineuse, par exemple lorsqu'on déroule du ruban adhésif (dans le vide, cela peut même produire des rayons X). Ce phénomène est lié à l'émission de lumière après rupture de liaisons chimiques, que ce soit en déroulant de la bande adhésive ou en broyant un cristal.

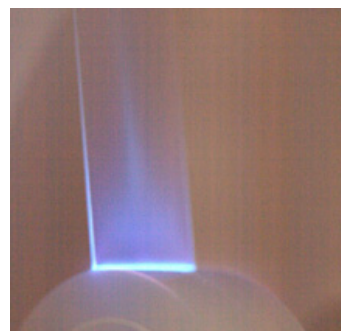


Figure 1.11. Exemple de triboluminescence en déroulant du ruban adhésif.

ii. La piézoluminescence

La piézoluminescence est l'émission de lumière en réponse à une déformation mécanique. Elle est couramment observée dans des cristaux alcalino-halogénés (NaCl, KCl, KBr, KI, CsCl) préalablement exposés à des rayonnements ionisants tels que des rayons γ . Les paires électrons trous créées par cette irradiation peuvent être piégées à plusieurs endroits dans les cristaux : au niveau de dislocations ou de défauts plus ponctuels tels que des lacunes ou des impuretés. Les charges piégées dans des défauts ponctuels auront plutôt tendance à être libérées suite à une activation thermique (voir les détails sur la thermoluminescence plus bas) tandis que celles accumulées au niveau de dislocations seront libérées lors de déformations et donc responsables de piézoluminescence (Figure 1.12).²⁵ Pour un matériau donné et irradié, il semble que la thermoluminescence soit bien plus importante que la piézoluminescence.²⁶ De plus, lorsqu'elles sont libérées, les charges piégées par des dislocations se recombinent vraisemblablement au niveau de centres émetteurs jouant le même rôle dans le mécanisme de thermoluminescence. Les spectres d'émission caractéristiques de ces matériaux dépendent plus de la nature du matériau et des défauts qu'il contient que du phénomène mis en jeu dans la luminescence.²⁷ Il semblerait que, sous des conditions bien choisies, beaucoup de matériaux soient piézoluminescents : on peut citer le verre de quartz (silice amorphe), les borosilicates comme le verre pyrex ou le polyméthacrylate de méthyle (plexiglas) ainsi

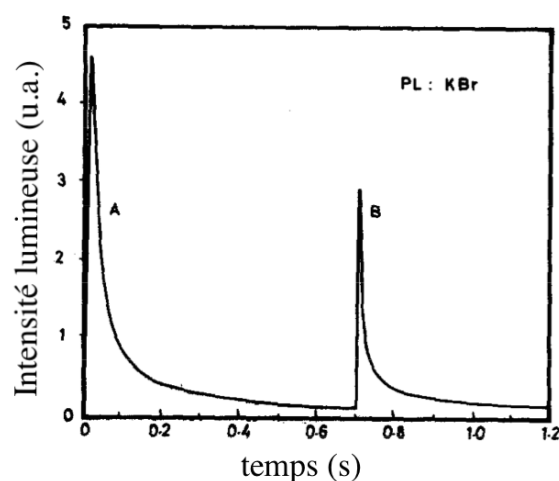


Figure 1.12. Piézoluminescence d'un cristal de KBr irradié par des rayons γ pendant l'application (A) et le relâchement (B) d'une contrainte. (Adapté de 25)

que de nombreuses roches lunaires.²⁵ La différence théorique entre triboluminescence et piézoluminescence est le fait de rompre des liaisons chimiques ou non. La piézoluminescence n'est pas sensée rompre de liaisons. Cependant, bien qu'elle s'observe lors de la déformation d'un cristal sans destruction de celui-ci, contrairement au broyage permettant d'observer la triboluminescence, elle implique un mouvement

²⁵ N.A. Atari. Piezoluminescence phenomenon. Physics Letters. 1982, 90A (1,2), p. 93.

²⁶ A. Al-Hashimi et al. On piezoluminescence in irradiated alkali halides. Rad. Protect. Dos. 1983, 6 (1-4), 203.

²⁷ I.A. Markova-Osorgina et al. Deformation-induced exciton luminescence of alkali halide crystals. Phys. Stat. Sol. (b). 1976, 74, 753.

des dislocations au sein du cristal lors de l'application de contraintes. Or, une dislocation se déplace au sein d'un cristal en cassant et créant des liaisons inter-atomiques, ce qui peut laisser songeur quant à l'existence d'une réelle différence chimique entre ces deux phénomènes.

iii. La sonoluminescence

La sonoluminescence est un peu plus exotique et l'explication scientifique du phénomène a entraîné de nombreux débats. Il s'agit d'une luminescence observée lorsqu'une bulle de gaz en suspension dans un liquide oscille en présence d'un champ acoustique. Lors de sa contraction on peut observer un flash lumineux qui est dû à une forte augmentation de la température à l'intérieure de la bulle. Il existe deux cas de sonoluminescences : la sonoluminescence multi-bulles et la sonoluminescence mono-bulle (Figure 1.13). Dans le premier cas, des températures de 5000 K et des pressions de plusieurs centaines de bars ont été rapportées, tandis qu'elles dépassent vraisemblablement 15000 K et 4000 bars dans le second cas.²⁸ Le gaz présent dans la bulle se transforme ainsi en plasma lors de la contraction, entraînant une luminescence assez importante. Une étude publiée dans Science en 2002²⁹ montre même que ce phénomène réalisé dans de l'acétone deutérée permet d'atteindre des températures de l'ordre de 10^6 à 10^7 K et d'observer la formation de tritium. Certains spéculent ainsi que le phénomène de sonoluminescence n'est autre que de la fusion nucléaire. Mais il semble que ces expériences n'aient pas pu être reproduites et soient fortement remises en question.

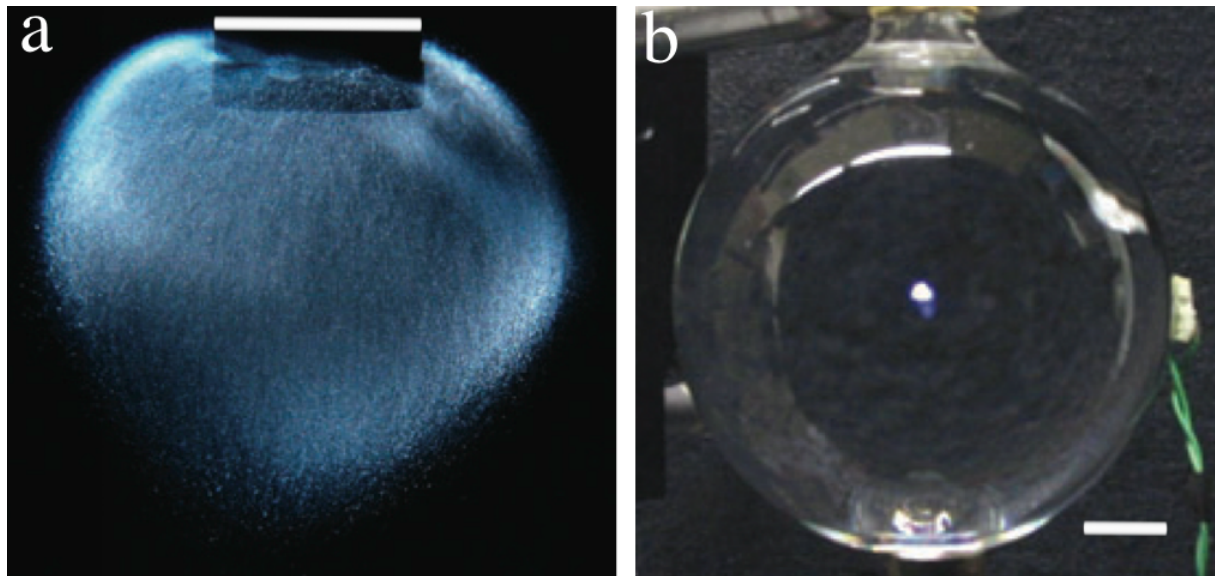


Figure 1.13. Exemples de phénomènes de sonoluminescence. a) Photographie effectuée dans l'obscurité d'un nuage de bulles sonoluminescentes engendrées avec un émetteur d'ultrason dans une solution de H_2SO_4 (96% en masse) saturée en xénon (© Nathan Eddingsaas, California Institute of Technology, Pasadena, USA). b) Photographie illustrant la sonoluminescence mono-bulle engendrée dans H_2SO_4 (85% en masse) non saturée en xénon. Temps d'exposition de 2 s. Les barres d'échelle représentent 1 cm. (Adapté de 28)

Ce phénomène se rapproche de la cavitation qui a été étudiée par Lord Rayleigh dès 1917. Lorsqu'un liquide subit une dépression importante et que la pression devient inférieure à la pression de vapeur saturante, des bulles de vapeur dite saturante peuvent

²⁸ K.S. Suslick et al. Inside a collapsing bubble : sonoluminescence and the conditions during cavitation. Annu. Rev. Phys. Chem. 2008, 59, 659.

²⁹ R.P. Taleyarkhan et al. Evidence of nuclear emissions during acoustic cavitation. Science. 2002, 295, 1868.

se former avant d'imploser. Cela peut se produire lors d'un écoulement fluide à haute vitesse, c'est la cavitation hydrodynamique que l'on peut observer à proximité d'une hélice de bateau, ou en présence d'ultrasons, c'est alors la cavitation acoustique. Les bulles formées sont instables et implosent rapidement, l'onde de choc créée peut provoquer des dégâts sur les hélices ou dans les pompes où elles apparaissent.

Des crevettes de la famille Alpheidae, aussi appelées crevettes-pistolet (Figure 1.14) sont capables, grâce à une pince de grande taille, de provoquer un phénomène de cavitation similaire. L'onde sonore lui permet d'étourdir ses prédateurs ou d'assommer, voire tuer, ses proies.³⁰ Pendant ce phénomène d'implosion, la température peut atteindre plusieurs milliers de kelvins, provoquant un flash lumineux similaire à la sonoluminescence.³¹ Cette capacité à priori unique dans le règne animal est parfois appelée shrimpoluminescence.

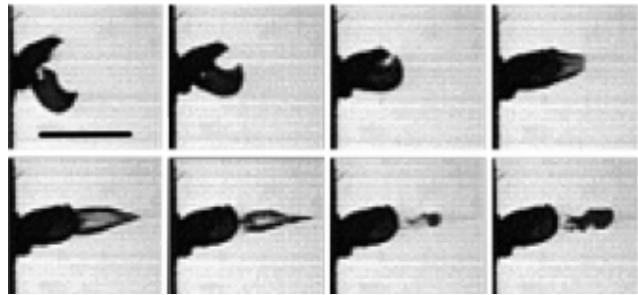


Figure 1.14. Haut : les crevettes-pistolets ne possèdent qu'une pince dotée d'une telle capacité de cavitation. Bas : une séquence filmée à 40500 images par seconde. Les images correspondent aux temps 0, 375, 500, 725, 975, 1125, 1250 et 1400 μ s (de gauche à droite et haut en bas). La barre d'échelle représente 2 cm. (Adapté de 30)

Concernant la sonoluminescence, la cause de l'émission de lumière est une forte augmentation de température, et il est possible de se demander si, finalement, la sonoluminescence n'est pas un phénomène d'incandescence !

d) La thermoluminescence

Imaginons qu'un semi-conducteur absorbe de l'énergie, par exemple sous la forme de rayonnements électromagnétiques (qui peut être de la lumière visible, des rayons UV ou X). Des électrons présents dans la bande de valence peuvent traverser le gap d'énergie (la bande interdite) pour passer dans la bande de conduction (BC) et s'y déplacer, tandis qu'un trou se déplace dans la bande de valence (BV). En l'absence de défaut dans le matériau, une recombinaison rapide s'effectue avec émission d'un photon. En revanche, la présence de défauts cristallins ponctuels (lacunes, défauts d'antisite) ou d'impuretés au sein du cristal peut entraîner le piégeage d'un porteur de charge. Le niveau d'énergie auquel est piégé le porteur est situé dans la bande interdite. Pour que ce porteur de charge se recombine avec l'autre porteur de la paire électron-trou créée, il doit pouvoir quitter le niveau d'énergie du piège pour retourner dans la BC ou la BV et atteindre un centre de recombinaison (Figure 1.15). Seulement, pour qu'un électron passe du piège à la BC, il doit absorber de l'énergie. Celle-ci lui est fournie sous la forme d'énergie thermique, et plus le niveau d'énergie du piège est profond (loin de la BC), plus

³⁰ M. Versluis et al. How snapping shrimp snap : through cavitating bubbles. Science. 2000, 289, 2114.

³¹ D. Lohse et al. Snapping shrimp make flashing bubbles. Nature, 2001, 413, 477.

l'énergie nécessaire à la transition du piège à la BC est importante, donc plus il faudra que la température du matériau soit élevée pour observer une émission lumineuse. A 0 K (-273,15°C), aucune émission lumineuse ne pourra être observée. Puis, en faisant progressivement augmenter la température du matériau, on pourra observer le phénomène de thermoluminescence. Celui-ci n'a rien à voir avec l'incandescence citée en début de cette partie. Les températures permettant d'observer la thermoluminescence vont généralement de 100 à 600 K (-173,15 à 326,85°C), tandis que l'incandescence débute autour de 1000 K. La profondeur des pièges peut-être optimisée pour que l'énergie nécessaire à cette transition soit proche de l'énergie thermique disponible à la température d'utilisation du matériau. Le phénomène de thermoluminescence est une des étapes importante de celui de luminescence persistante.

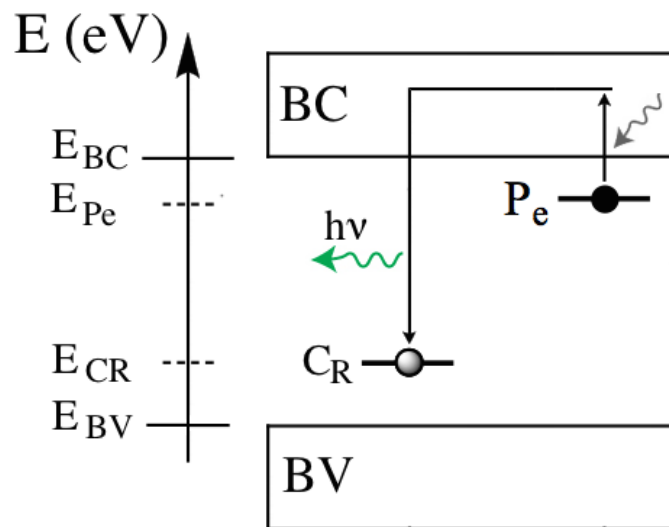


Figure 1.15. Schéma simplifié du phénomène de thermo-luminescence. Un électron piégé dans un piège (P_e) remonte dans la bande de conduction après avoir absorbé de l'énergie thermique (flèche grise) puis se recombine avec un trou en émettant un photon au niveau d'un centre de recombinaison (C_R). (Adapté de 32)

4) La luminescence persistante

Ce phénomène parfois désigné "longue phosphorescence" peut avoir certaines ressemblances avec la photoluminescence. En effet, pour être observé, il est nécessaire d'illuminer d'abord le matériau (rayonnement qui peut aller des rayons X au proche IR). Le matériau restitue ensuite progressivement l'énergie accumulée en émettant de la lumière pendant des durées pouvant atteindre plusieurs jours. Cependant, le mécanisme est très différent de ceux présentés dans le paragraphe sur la photoluminescence. Ce phénomène de restitution fait penser au comportement de condensateurs électriques : on fait parfois une analogie en appelant ces matériaux des condensateurs optiques.

³² T. Maldiney. Nanocristaux à luminescence persistante : nouveaux concepts pour l'imagerie *in vivo*. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. <pastel-00831281>

a) Historique

Le premier matériau à luminescence persistante fut découvert durant les premières années du XVII^{ème} siècle par le savetier et alchimiste Vincenzo Cascariolo. Il l'aurait soit découvert en se promenant dans le Monte Paderno, à côté de Bologne, soit acheté à un marchand de Venise lui vantant sa rareté et ses propriétés merveilleuses. Décidant alors de l'étudier, espérant peut-être découvrir la pierre philosophale, il en fit chauffer quelques grains dans le feu, ne récupérant qu'une poudre noire décevante (Figure 1.16). "C'est ainsi qu'il oublia sur un coin de la paille ces petits débris de la pierre qui avaient été seulement chauffés ainsi que la poudre du deuxième lot qui résultait de ses expériences et la pierre elle-même. Vint le matin de Noël. Après plusieurs jours de pluie, en cette fête de la Nativité, le soleil à travers les carreaux de la fenêtre se mit à inonder son atelier d'une lumière bienfaisante, faisant briller de mille éclats tous les instruments entreposés sur l'étable et caressant la fameuse pierre et ses quelques débris abandonnés par Vincenzo. Et cet événement, anodin en apparence, fut décisif. Dans la soirée, le cordonnier revint chercher dans son antre d'alchimiste une chandelle oubliée. La nuit était tombée, et il se dirigeait à tâtons dans l'atelier, prenant soin de ne rien faire tomber dans l'obscurité, lorsqu'il aperçut une lueur verdâtre sur la paille, "Dio mio ! Quale è questo miracolo ?" s'interrogea-t-il. [...] Il constata que les fragments du premier lot de poussière de barytine luisaient d'une lueur douce et étrange, sans flamme, sans chaleur. Il saisit une pincée de ce sable dans sa main et, la lumière restait avec lui, étrangement. Elle semblait émaner des particules du caillou. Vincenzo fut pris d'une grande émotion."³³ Cette pierre constituée de sulfate de baryum, appelée Lapis Solaris (pierre de soleil), de haute densité et capable de retenir les rayons dorés du soleil, déclencha une vive émotion chez les alchimistes en quête de la pierre philosophale. Elle arriva quelques temps plus tard dans les mains de Galilée déterminé à expliquer ce phénomène de luminescence. Dans les années qui suivirent, cette pierre fit l'objet de beaucoup d'études et d'hypothèses par de nombreux scientifiques ou artistes tels que Galvani ou Goethe.



Figure 1.16. Sulfate de baryum, ou baryte en poudre ($BaSO_4$) avant calcination (poudre blanche) et sulfure de baryum (BaS) obtenue après calcination de la baryte. La pierre de Bologne, luminescente, est cette dernière substance.

Ces matériaux furent ensuite oubliés quelques temps avant de réapparaître au début du siècle dernier en horlogerie où le sulfure de zinc était utilisé pour recouvrir les aiguilles ou les chiffres de montres, les rendant ainsi luminescents. Malheureusement à l'époque, leur luminescence était activée en les mélangeant à des substances radioactives telles que le radium. Les personnes chargées de manipuler ces peintures radioactives et luminescentes sont connues aux Etats-Unis sous le nom de "Radium Girls". Utilisant un pinceau que leurs contremaîtres les encourageaient à mouiller avec les lèvres pour gagner en précision, elles s'amusaient parfois à se peindre les ongles ou les dents avec ces peintures, et nombre d'entre elles souffrirent et décédèrent d'anémie, d'ostéonécrose puis d'ostéosarcome, notamment de la mâchoire, dès les années 1920. Ce scandale entraîna de nombreux procès aboutissant à l'interdiction de l'utilisation du radium... dans les années 60 !

³³ C. Gallardo. Galilée et la pierre de Bologne. Ed. Mon petit éditeur. ISBN 9782748355758

Parallèlement, de nouveaux matériaux à luminescence persistante et ne nécessitant pas de radioactivité furent synthétisés. W. De Groot et Maurice Curie (le neveu de Pierre Curie) ont étudié dès les années 1920-30 la luminescence du ZnS (blende de Sidot, initialement synthétisée par Sidot en 1866),³⁴ dopé au Cu^+ ou au Na^+ ,^{3,35} mais celle-ci ne persistait pas plus d'une heure. D'autres familles de composés luminescents, tels que l'alcalino-terreux CaS (enduit de Balmain, synthétisé dès 1700 par Friedrich Hoffmann),³⁶ dopé au Bi^{2+} et au Na^+ ,³ furent développés par Lenard dans les années 30, mais leur sensibilité à l'humidité ne permit pas d'utilisation pratique. En 1996, un travail de Matsuzawa et al sur de l'aluminate de strontium dopé avec Eu^{2+} et Dy^{3+} a renouvelé l'intérêt porté à ces matériaux.³⁷ Celui-ci possède une luminescence persistant plus de 12 h dans le vert, correspondant au maximum de sensibilité de l'oeil, et put donc trouver des applications dans des matériaux utilisés pour les signaux de secours ou de sortie, des peintures ou des jouets (Figure 1.17). La première utilisation d'un matériau à luminescence persistante dans le domaine biomédical remonte à 2007,³⁸ lors de la première thèse réalisée sur ce sujet dans le laboratoire par Quentin Le Masne de Chermont.³⁹ Un historique du développement de ces matériaux au laboratoire sera réalisé à la fin de cette partie.

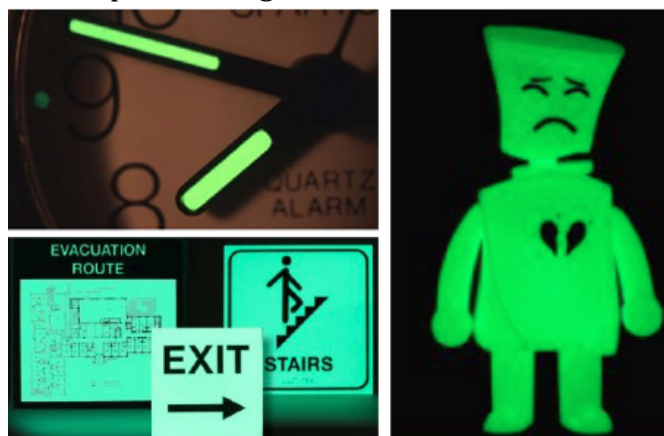


Figure 1.17. Quelques exemples d'utilisation de matériaux à luminescence persistante.

b) Mécanisme général

Il existe de nombreux matériaux à luminescence persistante, et les mécanismes exacts peuvent varier d'un matériau à un autre, bien que l'idée générale reste la même. Je vais commencer par décrire le fonctionnement général de ce mécanisme avant de détailler les propriétés des matériaux utilisés au laboratoire. Le point commun aux différents matériaux à luminescence persistante est la présence de défauts au sein de leur matrice cristalline. Ces défauts vont rendre possible le piégeage de porteurs de charges, et donc le caractère persistant de la luminescence.

i. Les défauts

Il existe deux catégories de défauts :

- les défauts intrinsèques sont liés à la structure cristalline du matériau.
- les défauts extrinsèques sont des impuretés, que l'on peut rajouter afin d'améliorer les propriétés de luminescence et généralement appelées dopants.

³⁴ T. Sidot. Recherches sur la cristallisation de quelques sulfures métalliques. C. R. Acad. Sci. 1866, LXII (18), 999.

³⁵ W. de Groot. Luminescence decay and related phenomena. Physica, 1939, VI (3), 275.

³⁶ P. F. Smet et al. Luminescence in sulfides: a rich history and a bright future. Materials. 2010, 3, 2834.

³⁷ T. Matsuzawa et al. A new long phosphorescent phosphor with high brightness, $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+}$. J. Electrochem. Soc. 1996, 143 (8), 2670.

³⁸ Q. Le Masne de Chermont et al. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104, 9266.

³⁹ Q. Le Masne de Chermont. Nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique *in vivo*. Matériaux. Chimie ParisTech, 2007. Français. <tel-00294982>

Ces défauts vont créer des niveaux d'énergie autorisés dans la bande interdite et permettre de piéger un porteur de charge. Selon la charge du porteur piégé, ces défauts seront appelés pièges à trous ou pièges à électrons. Les pièges à électrons sont souvent des lacunes d'oxygène ou des dopants tels que des lanthanides et sont proches en énergie de la bande de conduction. Les pièges à trous, proches de la bande de valence, sont souvent des lacunes cationiques ou anioniques ou encore des anions. Les défauts et dopants du matériau vont jouer différents rôles dans le mécanisme de luminescence persistante : l'activateur (noté A, Figure 1.18), le piège à électron (P_e) et le centre luminescent dans son état fondamental (L°) ou excité (L^*).

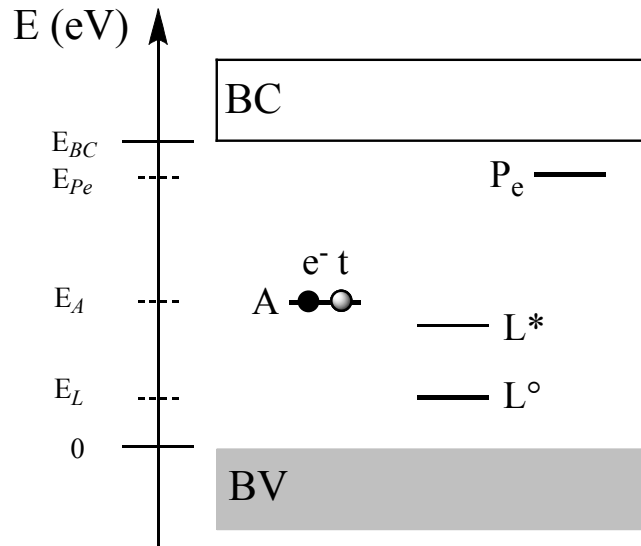


Figure 1.18. Répartition énergétique schématique des différents acteurs de la luminescence persistante. (Adapté de 32)

ii. Conséquence de l'illumination

L'illumination avec un rayonnement possédant une énergie suffisante va entraîner la création d'une paire électron-trou au niveau du centre activateur, chaque porteur de charge se retrouvant ensuite piégé au niveau de son piège respectif. Figure 1.19, on voit que l'électron se retrouve au niveau du piège en passant par la bande de conduction, tandis que le trou se propage dans la bande de valence pour aller se piéger au niveau de L° , le centre luminescent dans son état fondamental.

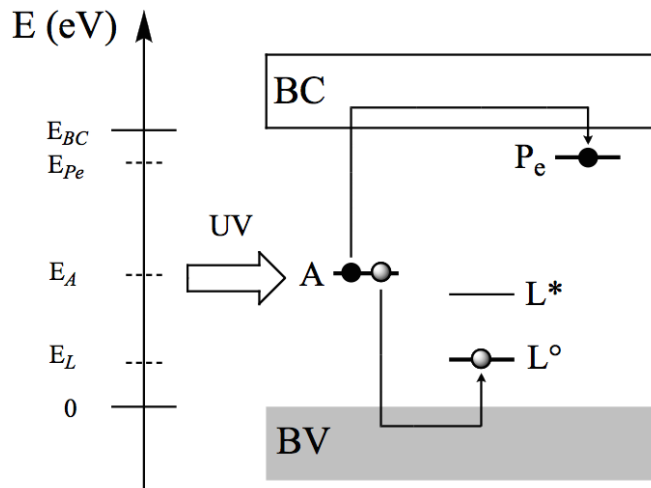


Figure 1.19. Création d'une paire électron-trou suite à l'illumination du matériau. (Adapté de 32)

iii. Emission lumineuse

Nous avons évoqué plus haut le mécanisme de thermoluminescence : l'électron quitte le piège pour retourner dans la bande de conduction après avoir absorbé de l'énergie thermique, et rejoint un centre luminescent où il se recombine avec un trou en émettant un photon (Figure 1.20).

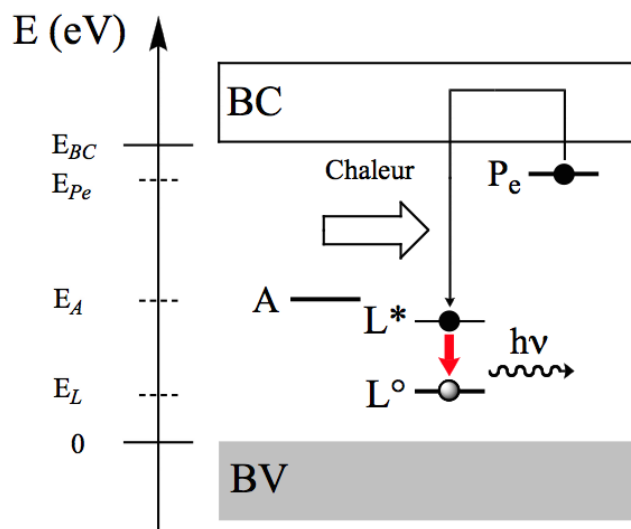


Figure 1.20. Dépiégeage thermique et luminescence persistante. (Adapté de 32)

Certains mécanismes de luminescence présentés dans les pages précédentes ont pu être utilisés afin de créer des outils de bioimagerie. Avant de donner de nombreux exemples d'utilisation de ces techniques pour l'imagerie optique *in vivo*, je vais détailler les mécanismes fondamentaux de luminescence persistante des matériaux développés en collaboration avec l'équipe de Bruno Viana et Didier Gourier à l'IRCP afin de créer des nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique.

c) Les matériaux utilisés au laboratoire

Comme précisé dans la première partie de cette introduction, l'engouement récent pour les matériaux à luminescence persistante fait suite à la publication de Matsuzawa en 1996.³⁷ Depuis, les travaux ont principalement porté sur la compréhension et l'amélioration de l'efficacité des mécanismes de luminescence persistante. Mais jusqu'en 2007, les seules utilisations alors envisagées étaient des céramiques et peintures luminescentes visibles la nuit. Dans ce contexte, il était nécessaire de synthétiser des matériaux dont le pic d'émission coïncide avec le maximum de sensibilité de l'oeil humain, ce qui correspond au vert-jaune (555 nm) en plein jour (vision photopique) et à des longueurs d'onde plus proches du bleu (507 nm) la nuit (vision scotopique).⁴⁰ Ce changement de sensibilité aux couleurs en fonction de la luminosité est appelé effet Purkinje. Il existe deux raisons pour lesquelles ces matériaux ne pouvaient être utilisés pour faire de l'imagerie *in vivo* : la lumière qu'ils émettent est absorbée par les tissus vivants, et les synthèses utilisées ne permettaient pas d'obtenir des nanoparticules. Ces prérequis à l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistante (NPLP) pour l'imagerie optique seront détaillés dans le chapitre B de cette partie.

⁴⁰ D. Poelman, P. F. Smet. Photometry in the dark: time dependent visibility of low intensity light sources. Opt. Express. 2010, 18, 26293.

Néanmoins, dans ce paragraphe, je vais présenter les matériaux développés et utilisés au laboratoire. Je me concentrerai sur la description des phénomènes fondamentaux à l'origine de leur luminescence persistante.

i. Les silicates

Les premiers nanomatériaux luminescents développés au laboratoire avaient pour composition $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+},\text{Mn}^{2+}$ (CZMSO).³⁹ Il a été montré qu'une illumination par rayons X permettait d'activer la luminescence persistante du CZMSO en faisant passer des électrons de la bande de valence à la bande de conduction. Cependant, il est aussi possible d'observer cette luminescence en utilisant des rayonnements bien moins énergétiques tels que des UV. Cela est rendu possible par la présence d'euporium (Eu^{2+}) dont un des niveaux d'énergie peuplé est plus proche de la bande de conduction que les électrons de la bande de valence. Lors d'une illumination, il y a création d'une paire électron-trou suite à l'absorption d'un photon. Ce phénomène a lieu au niveau de l'ion Eu^{2+} , qui est l'activateur. L'électron se retrouve ensuite piégé au niveau du dysprosium (Dy^{3+}). Après absorption d'énergie thermique, il se recombine avec le trou au niveau du centre luminescent que constitue le manganèse (Mn^{2+} , Figure 1.21). Mn^{2+} est à la fois un piège à trou et le centre luminescent. Le rôle de chacun des dopants a été précisé par Aurélie Lecointre, au cours de sa thèse au sein de l'équipe de Bruno Viana et Didier Gourier à Chimie Paristech (2007-2010).^{41,42}

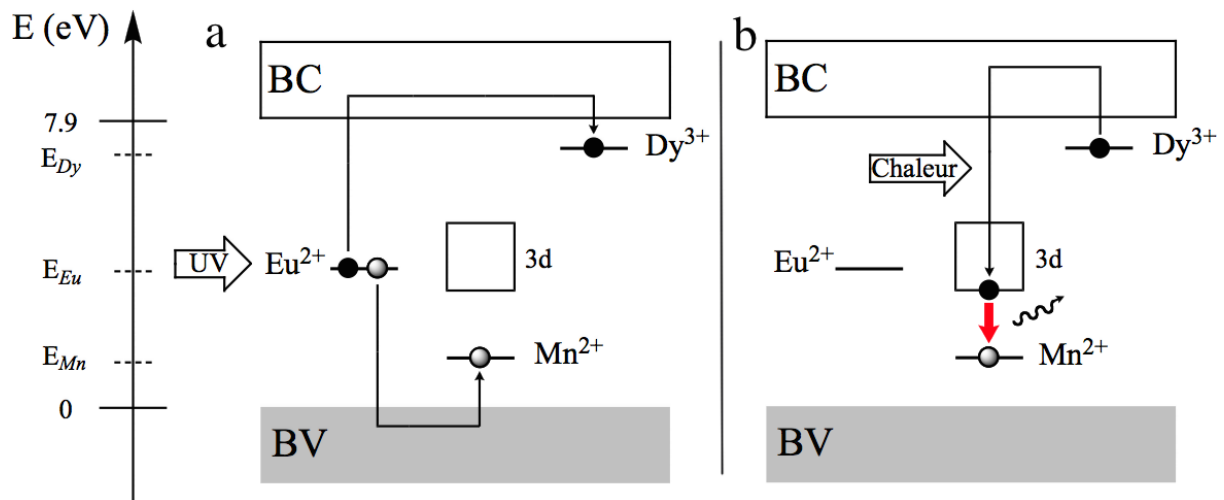


Figure 1.21. Mécanisme schématique du piégeage et du dépiégeage de charge dans les silicates lors du phénomène de luminescence persistante. Lors de l'illumination par des UV (a), une paire électron-trou est créée au niveau de l' Eu^{2+} , l'électron se déplace dans la bande de conduction jusqu'à se recombinaison ou se trouver piégé au niveau d'un ion Dy^{3+} , tandis que le trou va se trouver piégé au niveau de Mn^{2+} . Puis une activation thermique va faire passer l'électron d'un piège à la bande de conduction (b), avant de se recombinaison avec un trou en émettant un photon au niveau de Mn^{2+} . (Adapté de 32)

Dans le paragraphe sur la thermoluminescence, je précisais que les pièges à électrons pouvaient être situés à une distance variable de la bande de conduction. Afin d'améliorer l'efficacité des NPLP, un travail d'optimisation de la profondeur de ces pièges a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le LCMCP, à Chimie Paristech et notre laboratoire.⁴³ Idéalement, la différence d'énergie entre la bande de conduction et la majorité des pièges doit être proche de celle des phonons se propageant dans le

⁴¹ A. Lecointre et al. Red persistent luminescent silicate nanoparticles. *Radiat. Meas.* 2010, 45, 497.

⁴² A. Lecointre et al. Red long-lasting luminescence in clinostatite. *J. of Lumin.* 2009, 129, 1527.

⁴³ T. Maldiney et al. Controlling electron trap depth to enhance optical properties of persistent luminescence nanoparticles for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 11810.

matériau à la température d'utilisation. Une manière de mesurer la profondeur de ces pièges est de refroidir le matériau à 50 K puis le chauffer progressivement jusqu'à 600 K (thermoluminescence stimulée) tout en mesurant la luminescence émise à une longueur d'onde donnée (Figure 1.22.a). Ces expériences ont été réalisées sur un matériau légèrement différent du CZMSO : un diopside de composition $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ (noté CMSO) dopé avec Eu^{2+} , Mn^{2+} et un lanthanide (Dy^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} ou Nd^{3+}). La température correspondant à un maximum d'émission donne une information sur la profondeur des pièges à électrons. Un matériau ayant un maximum d'émission à une température faible (tel que $\text{CMSO}:\text{Ce}^{3+}$, courbe bleue, Figure 1.22.a) possède des pièges peu profonds, ce qui est représenté par deux niveaux proches de la bande de conduction sur la Figure 1.22.b. Cela a pour conséquence un dépiégeage rapide des électrons à température ambiante, donc une luminescence importante et brève ne permettant pas un suivi prolongé.

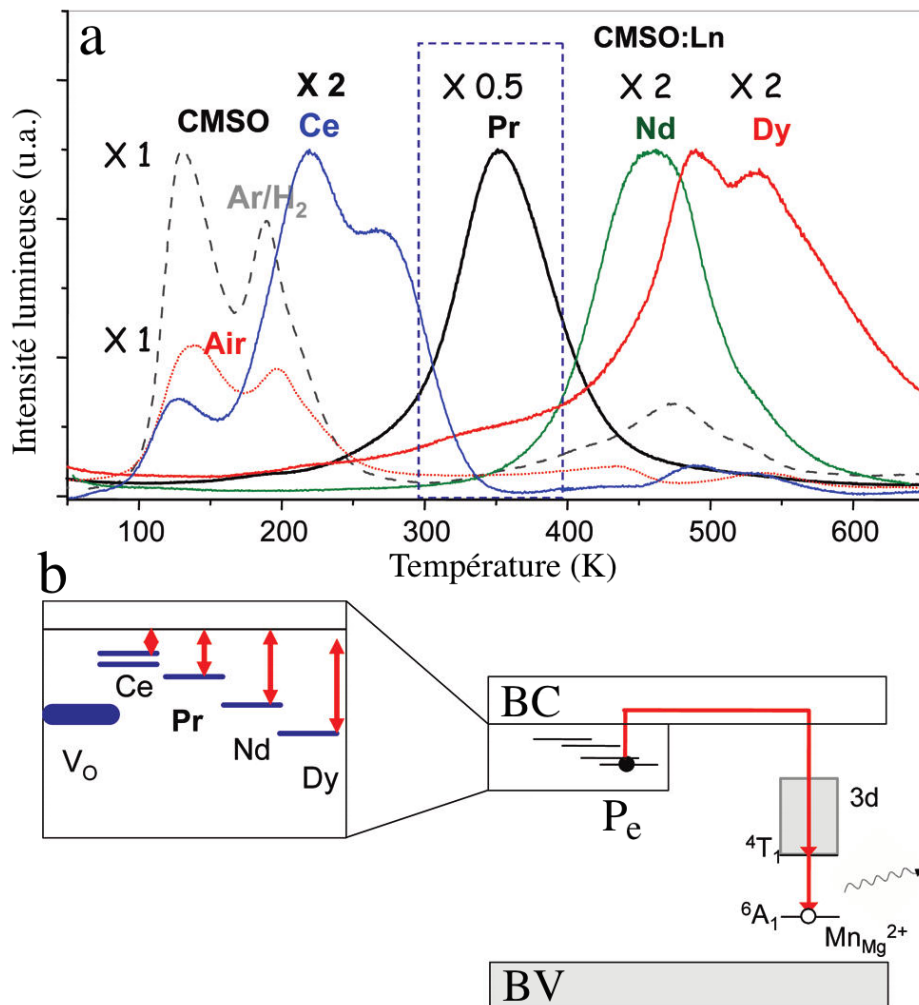
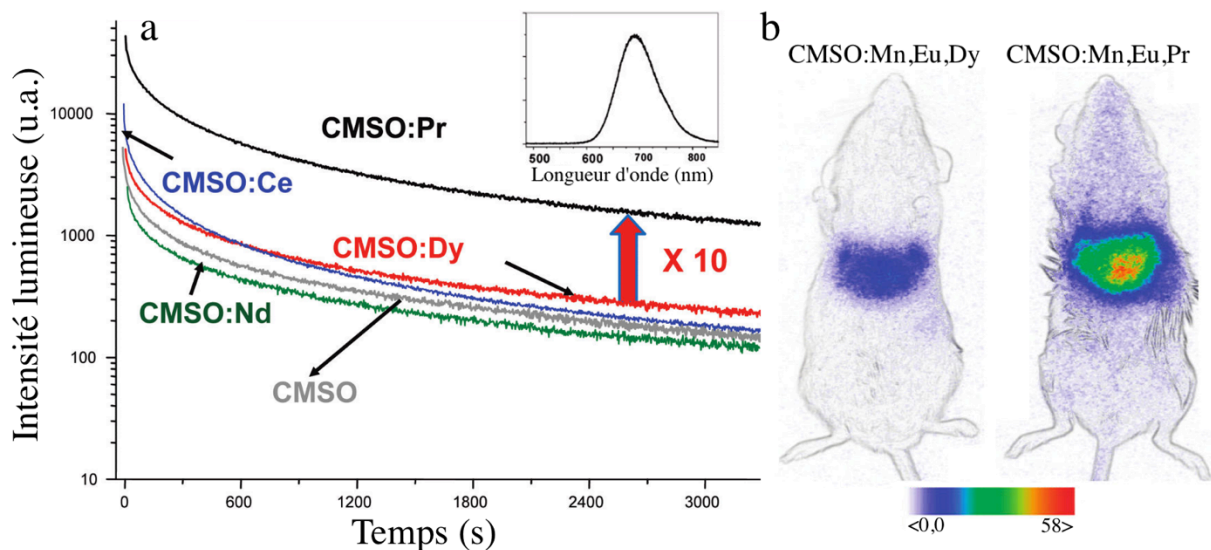


Figure 1.22. a) Thermoluminescence stimulée du Mn^{2+} à 685 nm dans le CMSO ou CMSO dopé avec un lanthanide (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} ou Dy^{3+}). Les courbes en pointillés rouges et en tirets noirs correspondent au $\text{CMSO}:\text{Mn}^{2+}$, calcinés à 1100°C dans l'air ou sous atmosphère réductrice Ar/H_2 , respectivement. Excepté pour la courbe du CMSO calciné dans l'air, toutes les courbes sont normalisées par rapport à la courbe du CMSO calciné sous Ar/H_2 avec les coefficients donnés sur la figure. b) Diagramme schématisé des niveaux d'énergie du Mn^{2+} , constituant les pièges à trous, des lanthanides trivalents et des lacunes d'oxygène (V_o) constituant les pièges à électrons (Ce, Pr, Nd, Dy). (Adapté de 43)

Dans le cas opposé, où les pics d'émission apparaissent autour de 450 et au delà de 500 K ($\text{CMSO}:\text{Nd}^{3+}$ et $\text{CMSO}:\text{Dy}^{3+}$, respectivement), les pièges sont plus profonds et l'énergie thermique disponible à température ambiante ne suffit pas à en dépiéger les électrons.

La conséquence est qu'une fraction majoritaire des électrons piégés ne pourra pas se recombiner à un trou en émettant un photon, diminuant ainsi l'efficacité du phénomène de luminescence. En revanche, le matériau dopé au praséodyme a un pic d'émission entre 300 et 400 K, ce qui semble approprié pour un usage à température ambiante, dont la fenêtre d'intérêt est représentée par un rectangle pointillé bleu. Lors de mesure de déclin de luminescence ou encore de tests de suivi de ces différents matériaux *in vivo*, il a été observé que le CMSO:Pr³⁺ était plus luminescent que le CMSO dopé avec un autre lanthanide (Figure 1.23). Mais malgré une amélioration du matériau qui a permis de suivre plus longtemps ce matériau *in vivo*, celui-ci ne peut être "chargé" qu'avec un rayonnement UV ou X, qui ne permet pas une utilisation à long-terme chez l'animal. Pour cette raison, une autre composition plus avantageuse a ensuite été recherchée.



ii. Le gallate de zinc

Initialement, le gallate de zinc dopé avec du Cr³⁺ (ZnGa₂O₄:Cr³⁺), a été synthétisé par voie solide et a présenté une luminescence persistante plus intense que les silicates.⁴⁴ De plus, la possibilité d'observer sa luminescence *in vivo* après une illumination dans la première fenêtre de transparence des tissus a été observée sur des nanoparticules obtenue par voie hydrothermale, une alternative à la voie solide utilisée initialement.⁴⁵

Dans les cas du CZMSO ou du CMSO, ce sont principalement les défauts extrinsèques qui semblent avoir un rôle dans le phénomène de luminescence persistante. En revanche, le gallate de zinc (ZGO) dopé avec 0,25% de chrome (III) (ZnGa₂O₄:Cr³⁺), possède des défauts intrinsèques jouant un rôle primordial dans les phénomènes de luminescence. Les mécanismes qui suivent ont été abondamment étudiés et décrits par l'équipe de Didier Gourier et Bruno Viana à l'IRCP.^{46,47}

⁴⁴ A. Bessière et al. Storage of visible light for long-lasting phosphorescence in chromium-doped zinc gallate. Chem. Mater. 2014, 26, 1365.

⁴⁵ T. Maldiney et al. The *in vivo* activation of persistent nanophosphors for optical imaging of vascularization, tumors and grafted cells. Nat. Mater. 2014, 13, 418.

⁴⁶ N. Basavaraju et al. Order and disorder around Cr³⁺ in chromium doped persistent luminescent AB₂O₄ spinels. Phys. Chem. Chem. Phys. 2015, 17, 10993.

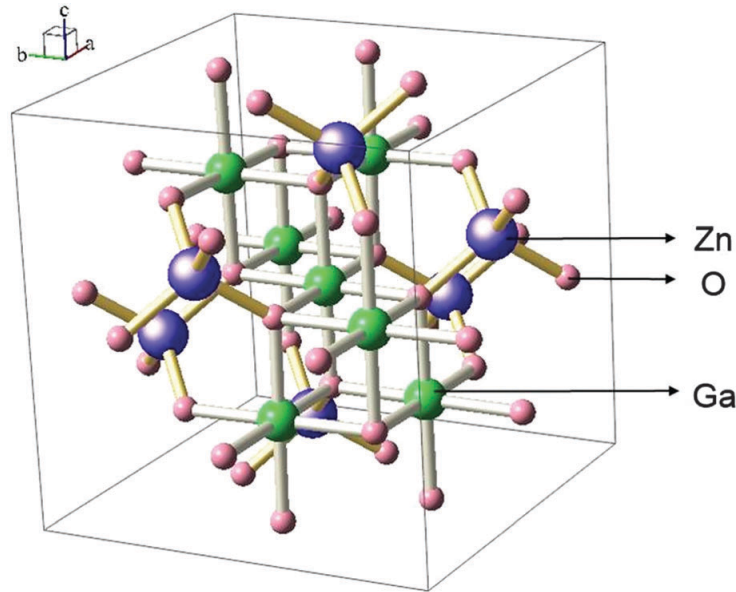
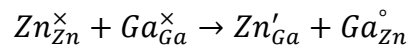


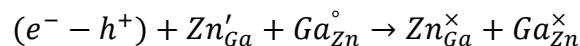
Figure 1.24. Structure spinelle normale de $ZnGa_2O_4$. (Adapté de 46)

Dans le cristal de ZGO qui cristallise en spinelle normale (Figure 1.24), il existe environ 3% de défauts d'antisite, aussi appelés défauts d'inversion.⁴⁸ Ce sont des défauts intrinsèques qui correspondent à une inversion d'ions Zn^{2+} et Ga^{3+} . Un ion Zn^{2+} en site Ga^{3+} représente un excès d'un électron et créera donc une charge négative dans son environnement (notée $'$), tandis que la présence d'un ion Ga^{3+} en site Zn^{2+} provoquera un défaut d'électron et donc une charge positive (notée $^{\circ}$). Le phénomène d'inversion peut être écrit ainsi avec les notations de Kröger-Vink⁴⁴ :



Où Zn_{Zn}^{\times} indique un ion zinc dans son site, et Zn'_{Ga} indique un ion zinc en site gallium. Les charges neutres, positives et négatives sont représentées par des croix, des ronds et des tirets en exposant, respectivement. De plus, les ions chrome ajoutés comme dopants du ZGO s'insèrent en site gallium. Certains de ces chromes sont à proximité de défauts d'antisite. Appelés Cr_{N2} , ils sont les principaux responsables de la luminescence persistante.

Lorsque le matériau est illuminé avec une DEL dans le visible (rayonnement d'énergie inférieure à 3,1 eV, donc de longueur d'onde supérieure à 408 nm), les Cr_{N2} passent d'un état 4A_2 à un état excité 4T_2 (Figure 1.25). La présence d'un défaut d'antisite à proximité du Cr_{N2} excité crée un champ électrique qui va aider à la création d'une paire électron-trou. Cette paire va être piégée par un défaut d'antisite selon le mécanisme suivant⁴⁴ :



Ces défauts d'inversion sont indispensables au phénomène de luminescence persistante activé par des rayonnements visibles. En l'absence du champ électrique qu'ils créent à proximité du chrome, il n'y aurait pas de séparation des charges. L'excitation se retrouve

⁴⁷ N. Basavaraju et al. The importance of inversion disorder in the visible light induced persistent luminescence in Cr^{3+} doped AB_2O_4 (A=Zn or Mg and B=Ga or Al). Phys. Chem. Chem. Phys. 2015, 17, 1790.

⁴⁸ M. Allix et al. Considerable improvement of long-persistent luminescence in germanium and tin substituted $ZnGa_2O_4$. Chem. Mater. 2013, 25, 1600.

donc piégée à proximité du Cr_{N_2} sous la forme d'une paire de défauts neutres. Ce piégeage médié par le Cr_{N_2} est en fait équivalent à un transfert de type donneur-accepteur entre Zn'_{Ga} et $\text{Ga}^{\circ}_{\text{Zn}}$. La réaction inverse est activée thermiquement, et les transitions suivantes sont observées⁴⁴ :

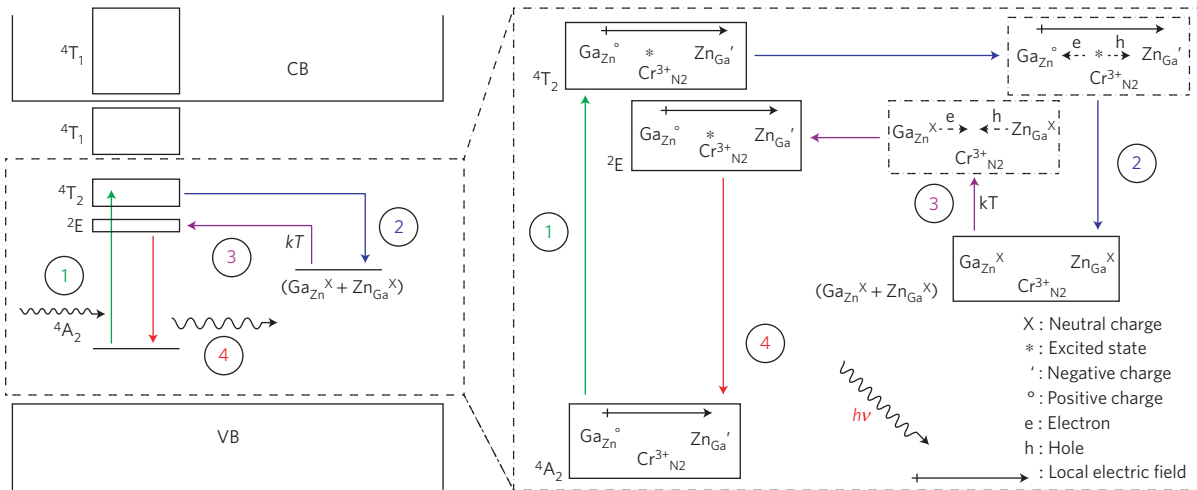
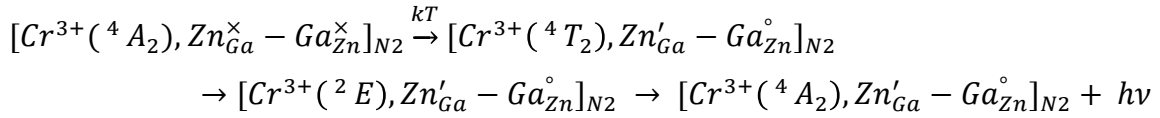


Figure 1.25. Mécanisme proposé pour la luminescence persistante induite par un rayonnement visible montrant les niveaux d'énergie du Cr_{N_2} dans le ZGO par rapport aux bandes de valence (VB) et de conduction (CB). Le mécanisme détaillé, contenant les changements d'états des différents acteurs, est représenté sur la droite. (Adapté de 45)

Le mécanisme de désexcitation, lié au dépiégeage de pièges profonds, est responsable d'un pic apparaissant autour de 318 K (environ 0,028 eV) en thermoluminescence stimulée (Figure 1.26). Ce phénomène de luminescence persistante est particulier car il peut être activé en excitant directement le chrome, qui joue à la fois le rôle d'activateur et de centre luminescent, à des longueurs d'onde pouvant atteindre 680 nm, soit 1,82 eV (Figure 1.26). Cela donne à ce matériau la propriété non négligeable de pouvoir être activé *in vivo* par des rayonnements de faible énergie.⁴⁵

Il est aussi possible d'activer la luminescence persistante de ce matériau avec un rayonnement UV (d'énergie supérieure à 3,1 eV). L'énergie absorbée permet dans ce cas un déplacement des paires de charges dans les bandes du ZGO. Ce mécanisme rend facultatif la localisation du phénomène autour d'un Cr_{N_2} . Cela explique que d'autres types d'ions chrome (les ions Cr^{3+} en site octaédriques non perturbés) participent à la luminescence persistante après illumination UV.⁴⁴ Ces pièges sont peu profonds et peuvent être mis en évidence car ils sont responsables de pics de thermoluminescence à basses températures (80, 145 et 205 K, Figure 1.26).

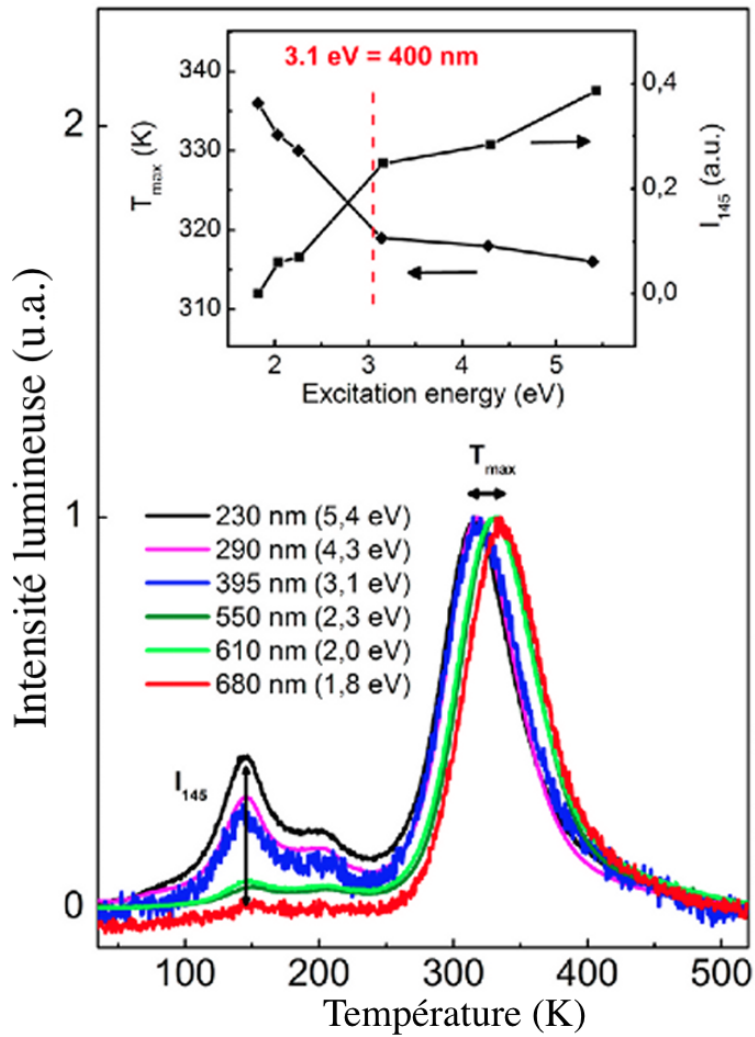


Figure 1.26. Courbes de thermoluminescence stimulée de ZGO:Cr³⁺ illuminé 5 min à 10 K avec différentes longueurs d'onde. Insert : variation de la température du maximum de luminescence (T_{max}) et de l'intensité lumineuse à 145 K (I_{145}) en fonction de l'énergie d'excitation. (Adapté de 44)

Les nombreux phénomènes décrits dans cette première partie d'introduction sont à l'origine de la synthèse de nombreux outils de nanotechnologie ayant des applications pour l'imagerie optique *in vivo*. Ces nanoparticules sont principalement des outils de laboratoire pour la recherche préclinique, et je vais présenter les applications variées dont ils peuvent faire l'objet.

B. APPLICATIONS EN IMAGERIE OPTIQUE

B

1) Les nanoparticules pour la modalité optique

a) Notions de bases en imagerie optique

Afin de construire des nanosondes pour l'imagerie optique, il faut connaître les propriétés physico-chimiques des milieux biologiques et des tissus vivants que ces sondes vont rencontrer. Si les rayonnements γ utilisés en tomographie par émission de positons (TEP) traversent ces tissus sans être diffusés et en étant très peu absorbés, ce n'est pas le cas des rayonnements électromagnétiques proches du visible. Certaines substances contenues dans les tissus vivants peuvent être fluorescentes lors d'une illumination visible, c'est l'autofluorescence des tissus. Ce phénomène crée un bruit de fond et diminue la sensibilité lors de l'acquisition d'un signal de luminescence. De plus, les rayonnements utilisés peuvent être fortement diffusés dans toutes les directions de l'espace, ce qui a pour effet principal de diminuer la résolution spatiale. Avec l'absorption, la diffusion est aussi principal responsable de l'atténuation d'un signal se propageant dans un milieu complexe tel que les tissus vivants. Nous allons ici nous intéresser à ces phénomènes ainsi qu'à leurs conséquences sur les stratégies à employer pour construire des sondes d'imagerie optique.

i. Les fenêtres de transparence des tissus

Les rayonnement les plus énergétiques (γ et X) traversent facilement les tissus mais ils peuvent aussi provoquer des dégats non négligeables là où ils sont absorbés (ruptures simple ou double brin de l'ADN). Dans le cas de la TEP, ils résultent de la rencontre entre un positon émis par un isotope radioactif se désintégrant (comme le fluor 18 dans le cas du ^{18}F -FDG utilisé pour observer le métabolisme du glucose) et le premier électron rencontré dans l'environnement du marqueur. Les précautions à prendre pour manipuler ces produits radioactifs et les conséquences potentielles sur les organismes exposés motivent le développement de modalités utilisant des rayonnements non ionisants, pour des raisons sanitaires, économiques et pratiques.

Les tissus vivants sont principalement constitués d'eau qui absorbe peu dans le visible. Malheureusement, la part minoritaire constituant les êtres vivants ne se comporte pas ainsi. L'hémoglobine et les lipides absorbent fortement dans le visible, mais cette absorption diminue progressivement dans la zone rouge du spectre électromagnétique (Figure 1.27).^{49,50}

⁴⁹ R. Weissleder. A clearer vision for *in vivo* imaging. Nat. Biotechnol. 2001, 19, 316.

⁵⁰ A.M. Smith et al. Second window for *in vivo* imaging. Nat. Nanotechnol. 2009, 4, 710.

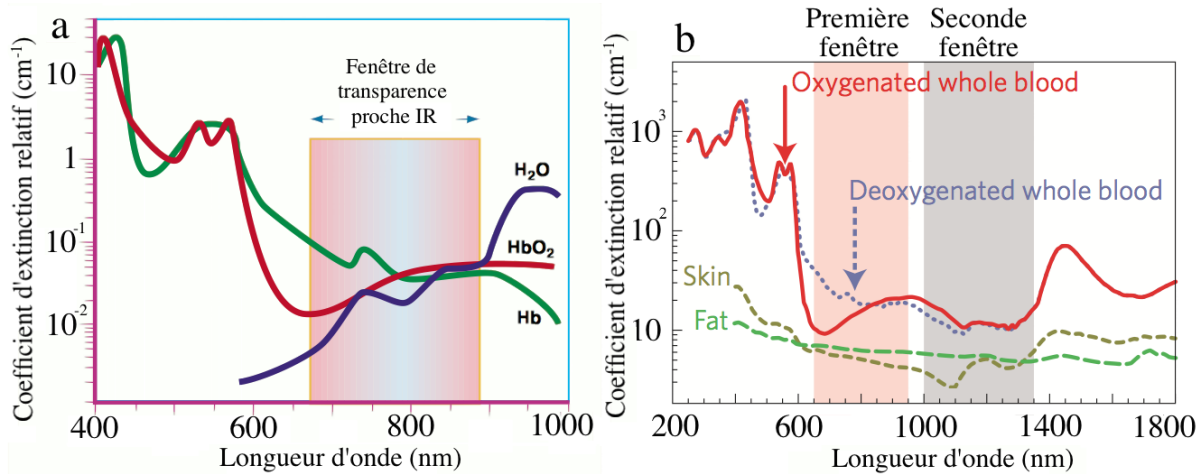


Figure 1.27. Présentation du concept de fenêtres de transparence des tissus vivants. Courbes d'absorbance de l'eau (H₂O, a), de l'hémoglobine oxygénée ou non (Hb ou HbO₂, respectivement, a et b), de la peau (skin) et des lipides(fat) (courbes vertes, b) constituant les tissus vivants dans le visible et les infrarouges proches. (Adapté de 49 et 50)

En effet, l'absorbance du sang chute considérablement à partir de 600 nm, et l'absorption de la peau et des graisses diminuant aussi, la gamme de longueurs d'onde de 650 à 950 nm est appelée la première fenêtre de transparence des tissus. Bien que l'absorption de toutes ces substances n'augmente pas avant 1300 nm, l'eau possède un pic d'absorption à 980 nm (Figure 1.27.a), créant une zone peu propice à l'imagerie autour de 1 µm. De plus, les détecteurs utilisés couramment dans les caméras sont composés de silicium, dont la fenêtre d'efficacité correspond assez bien à la première fenêtre de transparence des tissus (bande rouge, Figure 1.28) et se termine vers 900 nm. Pour pouvoir faire de l'imagerie dans la seconde fenêtre de transparence des tissus (1-1,3 µm) il faut utiliser d'autres capteurs constitués d'arséniure de gallium et d'indium (bande grise, Figure 1.28).⁵⁰

Aujourd'hui, la principale utilisation clinique de l'imagerie optique est la microscopie intravitale oculaire qui peut se permettre d'utiliser des rayonnements dans toute la gamme du visible. Pour pouvoir faire de l'imagerie des tissus plus profonds (au delà de 0,5 cm de profondeur) il est nécessaire de se placer dans une des deux fenêtres de transparence des tissus.

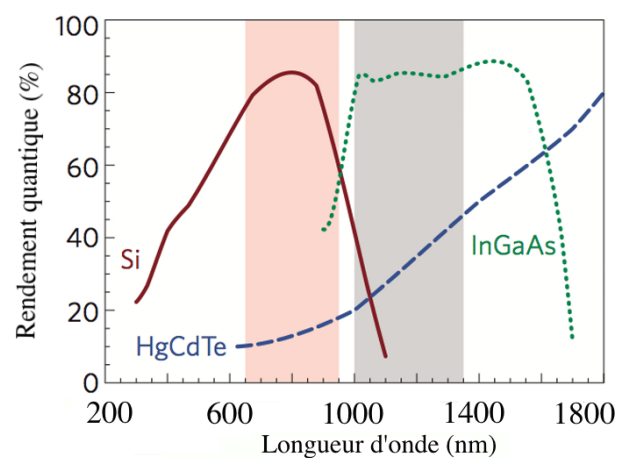


Figure 1.28. Gammes de sensibilité des différents matériaux utilisés aujourd'hui comme détecteurs de rayonnements allant des UV proches aux IR superposées aux fenêtres de transparence des tissus vivants. (Adapté de 50)

ii. Le phénomène d'autofluorescence

En plus d'empêcher une observation en profondeur, l'absorption des tissus vivants dans les longueurs d'onde visibles a une autre conséquence non négligeable. Les tissus contiennent des substances fluorescentes, appelées fluorophores endogènes mais aussi des fluorophores apportés par le régime alimentaire.

Il est ainsi intéressant de voir l'autofluorescence des tissus vivants illuminés à différentes longueurs d'onde (Figure 1.29)⁵¹ correspondant à des zones d'absorption plus ou moins importante (bleu, vert et infrarouge). On peut voir que la fluorescence verte de la vésicule biliaire ainsi que de la vessie (notées GB et BI sur la Figure 1.29.a, respectivement) est très forte, celle de la peau et des intestins (SI, Figure 1.29.a) étant aussi importante lorsque ceux-ci sont illuminés dans le bleu (Figure 1.29.b). L'autofluorescence de la vésicule biliaire et de la vessie est fortement réduite lorsqu'on utilise une illumination verte, mais celle de la peau ainsi que celle des intestins reste importante (Figure 1.29.c). Seule une illumination et une acquisition dans le rouge et proche infrarouge permet de s'affranchir de ce signal parasite (Figure 1.29.d).

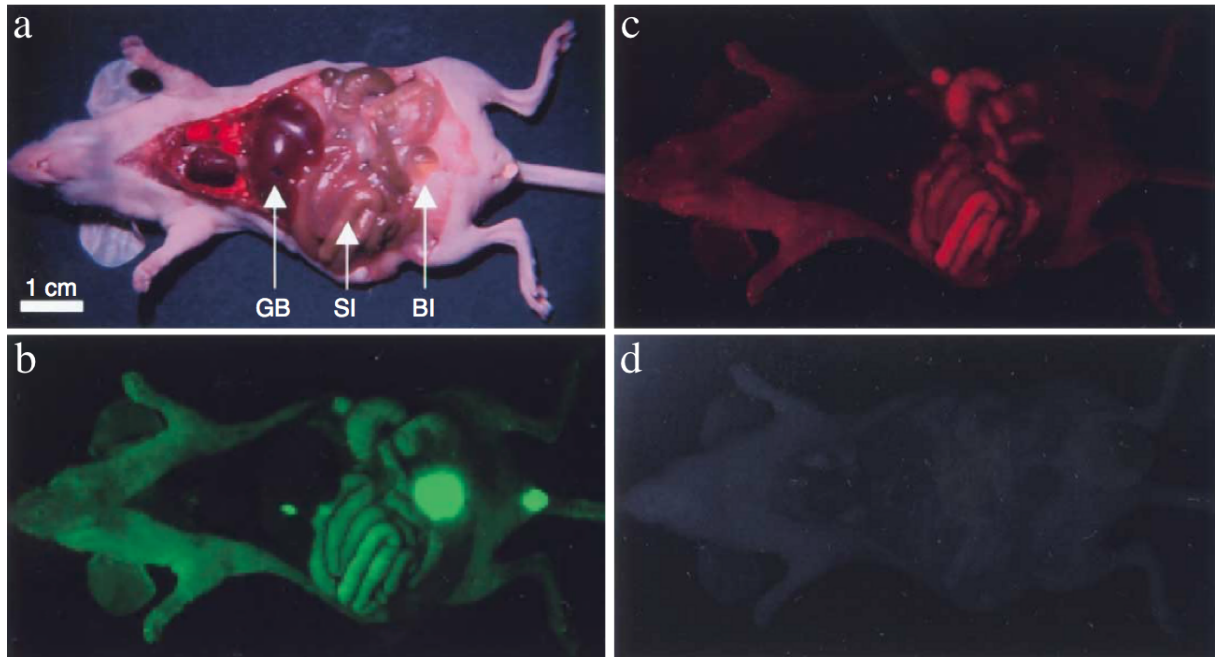


Figure 1.29. Influence de la longueur d'onde d'illumination sur le signal parasite d'autofluorescence des tissus et fluides biologiques. a) Image en lumière blanche d'une souris après sacrifice montrant les viscères. La vésicule biliaire (GB), l'intestin grêle (SI) et la vessie (BI) sont indiqués par des flèches. Autofluorescence des tissus lors de l'utilisation d'un filtre d'excitation/émission bleu/vert (460-500 / 505-560 nm) (b); vert/rouge (525-555 / 590-650 nm) (c); et rouge/proche IR (725-775 / 790-830 nm) (d). (Adapté de 51)

Le phénomène d'absorption étant relié au phénomène d'autofluorescence, et ces deux phénomènes étant fortement atténués dans le proche infrarouge, il est préférable de faire en sorte que les sondes d'imagerie optique que l'on développe utilisent des rayonnements dans les fenêtres de transparence des tissus.

iii. Diffusion et résolution spatiale

La diffusion est un phénomène lié à la complexité du milieu et qui dépend notamment de son hétérogénéité. Elle se produit lorsque l'onde incidente rencontre une discontinuité de l'indice de réfraction du milieu dans lequel elle se propage. Or, les tissus sont discontinus à l'échelle du micromètre. On peut caractériser un milieu par la distance moyenne parcourue par un photon entre deux événements de diffusion. Appelée libre parcours moyen, il vaut environ 10-100 μm dans les tissus biologiques. Et étant donné qu'en imagerie optique la lumière utilisée parcourt quelques millimètres, on peut considérer qu'elle s'y déplace dans un régime dit de diffusion multiple : chaque photon

⁵¹ J.V. Frangioni. In vivo near-infrared fluorescence imaging. Curr. Op. Chem. Biol. 2003, 7, 626.

sera diffusé plusieurs fois au sein du tissu.⁵² La conséquence est une chute de la résolution spatiale des techniques d'imagerie optique, et plus l'épaisseur de tissu traversée par la lumière est importante, plus la diffusion affectera la résolution spatiale. Figure 1.30, ci-dessous, on peut admirer les facéties du phénomène de diffusion sur un rat ayant été gavé avec une gélule à luminescence persistante.

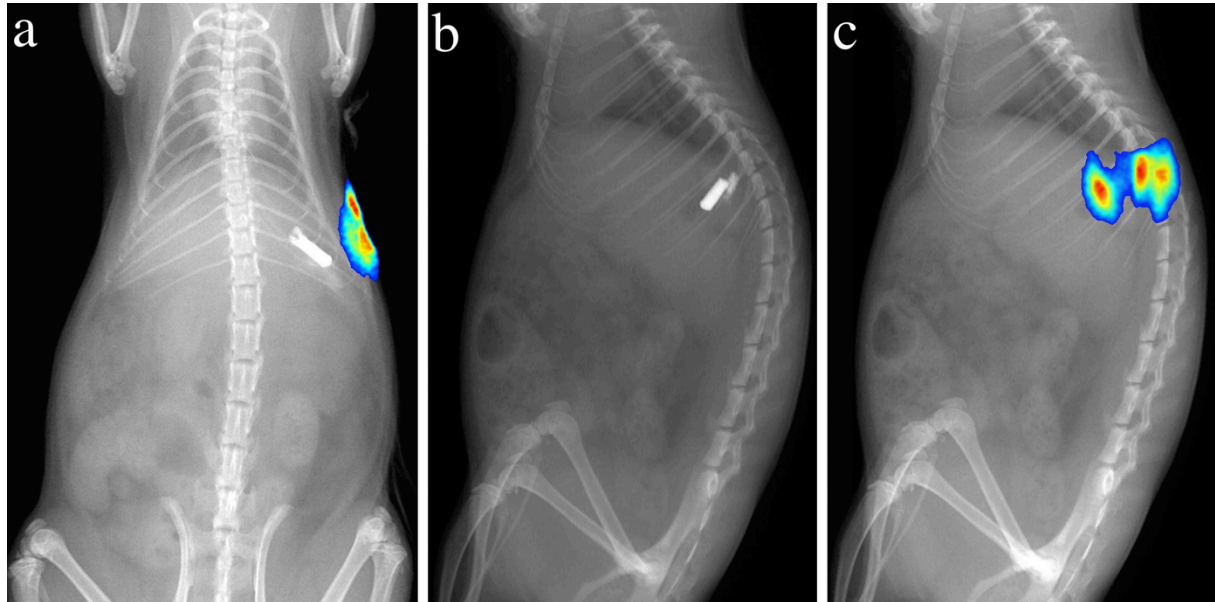


Figure 1.30. Superposition d'une acquisition en radiographie X et en luminescence d'une gélule à luminescence persistante située dans l'estomac d'un rat. a) On voit clairement la gélule dans l'estomac tandis que la luminescence provient du flanc du rat. b-c) Radiographie X (b) et superposition X-luminescence (c) démontrant qu'il existe plusieurs "chemins" suivis par la lumière entre la gélule et la peau du rat, empêchant une localisation précise de la gélule.

Afin de minimiser l'effet de la diffusion, il est possible de chercher au sein des fenêtres de transparence des tissus la gamme de longueurs d'onde dont le libre parcours moyen est maximal. Hong et al⁵³ ont ainsi démontré l'intérêt de la fluorescence de nanotubes de carbone mono-feuillets autour de 1,2 μm pour faire de l'imagerie vasculaire à haute résolution. En greffant un fluorophore commercial aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission situées dans le proche infra-rouge (IRDYE-800 : 785 / 800 nm), ils ont pu comparer la différence de résolution entre les deux fenêtres de transparence des tissus. En excitant à 785 nm, ils ont mesuré la fluorescence du fluorophore à 800 nm en même temps que celle due aux nanotubes de carbone, eux-mêmes fluorescents au-delà de 1 μm . La Figure 1.31 montre d'une part les spectres d'émission du fluorophore et des nanotubes (Figure 1.31.a) et d'autre part la fluorescence de cette sonde injectée dans le système vasculaire d'une souris. On voit que la visualisation du réseau vasculaire est bien plus précise lorsque l'on observe dans la seconde fenêtre de transparence des tissus (Figures 1.31.e-g) plutôt qu'à 800 nm (Figures 1.31.b-d). Cela suggère que la diffusion est moins importante pour les longueurs d'onde supérieures à 1 μm , permettant une meilleure résolution spatiale. Dans cette publication, il est même démontré que la fluorescence des nanotubes de carbone permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre de 30 μm !

⁵² C. Bordier. Diffusion de la lumière par des tissus biologiques : Etude expérimentale et modélisation par l'équation de transfert radiatif vectorielle. Biological Physics [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. French. <tel-00426428>. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00426428>

⁵³ G. Hong et al. Multifunctional *in vivo* vascular imaging using near-infrared II fluorescence. Nat. Med. 2012, 18 (12), 1841.

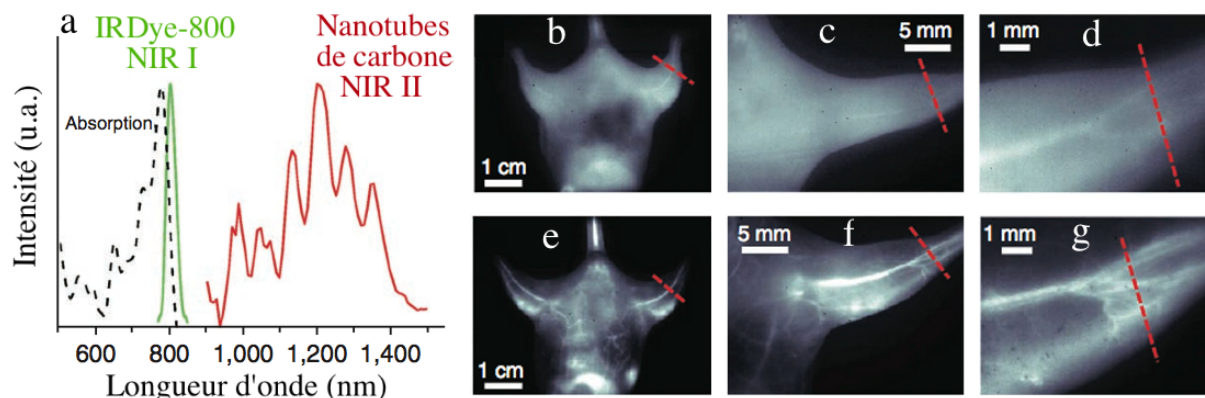


Figure 1.31. Images de vaisseaux sanguins par fluorescence (excitation à 785 nm) dans la première et la seconde fenêtre de transparence des tissus chez la souris. a) Spectre d'absorption de conjugués de nanotubes de carbone mono-feuillet et de fluorophores IRDye-800 (ligne noire pointillée). b-d) Fluorescence à 800 nm d'une souris ayant reçu une injection de conjugués nanotubes-IRDye. e-g) Fluorescence d'une souris ayant reçu une injection de conjugués nanotubes-IRDye dans la seconde fenêtre de transparence des tissus. (Adapté de 53)

Bien que ces interactions rayonnement-matière représentent a priori une limite importante de l'imagerie optique, les modifications que subissent des rayonnements traversant des tissus vivants peuvent être une grande source d'information sur ces tissus. Dès 1929, le diagnostic de tumeurs du sein a pu être basé sur la transillumination des tissus (ou diaphanographie) dans la gamme du proche infrarouge.⁵⁴ Mais de trop faibles sensibilité et spécificité empêchèrent d'utiliser cette méthode en clinique. Puis, en 1977, Jobsis démontra le potentiel de la mesure de l'absorbance à 800 nm d'organes tels que le cœur ou le cerveau pour en mesurer la perfusion ou l'oxygénation.⁵⁵ Plus récemment, une équipe du CHU de Pennsylvanie a prouvé l'efficacité de la tomographie optique pour suivre l'évolution d'une tumeur du sein chez une patiente recevant une chimiothérapie.⁵⁶ Les observations montrent que cette technique permet d'obtenir la même information que l'IRM sur l'évolution de la tumeur. Or, certaines thérapies ciblées, telles que des anticorps monoclonaux inhibant l'angiogenèse associée à la croissance tumorale, peuvent entraîner une nécrose des tumeurs sans changement de volume, rendant difficile l'interprétation d'IRM ou de scanners concernant la réponse au traitement. Ainsi, je pense qu'il est probable qu'à l'avenir les propriétés d'absorption, de polarisation ou de fluorescence des tissus soient utilisées en clinique pour déterminer leurs caractéristiques biologiques. L'imagerie optique pourrait alors permettre de déterminer de manière non invasive les propriétés normales et pathologiques d'un tissu et, *in fine*, de diagnostiquer certaines pathologies ou leur évolution.^{52,57,58}

⁵⁴ M. Cutler. Transillumination as an aid in the diagnosis of breast lesions. *Surg. Gynec. Obst.* 1929, 48, 721.

⁵⁵ F.F. Jobsis. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science.* 1977, 198, 1264.

⁵⁶ R. Choe et al. Diffuse optical tomography of breast cancer during neoadjuvant chemotherapy : a case study with comparison to MRI. *Med. Phys.* 2005, 32 (4), 1128.

⁵⁷ M. Monici et al. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2005, 11, 227.

⁵⁸ Y. Ardehshirpour et al. Biophotonics techniques for structural and functional imaging *in vivo*. *Anal. Cell. Pathol.* 2012, 35 (0), 317.

b) Quels outils pour la modalité optique ?

i. Utilisations et limites des fluorophores organiques moléculaires.

Les sondes optiques utilisées en recherche peuvent être de nature nanoparticulaire ou moléculaire. Les fluorophores organiques de la famille des cyanines ou des xanthènes tels que le vert d'indocyanine ou la fluorescéine (Figure 1.32.a et b, respectivement) ont été les premiers fluorophores utilisés en clinique. Les principales autres familles de fluorophores utilisées en laboratoire sont des porphyrines, des BODIPY ou des dérivés du squarate.⁵⁹ La fluorescéine est notamment utilisée en ophtalmologie par voie topique pour diagnostiquer des abrasions et des ulcères cornéaux ainsi que des kératites herpétiques. Elle est aussi utilisée par voie intra-veineuse pour réaliser des angiographies ophtalmiques à la fluorescéine. Ces clichés du fond de l'oeil permettent d'observer la vascularisation rétinienne et d'éventuelles conditions pathologiques telles que des fuites vasculaires (Figure 1.32.c) ou une dégénérescence maculaire liée à l'âge.⁶⁰ Le vert d'indocyanine peut aussi être utilisé pour réaliser des angiographies ophtalmiques,⁶¹ ainsi que pour évaluer la perfusion cérébrale après un accident vasculaire⁶² ou un œdème intra-cranien.⁶³ Il est aussi de plus en plus utilisé pour aider à la détection et l'excision de ganglions sentinelles^{64,65} lors de chirurgies oncologiques, notamment lors d'ablations de tumeurs mammaires.

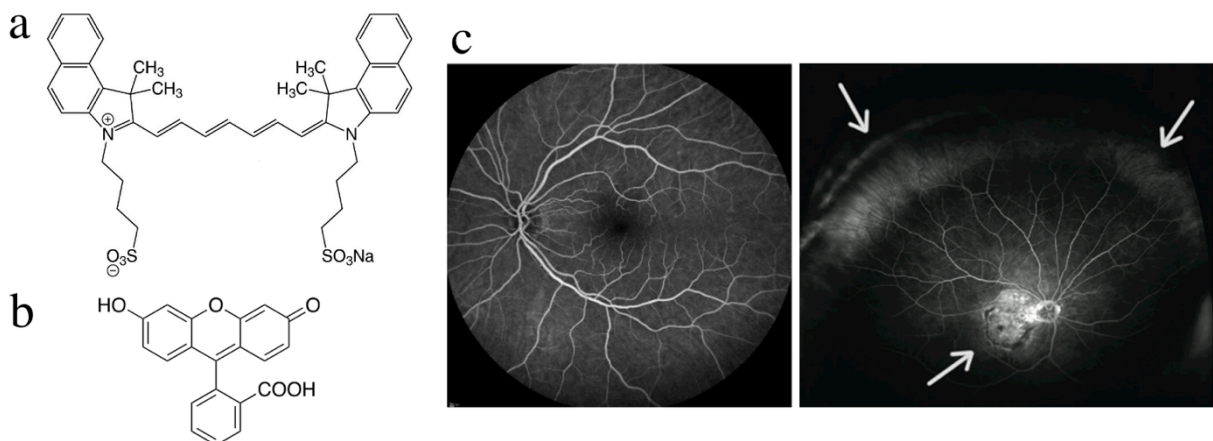


Figure 1.32. Exemples de fluorophores utilisés en clinique pour faire de l'imagerie optique et illustration en ophtalmologie. a) Vert d'indocyanine. b) Fluorescéine. c) Angiographies ophtalmiques à la fluorescéine. Gauche : angiographie classique d'une macula non pathologique (Crédits Dr. Antoine Rousseau). Droite : angiographie à champ large permettant de mettre en évidence une DMLA ainsi que des fuites vasculaires centrale et périphérique diffuses (flèches grises). (Adapté de 60)

⁵⁹ S. Luo et al. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials*. 2011, 32, 7127.

⁶⁰ S. Madhusudhan, N. Beare. Wide-field fluorescein angiography in wet age-related macular degeneration. *Sci. World J.* 2014, 536161.

⁶¹ M. M. Teussink et al. OCT angiography compared to fluorescein and indocyanine green angiography in chronic central serous chorioretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015, 56, 5229.

⁶² O. Steinkellner et al. Optical bedside monitoring of cerebral perfusion : technological and methodological advances applied in a study on acute ischemic stroke. *J. Biomed. Optics*. 2010, 15 (6), 061708.

⁶³ W. Weigl et al. Assessment of cerebral perfusion in post-traumatic brain injury patients with the use of ICG-bolus tracking method. *NeuroImage*. 2014, 85, 555.

⁶⁴ C. Hirche et al. Sentinel node biopsy by indocyanine green retention fluorescence detection for inguinal lymph node staging of anal cancer : preliminary experience. *Ann. Surg. Oncol.* 2010, 17, 2357.

⁶⁵ C. Hirche et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010, 121, 373.

Les sondes moléculaires souffrent de nombreux désavantages limitant leur utilisation en clinique. On peut distinguer trois points : la longueur d'onde, le rendement quantique et la sensibilité.

Il est difficile de contrôler les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Celles-ci dépendent de la structure chimique et modifier un fluorophore donné pour changer ses propriétés optiques requiert une pratique poussée de la chimie organique. De plus ces changements se font par bonds et l'ajout d'une double liaison ou d'un groupe sur un fluorophore afin d'obtenir les propriétés optiques voulues peut aussi modifier les propriétés physico-chimiques ou la stabilité chimique de la molécule qui est souvent peu soluble en milieu aqueux à cause des nombreuses insaturations nécessaires aux propriétés de fluorescence.⁵¹

Le rendement quantique des sondes moléculaires est généralement inférieur à 15%, notamment en milieu aqueux et il diminue avec l'augmentation de la longueur d'onde d'émission. En effet, augmenter celles-ci nécessite d'augmenter le nombre de liaisons π conjuguées, ce qui accroît le nombre de vibrations possible de la molécule, rendant d'autant plus probable les désexcitations non radiatives.⁶⁶ Or, le rendement quantique dépend des conditions de l'environnement du fluorophore (pH, oxygénation, concentration en fluorophores, présence d'ions). Tous ces paramètres peuvent entraîner un phénomène de désactivation, ou quenching, comme évoqué dans le premier chapitre de cette introduction.

La sensibilité de ces fluorophores peut être limitée lorsqu'ils sont conjugués à une substance que l'on veut suivre (protéine ou ligand, par exemple). Pour pouvoir observer la présence de cette substance, il est nécessaire qu'elle s'accumule en quantité suffisante à un endroit pour que le signal soit supérieur au bruit de fond. De plus, l'excrétion par les reins ou les voies biliaires peut réduire la biodisponibilité de ces substances. Enfin, l'excitation d'un fluorophore organique est souvent limitée par le phénomène de blanchiment. Cela consiste en une perte de la capacité de fluorescence de la molécule. Au bout d'une certaine durée d'illumination, le fluorophore ne pourra plus être observé, limitant ainsi son suivi au cours du temps.

Bien que ces substances présentent quelques désavantages, de nombreux travaux de recherches et innovations en chimie organique, physico-chimie ou nanoscience permettent d'améliorer leurs propriétés. De plus, leur utilisation est très répandue en biologie où elles peuvent servir à détecter ou suivre des protéines d'intérêt *in vitro* afin de mieux comprendre certains mécanismes de biologie moléculaire et cellulaire. Elles trouvent aussi une grande utilité à des fins de diagnostic. Dans ce dernier cas, ces techniques de marquage de ces protéines par fluorescence sont dites d'immunohistofluorescence (Figure 1.33).^{67,68}

⁶⁶ J. Mérian et al. Fluorescent nanoprobe dedicated to *in vivo* imaging : from preclinical validations to clinical translation. *Molecules*. 2012, 17, 5564.

⁶⁷ N. Matsui et al. Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia. *J. Neuroimmun.* 2014, 269, 56.

⁶⁸ A. Vargas-Caraveo et al. Chronic psychological distress as an inducer of microglial activation and leukocyte recruitment into the area postrema. *Neuroimmunomodulation*. 2015, 22, 311.

In vitro, la contrainte liée à l'absorption des tissus est presque nulle et une plus large gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission peuvent être utilisées. *In vivo*, cette contrainte d'absorption rend nécessaire, pour des raisons d'efficacité, que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission soient comprises dans une des fenêtres de transparence des tissus. Récemment, les nanotechnologies ont proposé des solutions aux limites rencontrées par les fluorophores moléculaires. Bien que ces nouvelles possibilités présentent aussi quelques désavantages, elles permettent dans certains cas d'améliorer grandement l'efficacité de la modalité optique pour faire de l'imagerie, notamment *in vivo*.

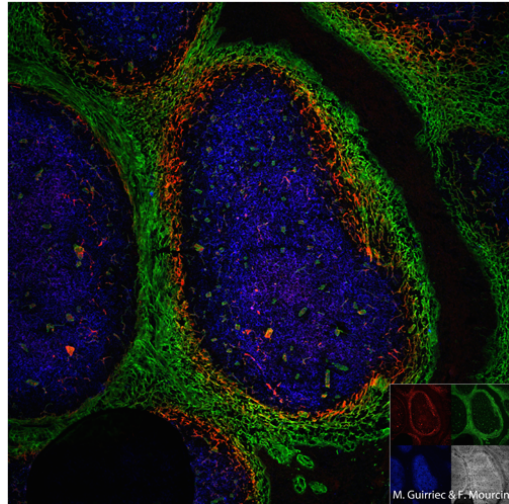


Figure 1.33. Marquage en immunohisto-fluorescence de différentes cellules stromales d'une coupe d'amygdale humaine. Crédits M. Guirriec et F. Mourcin, MRic.

ii. Nanoparticules pour la modalité optique

Il existe une quantité impressionnante de nanoparticules d'imagerie optique décrites dans la littérature scientifique. Celles-ci mettent à profit différents mécanismes de luminescence décrits dans le chapitre A de cette partie. Je vais illustrer cette diversité en présentant des outils basés sur ces différents phénomènes physiques, ainsi que des exemples d'applications *in vivo*.

La désignation "nanoparticules fluorescentes" ne me semble pas fournir beaucoup d'informations car elle regroupe différents types de nanoparticules dont le phénomène de fluorescence peut être un des nombreux présentés dans le premier chapitre de cette introduction. De plus, les déclinaisons possibles lors de la synthèse de telles nanoparticules font qu'une grande variabilité existe dans ce genre de nanoparticules. Dans les paragraphes suivants je vais donc distinguer les différentes familles de nanoparticules mettant à profit ces phénomènes lumineux.

- α . Nanoparticules "cargos" de fluorophores organiques

Il est envisageable de limiter certains des problèmes rencontrés avec les fluorophores organiques en modifiant leur formulation. Les encapsuler ou les fixer en surface de nanoparticules peut être intéressant pour diminuer leur exposition au milieu environnant ou augmenter leur concentration et ainsi le seuil de détection. Des différences de biodistribution sont attendues, mais une fonctionnalisation adéquate des nanoparticules "cargos" peut aussi permettre de mieux la contrôler.

Les nanoparticules utilisées et transformées pour créer de nouvelles sondes fluorescentes sont nombreuses et peuvent être d'origine inorganique, polymérique organique voire biologique :

- Les nanoparticules de silice : la silice peut servir à fabriquer des nanoparticules marquées avec différents fluorophores^{69,70} tels que le bleu de méthylène (Figures 1.34.a

⁶⁹ C.-H. Lee et al. Near-infrared mesoporous silica nanoparticles for optical imaging : characterization and *in vivo* biodistribution. *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 215.

⁷⁰ X. He et al. Preparation of luminescent Cy5 doped core-shell SFNPs and its application as a near-infrared fluorescent marker. *Talanta.* 2007, 72, 1519.

et b),⁷¹ la fluorescéine ou la rhodamine B (Figures 1.34.c et d).⁷² Le fluorophore utilisé peut être adsorbé au sein du réseau mésoporeux du matériau (Figure 1.34.a), encapsulé à l'intérieur d'une coquille de silice (Figure 1.34.c) ou encore lié de manière covalente à la particule.

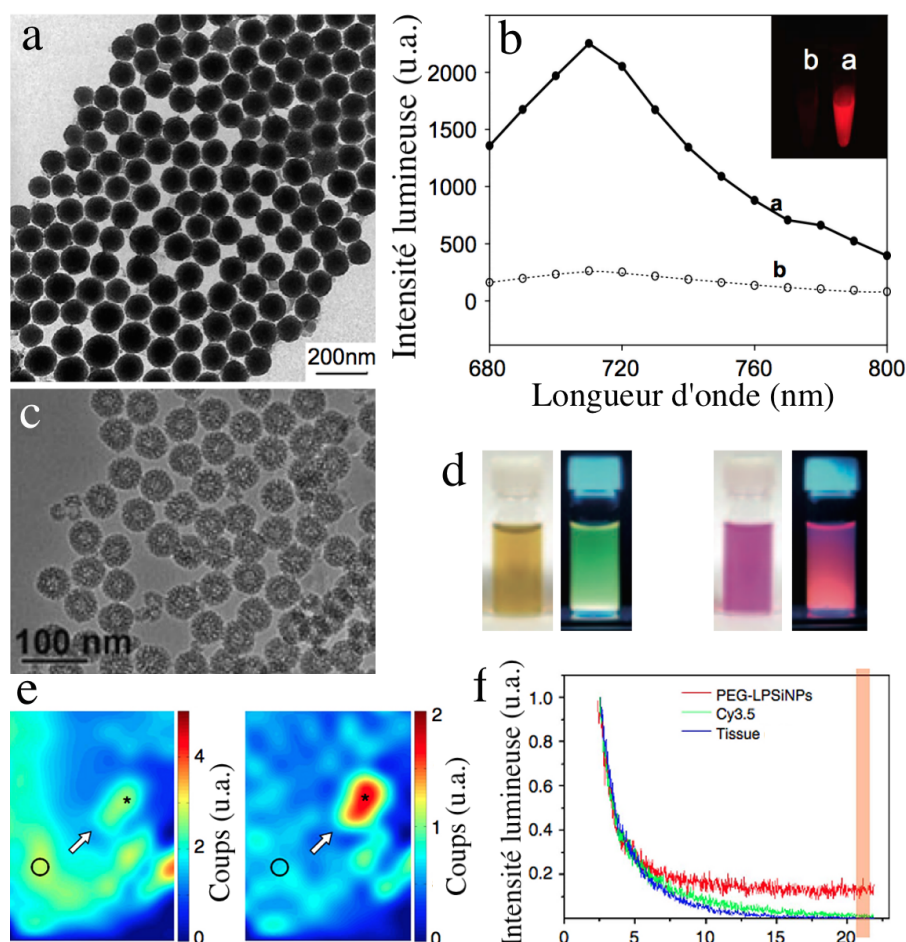


Figure 1.34. Exemples de nanoparticules de silice mésoporeuse fluorescentes. a) Image TEM de billes de silice mésoporeuse. b) Spectre de fluorescence des mêmes billes avec ou sans bleu de méthylène (courbes a et b, respectivement). c) Image TEM de billes creuses de silice mésoporeuse. d) Billes creuses chargées en fluorescéine (gauche) ou en rhodamine B (droite) en suspension, visualisées en lumière blanche ou sous illumination UV. e) Images de fluorescence de tumeur d'une souris ayant reçu par voie intraveineuse 10 mg.kg⁻¹ de nanoparticules luminescentes de silice poreuse recouvertes de PEG (PEG-LPSiNPs) 4 h après injection, en même temps que l'illumination (gauche) ou 21 ns après injection (droite), la tumeur est localisée par une étoile, tandis que le bruit de fond est mesuré au niveau du rond. f) Déclins de luminescence de PEG-LPSiNPs et de Cyanine 3.5 injectés en sous-cutané chez une souris nude, ainsi que d'une zone neutre (Tissue). La barre orangée montre la fenêtre temporelle sélectionnée pour réaliser une acquisition permettant de s'affranchir de l'auto fluorescence des tissus, et ainsi d'augmenter le rapport signal/bruit (démonstration *in vivo* en e). (Adapté de 71, 72 et 78)

Ces particules peuvent être injectées par voie systémique pour réaliser de l'imagerie de tumeurs ou de ganglions sentinelles,^{73,74} pour suivre en temps réel le métabolisme

⁷¹ X. He et al. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2009, 30, 5601.

⁷² J. Kim et al. Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. *Angew.Chem.* 2008, 120, 8566.

⁷³ X. Huang et al. Long-term multimodal imaging of tumor draining sentinel lymph nodes using mesoporous silica-based nanoprobes. *Biomaterials*. 2012, 33, 4370.

⁷⁴ J. S. Kim et al. Development and *in vivo* imaging of a PET/MRI nanoprobe with enhanced NIR fluorescence by dye encapsulation. *Nanomedicine*. 2012, 7 (2), 219.

hépatique de nanoparticules,⁷⁵ encapsuler des protéines fluorescentes⁷⁶ ou encore solubiliser des fluorophores pour faire de l'imagerie *in vivo*.⁷⁷ La silice mésoporeuse, réputée biocompatible, peut ainsi permettre une utilisation plus facile de certains fluorophores en augmentant leur solubilité ainsi que leur stabilité dans des milieux physiologiques. Les propriétés de photoluminescence de nanoparticules de silice poreuse biodégradables peuvent aussi être utilisées afin de réaliser de l'imagerie de tumeurs en l'absence de tout autre fluorophore.^{78,79} Cependant, cela est faisable à condition d'être capable de traiter le signal obtenu pour éliminer les premières nanosecondes d'acquisition correspondant à l'autofluorescence des tissus (phénomène de 10-15 ns) et ne garder que celui dû à ces particules émettant quelques dizaines de μ s (Figures 1.34.e et f).

- Les nanoparticules de phosphate de calcium ont l'avantage d'être considérées comme biocompatibles et non toxiques par la FDA car c'est un matériau constituant notamment les os et les dents.⁸⁰ Tout comme la silice mésoporeuse, le phosphate de calcium peut être utilisé pour encapsuler différents fluorophores (Figure 1.35).⁸¹ Cela permet d'éviter la désactivation de la fluorescence par le milieu biologique, d'empêcher l'agrégation et la clairance observées lorsque ce fluorophore est injecté en solution.⁸² Ces particules injectées par voie intraveineuse après fonctionnalisation par du PEG s'accumulent passivement dans des tumeurs du sein chez la souris. L'encapsulation de cyanine 3 permet d'augmenter son rendement quantique d'un facteur 20,⁸³ ainsi que de marquer des cellules d'intérêt.⁸¹

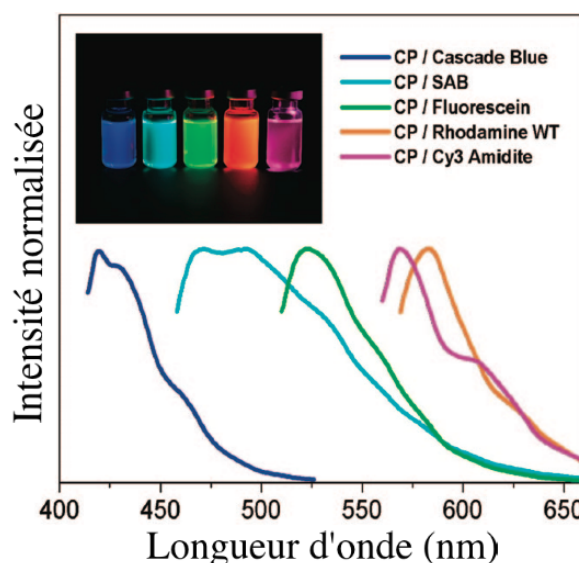


Figure 1.35. Spectres de fluorescence de nanoparticules de phosphate de calcium contenant différents fluorophores. (Adapté de 81)

- Les dendrimères sont des polymères ramifiés dont la taille et la géométrie sont bien définies (Figure 1.36.a).⁸⁴ Leur structure contient des cavités sphériques délimitées par

⁷⁵ S.-H. Cheng et al. Visualizing dynamics of sub-hepatic distribution of nanoparticles using intravital multiphoton fluorescence microscopy. *ACS Nano*, 2012, 6 (5), 4122.

⁷⁶ Y Yang et al. An individually coated near-infrared fluorescent protein as a safe and robust nanoprobe for *in vivo* imaging. *Nanoscale*, 2013, 5, 10345.

⁷⁷ M. Helle et al. Surface chemistry architecture of silica nanoparticles determine the efficiency of *in vivo* fluorescence lymph node mapping. *ACS Nano*, 2013, 7 (10), 8645.

⁷⁸ J.-H. Park et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications. *Nat. Mater.* 2009, 8, 331.

⁷⁹ L. Gu et al. *In vivo* time-gated fluorescence imaging with biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles. *Nat. Commun.* 2013, 4, 1.

⁸⁰ S. V. Dorozhkin and M. Epple. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 3130.

⁸¹ T. T. Morgan et al. Encapsulation of organic molecules in calcium phosphate nanocomposite particles for intracellular imaging and drug delivery. *Nano Lett.* 2008, 8 (12), 4108.

⁸² E. I. Altinoglu et al. Near-infrared emitting fluorophore-doped calcium phosphate nanoparticles for *in vivo* imaging of human breast cancer. *ACS Nano*, 2008, 2 (10), 2075.

⁸³ H. S. Muddana et al. Photophysics of Cy3-encapsulated calcium phosphate nanoparticles. *Nano Lett.* 2009, 9, 1559.

⁸⁴ H. Sarin et al. Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *J. Transl. Med.* 2008, 6, 80.

des superpositions de branches remplies de solvant.⁸⁵ Celles-ci peuvent être utilisées pour transporter *in vivo* des fluorophores liés de manière covalente.^{84, 86} Ces dendrimères ont une biodistribution qui permet de cibler passivement des cellules de glioblastomes chez la souris (Figure 1.36.b).

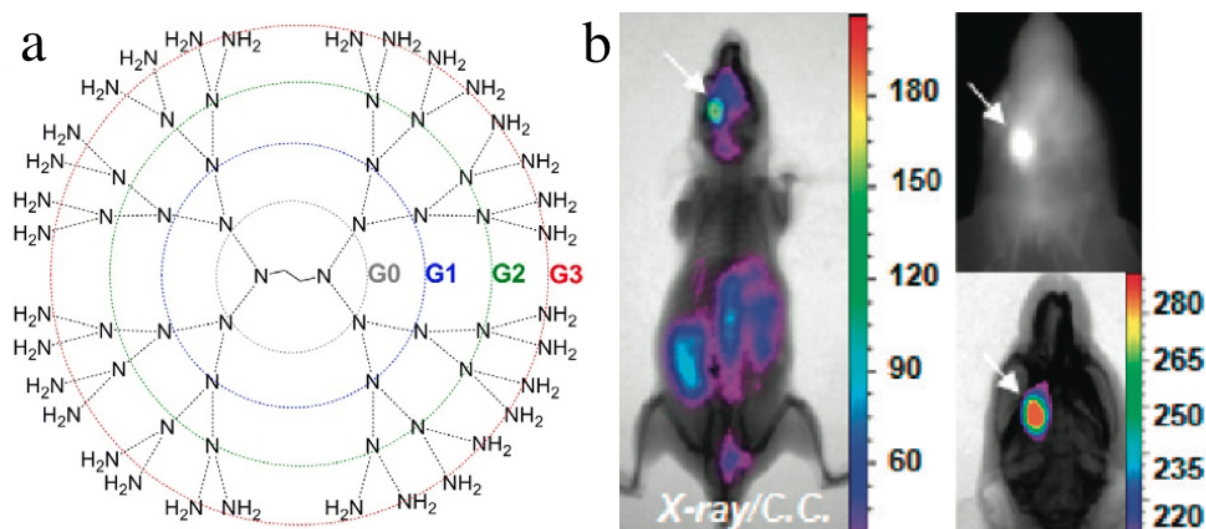
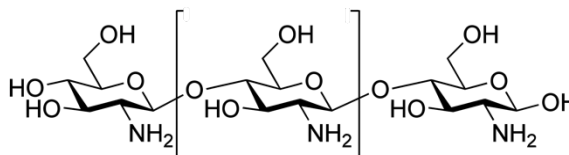


Figure 1.36. Exemple d'utilisation des dendrimères en nanosciences. a) Représentation schématique en deux dimensions de la structure de dendrimères de polyamidoamine jusqu'à la génération 3 (G3). La classification en générations correspond au nombre de couches de monomères. b) Gauche : superposition d'acquisitions en radiographie X et en fluorescence proche infrarouge d'une souris 24 h après injection de 0,05 mmol.kg⁻¹ de dendrimères PAMAM (Dendritech Inc.) de 5^{ème} génération marquée avec de la cyanine 5.5 et de la rhodamine montrant l'accumulation des dendrimères dans la tumeur cérébrale. Droite : gros plan sur la tête de la souris. Image de fluorescence en nuances de gris (haut) et superposition radiographie X et fluorescence (bas). (Adapté de 84 et 86)

Une publication montre aussi la possibilité de fonctionnaliser des dendrimères marqués à la cyanine 5 avec un peptide comme le VEGF (Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial) pour cibler la néoangiogenèse tumorale chez des souris auxquelles des tumeurs de carcinomes murins mammaires 4T1 ont été implantées.⁸⁷

- Les nanoparticules polymériques semblent être des agrégats sphéroïdes remplis de polymères entremêlés. Ces nanoparticules peuvent être formées à l'aide de plusieurs polymères tels que le chitosan (Figure 1.37) ou un mélange d'acide poly-glycolique et d'acide poly-lactique (PLGA). Des nanoparticules de chitosan marquées à la cyanine 5.5 ont montré une efficacité pour cibler des tumeurs mammaires⁸⁸ ou des glioblastomes (U87) ainsi que des métastases hépatiques et pulmonaires chez la souris.⁸⁹ De telles nanoparticules chargées avec un peptide fluorescent sensible à l'activité de métalloprotéases



⁸⁵ J. Niu et al. Luminescent nanoprobes for *in vivo* bioimaging. Trends Anal. Chem. 2014, 58, 112.

⁸⁶ H. Yan et al. Two-order targeted brain tumor imaging by using an optical/paramagnetic nanoprobe across the blood brain barrier. ACS Nano. 2012, 6 (1), 410.

⁸⁷ M. V. Backer et al. Vascular endothelial growth factor selectively target boronated dendrimers to tumor vasculature. Mol. Cancer Ther. 2005, 4 (9), 1423.

⁸⁸ T. Nam et al. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual modality optical/MR cancer imaging. Bioconj. Chem. 2010, 21, 578.

⁸⁹ J. H. Na et al. Real-time and non-invasive optical imaging of tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles in various tumor models. Biomaterials. 2011, 32, 5252.

matricielles (MMP) a permis de mettre en évidence la présence de ces enzymes dans un modèle de cancer du colon chez la souris,⁹⁰ démontrant leur utilisation potentielle comme nanocapteurs.

Le PLGA (Figure 1.38) est un polymère biodégradable considéré comme biocompatible par la FDA. Mélangé à du PEG, il peut servir à synthétiser des nanoparticules fluorescentes et furtive pour cibler des tumeurs chez la souris.⁹¹ Une équipe utilisant des nanoparticules PEG-PLGA (Figure 1.39.a) fonctionnalisées avec un peptide ayant une affinité pour la matrice osseuse (Asp₃) a montré qu'il était possible de cibler celle-ci *in vivo* (Figure 1.39.b).⁹² Une autre application originale a été réalisée par l'équipe de Ralph Weissleder en y incorporant un photosensibilisateur fluorescent pour réaliser de la photo-thérapie dynamique de tumeurs.⁹³

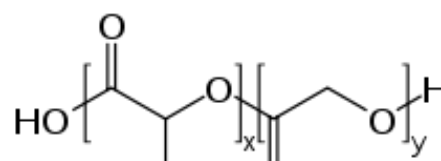


Figure 1. 38. Structure chimique du PLGA.

- Les polymersomes sont des vésicules polymériques qui ressemblent à des sphères creuses (Figure 1.39.c et d). Des polymersomes obtenus à partir d'un copolymère à blocs (acide polyacrylique et poly co-distéarine acrylate) marqués avec de la cyanine 5.5⁹⁴ ou à partir de PEO₃₀-PBD₄₆ marqués avec un dérivé d'oligoporphyrine⁹⁵ s'accumulent passivement dans des tumeurs après injection intraveineuse. Des polymersomes utilisant d'autres polymères, fonctionnalisés avec un dérivé de la ghréline (une hormone digestive orexigène dont les récepteurs sont situés principalement dans l'hypothalamus), la des-octanoyl ghréline, ont une biodistribution modifiée et une accumulation au niveau cérébral.⁹⁶ Ces mêmes polymersomes bi-fonctionnalisés avec la des-octanoyl ghréline et de l'acide folique (ou vitamine B9) permettent une accumulation accrue et un meilleur ciblage de tumeurs gliales.⁹⁷ Le choix de l'acide folique est lié à la connaissance des marqueurs surfaciques de la plupart des tumeurs : la majorité surexprime la forme α du récepteur de l'acide folique d'un facteur pouvant aller de 50 à 300 par rapport aux cellules saines correspondantes.^{98,99}

⁹⁰ S. Lee et al. Polymeric nanoparticle-based activatable near-infrared nanosensor for protease determination *in vivo*. Nano Lett. 2009, 9 (12), 4412.

⁹¹ B. Luo et al. Novel DiR and SPIO nanoparticles embedded PEG-PLGA nanobubbles as a multimodal imaging contrast agent. Biomed. Mater. Eng. 2015, 26, S911.

⁹² Y.-C. Fu et al. Aspartic acid-based modified PLGA-PEG nanoparticles for bone targeting : *in vitro* and *in vivo* evaluation. Acta Biomater. 2014, 10, 4583.

⁹³ J. R. McCarthy et al. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. Nano Lett. 2005, 5 (12), 2552.

⁹⁴ W.-C. Huang et al. Development of a diagnostic polymersome system for potential imaging delivery. Colloids Surf. B Biointerfaces. 2015, 128, 67.

⁹⁵ P. P. Ghoroghchian et al. Near-infrared-emissive polymersomes: self-assembled soft matter for *in vivo* optical imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005, 102 (8), 2922.

⁹⁶ Y.-C. Chen et al. Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin for the delivery of therapeutic and imaging agents into brain tissues. Biomaterials. 2014, 35, 2051.

⁹⁷ Y.-C. Chen et al. Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin and folate as a BBB-penetrating cancer cell-targeting delivery system. Biomaterials. 2014, 35, 4066.

⁹⁸ S. D. Weitman et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. Cancer Res. 1992, 52 (12), 3396.

⁹⁹ J. F. Ross et al. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues *in vivo* and in established cell lines. Cancer. 1994, 73 (9), 2432.

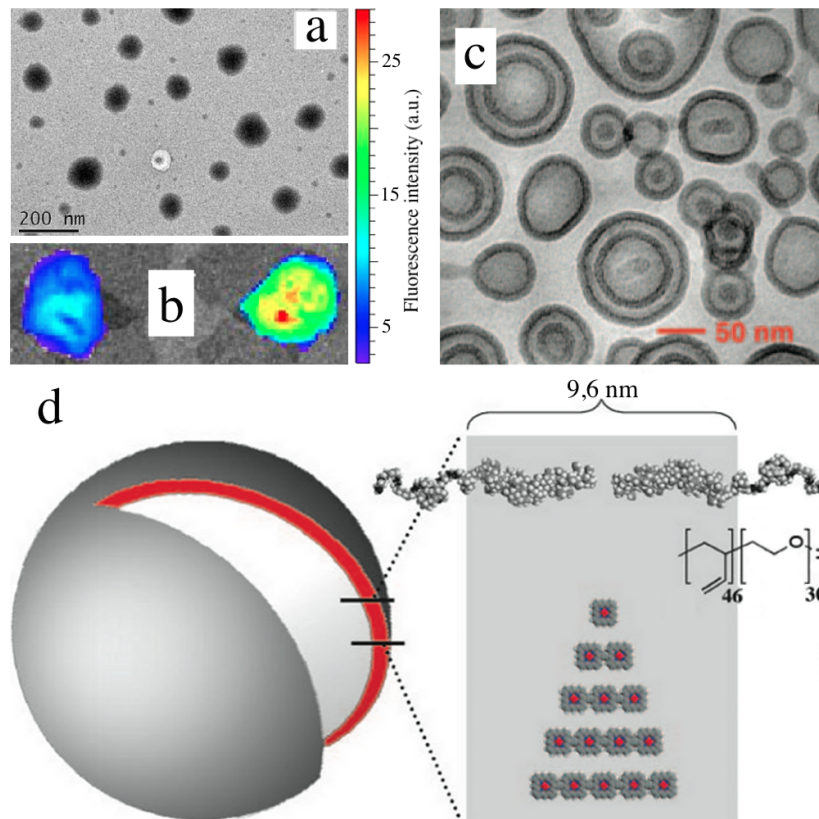


Figure 1.39. Nanoparticules polymériques et polymersomes. a) Images de MET de nanoparticules de PLGA fonctionnalisées avec du PEG arborant un peptide Asp₃ à son extrémité. Grâce à cette fonctionnalisation, ces particules ont une affinité importante pour la matrice osseuse. b) Fluorescence de vertèbres de souris ayant reçu une injection de nanoparticules de PLGA-PEG (gauche) ou PLGA-PEG-Asp₃ (droite). c) Image de cryo-MET de polymersomes fluorescents dans le proche infrarouge. d) Dans l'eau, le copolymère à blocs PEO₃₀-PBD₄₆ s'auto-assemble en vésicules polymériques ou polymersomes avec les extrémités PBD hydrophobes orientées vers l'intérieur de la membrane formée. Cette membrane contient les fluorophores composés de macrocycles de (porphinato)-zinc (II) représentés en carrés gris au centre rouge. (Adapté de 95 et 92)

- Les liposomes sont des vésicules sphériques possédant au moins une bicouche lipidique et ne doivent pas être confondus avec les micelles (Figure 1.40). Ces nanoparticules sont principalement constituées de phospholipides, tels que des phosphatidylcholines, aussi appelées lécithines. Ces substances, sont des composants importants des membranes cellulaires et sont donc biocompatibles. Les liposomes ont pour application clinique principale la vectorisation d'agents thérapeutiques tels que des médicaments ou de l'ADN. Les médicaments hydrophiles peuvent être encapsulés dans le coeur aqueux des liposomes. S'ils sont hydrophobes, ils peuvent rester dans la bicouche lipidique (Figure 1.41). Les médicaments approuvés en clinique sous forme liposomale sont principalement des anti-cancéreux (daunorubicine, doxorubicine, vincristine, cytarabine) car les liposomes permettent de diminuer les effets

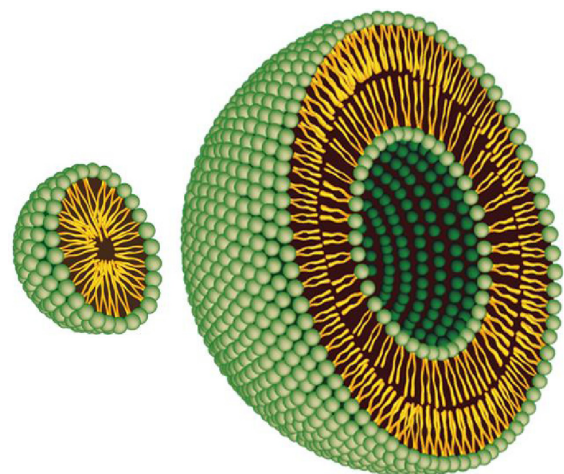


Figure 1.40. Différents arrangements de molécules amphiphiles telles que les phospholipides. Une micelle (gauche) a une structure très différente d'un liposome (droite). (Adapté de G. Bozzuto & A. Molinari. Liposomes as nanomedical devices. Int. J. Nanomedicine. 2015, 10, 975)

secondaires en ciblant les tissus cancéreux ; mais il existe d'autres utilisations pour la vectorisation d'agents thérapeutiques tels que l'amphotéricine B (un anti-fongique), la morphine, la vertéporfine (un photosensibilisateur utilisé pour traiter la DMLA), l'estradiol ou encore des vaccins contre l'hépatite A ou le virus de la grippe.

In vivo, ces liposomes peuvent aussi être suivis en imagerie optique s'ils sont marqués à l'aide d'un fluorophore. Le vert d'indocyanine a été utilisé pour marquer des liposomes afin d'observer différents modèles de tumeurs *in vivo*.¹⁰⁰ Il est ainsi possible d'observer le micro-environnement et la vascularisation¹⁰¹ tumorale ou certains ganglions sentinelles¹⁰² chez la souris. Le même fluorophore a été utilisé pour suivre des liposomes fonctionnalisés avec un anticorps monoclonal humanisé (hCTM01) ayant une affinité importante pour une protéine produite par de nombreux tissus épithéliaux, entrant dans la composition des mucus : la mucine MUC-1. Elle est surexprimée dans de nombreux carcinomes, et les liposomes fluorescents fonctionnalisés par hCTM01 permettent de visualiser de manière non invasive des tumeurs murines ou humaines exprimant MUC-1 chez la souris.¹⁰³

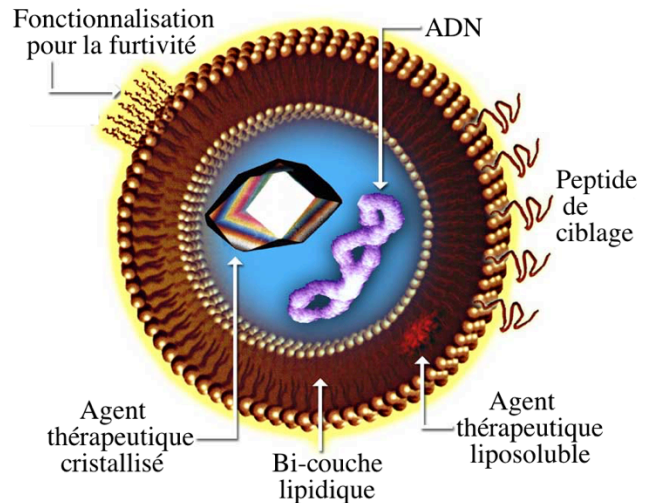


Figure 1.41. Représentation schématique d'un liposome constitué d'une bicouche lipidique avec un cœur aqueux (bleu) encapsulant un agent thérapeutique. Le recouvrement par un polymère tel que le PEG peut augmenter la demi-vie de circulation dans le sang tandis qu'un peptide permet le ciblage de zones d'intérêt. (crédit Kosigrim, Wikipédia)

Quelques autres travaux scientifiques rapportent la possibilité de fonctionnaliser des liposomes avec des peptides ayant une affinité pour des récepteurs transmembranaires surexprimés en surface de nombreuses cellules cancéreuses. Les récepteurs de la tyrosine kinase (RTK) sont des éléments clés de la régulation des processus développementaux cellulaires et ont souvent un rôle critique dans la prolifération tumorale. Certains de ces récepteurs sont souvent surexprimés en surface de ces cellules et sont donc des cibles de choix pour de nouvelles pistes thérapeutiques.¹⁰⁴ L'équipe de Yuhong Xu a utilisé un peptide de 12 acides aminés, ayant une constante de dissociation d'environ 22 nM avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), membre d'une sous famille des RTK. Après injection intraveineuse de ces liposomes à des souris porteuse de tumeurs surexprimant l'EGFR, l'accumulation des liposomes dans la tumeur est observée pendant 54 h par fluorescence grâce à l'ajout de cyanine 5.5.¹⁰⁵ L'équipe de Qiang Zhang a utilisé une stratégie similaire en ciblant EphA2 à l'aide d'un peptide de 13 acides aminés appelé YSA. EphA2 est un RTK de la sous famille des récepteurs de l'éphrine surexprimé sur l'endothélium formé lors de l'angiogénèse

¹⁰⁰ A. Suganami et al. Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 7481.

¹⁰¹ N. Beziere et al. Dynamic imaging of PEGylated indocyanine green liposomes within the tumor microenvironment using multi-spectral optoacoustic tomography. *Biomaterials.* 2015, 37, 415.

¹⁰² T. Toyota et al. Near-infrared-fluorescence imaging of lymph nodes by using liposomally formulated indocyanine green derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 721.

¹⁰³ N. Lozano et al. Monoclonal antibody-targeted PEGylated liposome-ICG encapsulating doxorubicin as a potential theranostic agent. *Int. J. Pharm.* 2015, 482, 2.

tumorale ainsi qu'en surface de certaines cellules cancéreuses. L'accumulation de ces liposomes marqués à l'aide d'une cyanine commerciale (DiR) dans une tumeur humaine du sein implanté chez la souris permet l'observation de celle-ci en imagerie optique tandis que le fluorophore DiR injecté seul ne s'accumule que dans le foie (Figure 1.42).¹⁰⁶

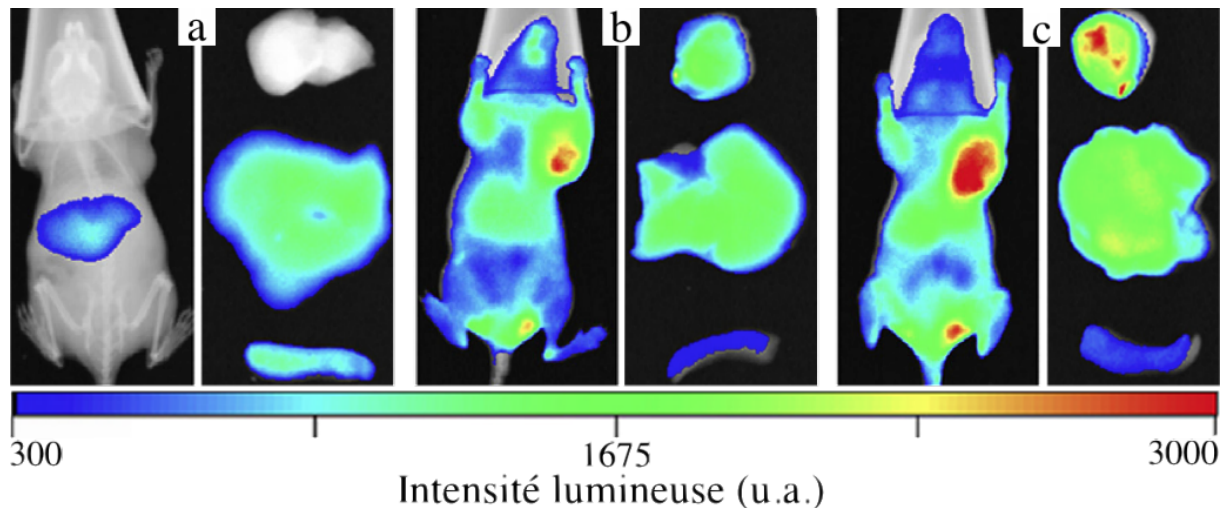


Figure 1.42. Utilisation de liposomes pour l'imagerie optique. Images de fluorescence *in vivo* et *ex vivo* de souris atteintes d'une tumeur du sein ayant reçu 200 µL d'une suspension de cyanine DiR (a), d'une suspension de liposomes fluorescents (b) ou de liposomes fluorescents fonctionnalisés à l'aide d'un peptide ciblant le récepteur de la tyrosine kinase EphA2 (c). Pour chaque condition, les organes présentés *ex vivo* sont la tumeur, le foie et la rate (de haut en bas). Les images montrent une différence de biodistribution du fluorophore en fonction de sa formulation, l'encapsulation dans un liposome, et particulièrement un liposome ciblant EphA2, augmente significativement la quantité reçue par la tumeur. (Adapté de 106)

- Les lipoprotéines sont des cargos fabriqués par les intestins et le foie pour transporter les triglycérides et le cholestérol (Figure 1.43) dans les tissus périphériques. Ces composants sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire. Or, les triglycérides et le cholestérol sont des molécules lipophiles qui ne sont pas solubles dans le milieu salin et aqueux sanguin. Les lipoprotéines ont une surface hydrophile constituée des têtes polaires de phospholipides, des groupes alcools du cholestérol et d'apoprotéines. Le coeur est rempli de cholestérol estérifié et de triglycérides (Figure 1.44) ainsi rendus disponibles dans les tissus périphériques. Il existe différentes sortes de lipoprotéines, classées par échelle de densité. Deux sortes ont été utilisées en recherche pour faire de l'imagerie optique : les lipoprotéines basse densité (low-density lipoproteins, LDL) et les lipoprotéines haute densité (high-density lipoproteins, HDL). Ces deux familles ont des rôles

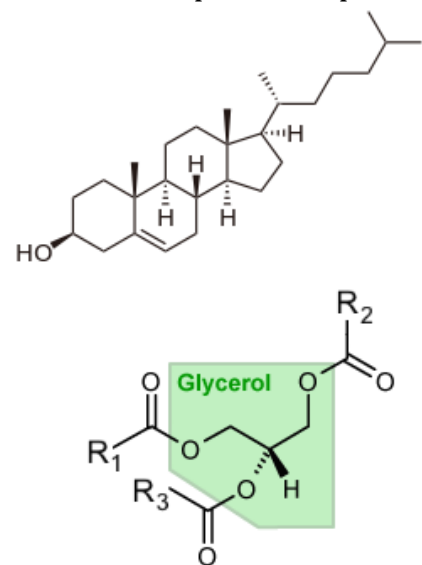


Figure 1.43. Structures chimiques du cholestérol et des triglycérides.

¹⁰⁴ E. Zwick et al. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr. Relat. Cancer*. 2001, 8, 161.

¹⁰⁵ S. Song et al. Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor *in vivo*. *Int. J. Pharm.* 2008, 363, 155.

¹⁰⁶ Z. Guo et al. Dual targeting for metastatic breast cancer and tumor neovasculature by EphA2-mediated nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 2015, 493, 380.

physiologiques différents, et nous avons tendance à les connaître sous les noms respectifs de mauvais et bon cholestérol.^{107,108,109,110}

Utiliser ces lipoprotéines représente des avantages en terme de furtivité, car ce sont des particules endogènes, mais aussi en terme de distribution de taille : les LDL ont des tailles qui varient entre 18 et 25 nm tandis que les HDL mesurent de 8 à 12 nm.¹¹¹ Ces diamètres bien définis et faibles sont un avantage important par rapport aux liposomes souvent polydisperses et dont les tailles peuvent atteindre plusieurs centaines de nanomètres.

Des LDL marquées à la carbocyanine injectées par voie intraveineuse permettent de visualiser des mélanomes murins sans fonctionnalisation particulière.¹¹² Cela est possible car les récepteurs cellulaires aux LDL sont surexprimés par les cellules cancéreuses, dont la forte prolifération nécessite un apport en cholestérol et triglycérides supérieur aux cellules saines. La même équipe a montré qu'il était possible de modifier la biodistribution de ces LDL en les fonctionnalisant avec de l'acide folique.¹¹³ Ce ligand permet d'empêcher l'internalisation de ces LDL par des cellules surexprimant le récepteur aux LDL (HepG2, cellules de carcinome hépatocellulaire humain) ou n'exprimant pas le récepteur de l'acide folique (HT1080, cellules de fibrosarcome humain), tandis qu'il permet l'internalisation par d'autres cellules cancéreuses surexprimant le récepteur de l'acide folique (KB, cellules de carcinome épidermoïde humain). Ces LDL marquées avec la cyanine commerciale DiR peuvent ainsi être suivies *in vivo* après injection intraveineuse chez des souris portant à la fois des tumeurs HT1080 et KB (Figure 1.45). Toujours la même équipe a réalisé une fonctionnalisation similaire, à l'aide d'acide folique, mais sur des HDL. Marquées avec la cyanine DiR, ces HDL se sont montrées efficaces pour s'accumuler dans des tumeurs murines d'épithélium ovarien seulement lorsqu'elles étaient fonctionnalisées avec de l'acide folique et qu'elles étaient injectées par voie intra-péritonéale.¹¹⁴ D'autres HDL marquées avec le même fluorophore et fonctionnalisées avec un peptide RGD ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$, exprimées par les cellules endothéliales, montrent une accumulation

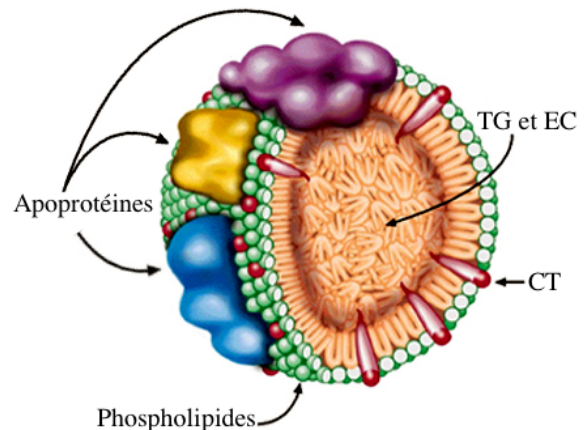


Figure 1.44. Représentation schématique d'une lipoprotéine. La surface est composée de protéines, de phospholipides et de cholestérol (CT) tandis que le cœur contient des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol (EC).

¹⁰⁷ E. Favari et al. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015, 224, 181.

¹⁰⁸ Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2015 Jun 10]. In: De Groot LJ et al. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. 2000-. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896

¹⁰⁹ A. J. Lusis, P. Pajukanta. A treasure trove for lipoprotein biology. *Nat. Genet.* 2008, 40 (2), 129.

¹¹⁰ K.-A. Rye, P. J. Barter. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. *Circ. Res.* 2014, 114, 143.

¹¹¹ G. Zheng et al. Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102 (49), 17757.

¹¹² H. Li et al. Carbocyanine labeled LDL for optical imaging of tumors. *Acad. Radiol.* 2004, 11, 669.

¹¹³ J. Chen et al. Ligand conjugated low-density lipoprotein nanoparticles for enhanced optical cancer imaging *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5798.

¹¹⁴ I. R. Corbin et al. Near-infrared fluorescent imaging of metastatic ovarian cancer using folate receptor-targeted high density lipoprotein nanocarriers. *Nanomedicine (Lond).* 2013, 8 (6), 875.

tumorale dans un modèle de sarcome d'Ewing chez la souris.¹¹⁵ Le choix des intégrines $\alpha_v\text{-}\beta_3$ s'explique par le fait que ce sont celles qui semblent être les plus exprimées par l'endothélium lors de l'angiogénèse tumorale.¹¹⁶

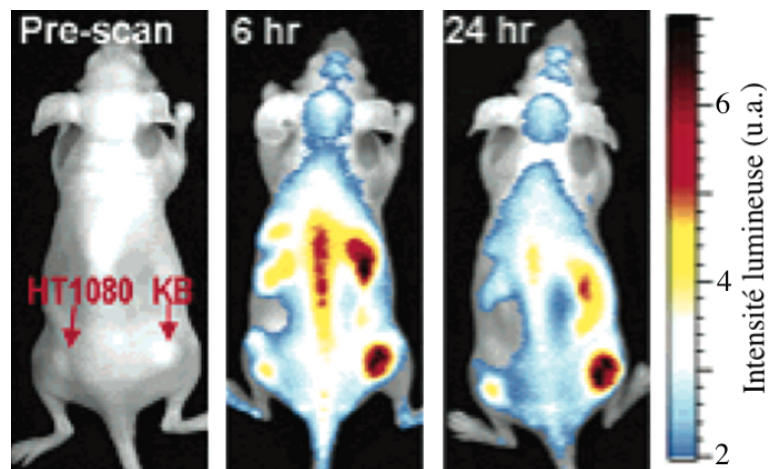


Figure 1.45. Ciblage sélectif de tumeurs à l'aide de LDL marquées avec de la cyanine DiR. Les souris portent deux tumeurs exprimant (KB) ou n'exprimant pas (HT1080) le récepteur de l'acide folique. Une injection de LDL fonctionnalisées avec de l'acide folique montre une accumulation préférentiellement dans les cellules KB exprimant le récepteur visé. (Adapté de 113)

- Les virus sont d'autres entités nanoparticulaires biologiques pouvant être utilisées comme cargos de fluorophores.^{117,118} La majorité des travaux scientifiques n'a réalisé que des tests de ciblage *in vitro*,¹¹⁹ mais quelques utilisations *in vivo* ont été rapportées sur des modèles d'embryons de poulet¹²⁰ ou chez la souris. Dans ce dernier cas, l'utilisation de la modalité optique n'a pas eu lieu *in vivo* mais *ex vivo* sur des tumeurs¹²¹ ou des thrombus.¹²² Une application plus prometteuse, bien qu'effectuée sur un embryon de poulet, est l'utilisation d'un phytovirus internalisé par les cellules vasculaires endothéliales (Figure 1.46). En effet, ce virus marqué avec un fluorophore permet de visualiser le réseau vasculaire d'un organe cible ou d'une tumeur à un moment précis. Un marquage ultérieur avec un autre fluorophore permet de visualiser l'évolution de la

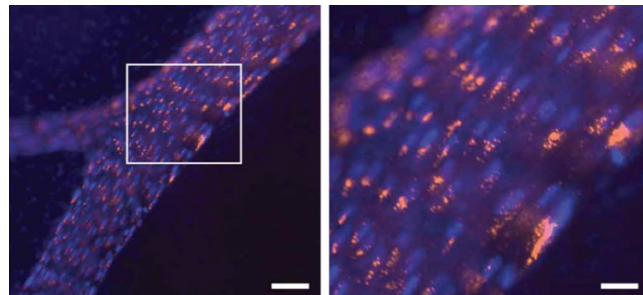


Figure 1.46. Visualisation d'endothélium vasculaire d'embryon de poulet. Les virus marqués avec le fluorophore Alexa 555 sont visualisés en rose tandis que les noyaux des cellules endothéliales ont été marqués à l'aide du fluorophore Hoechst 33258 et sont visualisés en bleu. Barres d'échelle : 16 et 5,5 μm . (Adapté de 123)

¹¹⁵ W. Chen et al. RGD peptide functionalized and reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles as a versatile and multimodal tumor targeting molecular imaging probe. *FASEB J.* 2010, 24 (6), 1689.

¹¹⁶ Z. Liu et al. Integrin $\alpha_v\text{-}\beta_3$ -targeted cancer therapy. *Drug Dev. Res.* 2008, 69 (6), 329.

¹¹⁷ C. Wu et al. A new probe using hybrid virus-dye nanoparticles for near-infrared fluorescence tomography. *Opt. Comm.* 2005, 255, 366.

¹¹⁸ C. M. Soto et al. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 5184.

¹¹⁹ A. M. Wen et al. Interface of physics and biology: engineering virus-based nanoparticles for biophotonics. *Bioconjug. Chem.* 2015, 26, 51.

¹²⁰ C. F. Cho et al. Molecular targeted viral nanoparticles as tools for imaging cancer. *Meth. Mol. Biol.* 2014, 1108, 211.

¹²¹ F. M. Brunel et al. Hydrazone ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor grafting. *Nano Lett.* 2010, 10, 1093.

¹²² A. M. Wen et al. Shaping bio-inspired nanotechnologies to target thrombosis for dual optical-magnetic resonance imaging. *J. Mater. Chem. B.* 2015, 3, 6037.

vascularisation du tissu considéré.¹²³ Cet outil peut avoir des utilisations intéressantes pour l'étude de processus de morphogénèse.

- Les vésicules cellulaires : les cellules sont à l'origine de nombreux corps de tailles variées : les corps apoptotiques, les microvésicules et les exosomes.

Lorsqu'elles rentrent en apoptose, le phénomène de mort cellulaire programmée, les cellules produisent des blebs, ou bulles, en surface, aboutissant à la libération de corps apoptotiques (Figure 1.47). Ceux-ci mesurent généralement plus d'un micromètre.

Dans certaines conditions, les cellules relarguent aussi des microvésicules cellulaires faisant entre 100 nm et 1 µm. Ces microvésicules peuvent être fabriquées par des plaquettes, des leucocytes, des cellules endothéliales ou des globules rouges et se trouvent dans la circulation sanguine.¹²⁴ Si les cellules en relarguent assez peu lorsqu'elles sont dans un état physiologique normal, un stress ou une condition pathologique (particulièrement les cellules cancéreuses) peuvent fortement augmenter cette production.¹²⁵ Ces microvésicules ont une activité procoagulante et une association entre une augmentation de leur présence dans la circulation sanguine et différentes pathologies a été démontrée. On peut citer les accidents vasculaires cérébraux,¹²⁶ la sclérose en plaques,¹²⁷ les traumatismes crâniens,¹²⁸ ou le neuropaludisme.¹²⁹

Une dernière famille de vésicules relarguées par les cellules est celle des exosomes. Elles semblent en relarguer de manière constitutive et mesurent moins de 100 nm,¹³⁰ mais un stress peut stimuler cette sécrétion. Ils peuvent être relargués par toute sorte de cellules et semblent avoir des rôles variés. Par exemple, des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques activent les lymphocytes T soit par contact direct entre cellules, soit par contact avec des exosomes issus de cellules dendritiques (parfois appelé dexosomes).¹³¹ Cette découverte a ouvert un champ de recherche prometteur en immunothérapie, notamment en cancérologie : l'équipe de Laurence Zitvogel

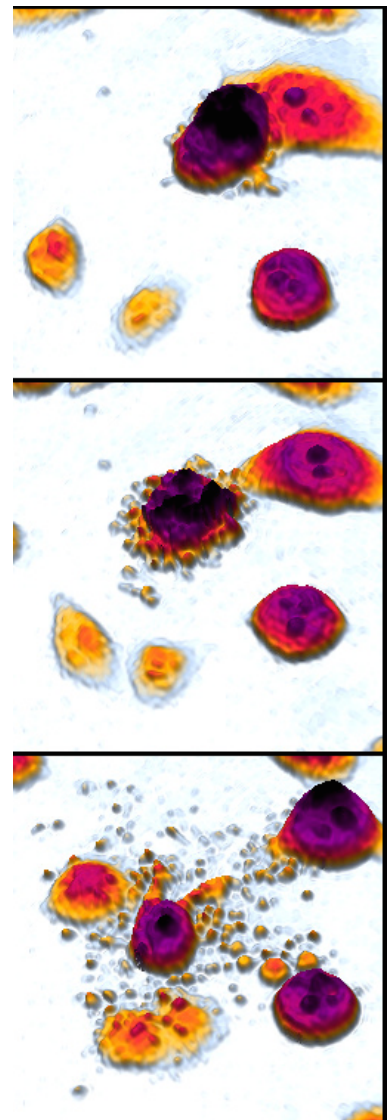


Figure 1.47. Microscopie à contraste de phase de l'apoptose de cellules cancéreuses de la prostate (DU145) traitées à l'étoposide. Crédits Birgit Janicke

¹²³ J. D. Lewis et al. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat. Med.* 2006, 12 (3), 354.

¹²⁴ L. Doeuve et al. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *J. Neurochem.* 2009, 110, 457.

¹²⁵ E. Cocucci et al. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell. Biol.* 2009, 19 (2), 43.

¹²⁶ M. Pawelczyk et al. The influence of hyperlipidemia on platelet activity markers in patients after ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2009, 27 (2), 131.

¹²⁷ W. Jy et al. Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 2004, 9, 3137.

¹²⁸ N. Morel et al. Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J. Trauma.* 2008, 64 (3), 698.

¹²⁹ V. Combes et al. Circulating endothelial microparticles in malawian children with severe falciparum malaria complicated with coma. *JAMA.* 2004, 291 (21), 2542.

¹³⁰ B. György et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, 68, 2667.

¹³¹ S. Amigorena. Anti-tumour immunotherapy using dendritic-cell-derived exosomes. *Res. Immunol.* 1998, 149, 661.

a tout d'abord traité avec succès des souris atteintes de tumeurs à l'aide de vaccins composés de dexosomes¹³² avant de lancer des essais cliniques sur l'homme.¹³³ Une autre application intéressante des exosomes est la possibilité de déterminer leur présence et leur composition dans les fluides biologiques à des fins de diagnostic. L'isolation d'exosomes dérivés de cancer de la prostate dans le sang de malades a ainsi permis de montrer leur potentiel d'utilisation en tant que biomarqueurs.¹³⁴

Ces vésicules représentent, ainsi que les virus et les lipoprotéines, des cargos de choix pour les applications d'imagerie ou de thérapie *in vivo* car ils sont d'origine biologique. Récemment, l'équipe de Florence Gazeau, Claire Wilhelm et Amanda Silva du laboratoire MSC a démontré qu'il était possible d'obtenir des microvésicules cellulaires chargées avec des fluorophores, des agents thérapeutiques ou des nanoparticules en stressant des cellules préalablement exposées à la substance d'intérêt.¹³⁵ Les travaux présentant un aspect *in vivo* se résument à une injection intra-tumorale de microvésicules marqués avec un photosensibilisateur fluorescent, le m-THPC, et des nanoparticules d'oxyde de fer.¹³⁶ Les microvésicules, appelées théransomes, permettent de retenir les substances encapsulées dans la tumeur afin de pratiquer de la photothérapie dynamique.

Bien que les applications précliniques soient encore peu nombreuses, je suis convaincu que les exosomes et les microvésicules cellulaires représentent un outil à fort potentiel pour l'imagerie, le diagnostic et la thérapie à la frontière entre la médecine et les nanosciences.

Des nanoparticules vecteurs de substances fluorescentes permettent d'augmenter la sensibilité et la stabilité de ces fluorophores, il est aussi possible de mieux contrôler leur biodistribution. Malgré cela, les fluorophores vont progressivement se dégrader et le photoblanchiment ne peut être évité. Des matériaux luminescents qui ne présentent pas ces limites, peuvent être synthétisés sous la forme de nanoparticules. Beaucoup ont déjà été utilisés comme sondes photoluminescentes *in vivo*, comme présenté dans les paragraphes suivants. De plus, certaines d'entre elles peuvent être utilisées pour marquer des protéines d'intérêt afin de les suivre plus facilement en microscopie que des vésicules organiques.

- β. Nanoparticules fluorescentes

- Les nanoparticules de carbone ne se résument pas aux nanotubes de carbone. On peut aussi citer les fullerènes, les boîtes quantiques en carbone (ou carbon-dots), les nanodiamants et le graphène.¹³⁷

¹³² L. Zitvogel et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 1998, 4 (5), 594.

¹³³ B. Escudier et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cells (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* 2005, 3 (10).

¹³⁴ K. Mizutani et al. Isolation of prostate cancer-related exosomes. *Anticancer Res.* 2014, 34, 3419.

¹³⁵ A. K. A. Silva et al. Combining magnetic nanoparticles with cell derived microvesicles for drug loading and targeting. *Nanomedicine.* 2015, 11, 645.

¹³⁶ A. K. A. Silva et al. Magnetic and photoresponsive théransomes: translating cell-released vesicles into smart nanovectors for cancer therapy. *ACS Nano.* 2013, 7 (6), 4954.

¹³⁷ G.Hong et al. Carbon nanomaterials for biomedical imaging and nanomedicinal therapy. *Chem. Rev.* 2015, 115, 10816.

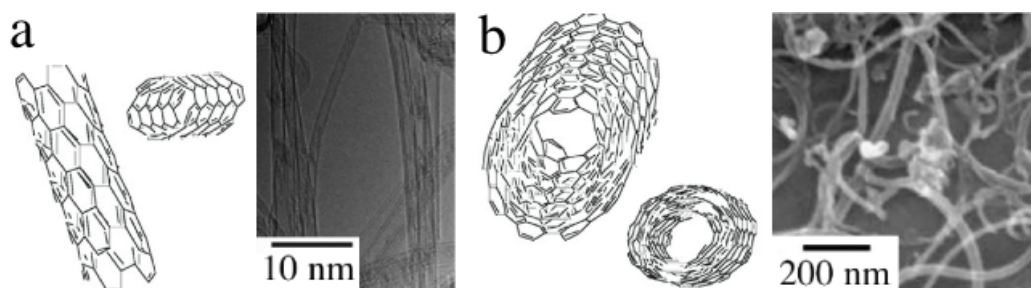


Figure 1.48. Représentation schématique et image de TEM de nanotubes de carbone simple-feuillet (a) et multi-feuillet (b). (Adapté de 138, 151 et I. D. Rosca et al. Carbon, 2005, 43, 3124)

Les nanotubes peuvent être simple-feuillet ou multi-feuillets (Figure 1.48.a et b). Bien que leur fonctionnalisation ait été décrite avec des fluorophores^{138, 139} très peu d'applications *in vivo* sont proposées. Quelques études d'imagerie *in vivo*, dont une citée plus haut, ont été réalisées chez la souris en utilisant des nanotubes de carbone fonctionnalisés avec un fluorophore. Par exemple une étude d'imagerie *in vivo* avec des nanotubes de carbone a été réalisée en les

conjuguant avec le fluorophore IRDye800, mais le but était de montrer le gain de résolution spatiale permis par la fluorescence des nanotubes de carbone qui émettent dans la seconde fenêtre de transparence des tissus (Figure 1.31).⁵³ Plus récemment, une autre équipe a réalisé un travail similaire pour comparer l'efficacité de l'imagerie optique à différentes longueurs d'onde *in vivo*. La zone visible a été testée à l'aide d'un conjugué comportant de la fluorescéine ($\lambda_{ex}=498\text{nm}$ / $\lambda_{em}=516\text{nm}$), la première fenêtre de transparence des tissus (proche infrarouge) à l'aide du même conjugué mais avec l'AlexaFluor 750 ($\lambda_{ex}=750\text{nm}$ / $\lambda_{em}=780\text{nm}$) et la seconde fenêtre de transparence des tissus (1-1,4 μm) grâce à la fluorescence des nanotubes de carbone simple feuillet. Si les images de fluorescence obtenue avec la fluorescéine sont inexploitable, celles obtenues grâce à l'AlexaFluor 750 sont intéressantes, bien qu'elles ne permettent pas d'obtenir autant de détails que les nanotubes de carbone eux-même dans un modèle de métastases de tumeurs ovariennes murines (Figure 1.49).¹⁴⁰ Cependant, il semble aujourd'hui que les nanotubes de carbone sont moins l'objet de recherches d'applications biomédicales

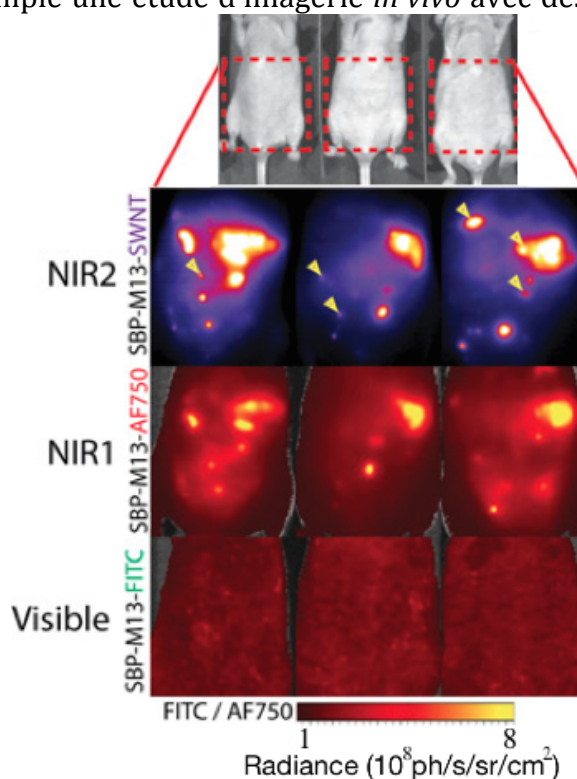


Figure 1.49. Imagerie non-invasive de tumeurs ovariennes murines en utilisant des conjugués de nanotubes de carbone (NIR2), de l'AlexaFluor 750 (NIR1) ou de la fluorescéine (Visible). Les flèches dans la fenêtre NIR2 montrent les nodules détectables uniquement à ces longueurs d'onde. (Adapté de 140)

¹³⁸ S. H. Yoshimura et al. Fluorescence labelling of carbon nanotubes and visualization of a nanotube-protein hybrid under fluorescence microscope. Biomacromolecules. 2011, 12, 1200.

¹³⁹ M. L. Guaragno et al. One-step synthesis of fluorescently labelled, single-walled carbon nanotubes. Chem. Commun. 2015, DOI: 10.1039/c5cc05573c.

¹⁴⁰ D. Ghosh et al. Deep, noninvasive imaging and surgical guidance of submillimeter tumors using targeted M13-stabilized single-walled carbon nanotubes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014, 111 (38), 13948.

qu'auparavant. Peut-être est-ce dû aux travaux sur la toxicité de ces nanoparticules,¹⁴¹ dont certaines semblent avoir des effets proches de ceux des fibres d'amiante (particulièrement les nanotubes multi-feuillets).^{142,143}

Les fullerènes, des molécules carbonnées (Figure 1.50), ont peu d'applications *in vivo*, notamment à cause de faibles rendements quantiques ainsi qu'une toxicité potentiellement importante.¹⁴⁴ On peut tout de même citer l'utilisation de fullerènes C₆₀ fluorescents ($\lambda_{exc}=635\text{ nm} / \lambda_{ém}=710\text{ nm}$) recouverts d'acide hyaluronique, leur permettant ainsi d'avoir une affinité pour les récepteurs CD44 surexprimés par les cellules de carcinome colorectal humain implanté chez la souris. Le ciblage sur ce modèle semble plus efficace que sur une tumeur cervicale humaine (KB) n'exprimant pas ce récepteur, bien que d'autres raisons puissent expliquer une différence d'accumulation entre ces deux modèles.¹⁴⁵

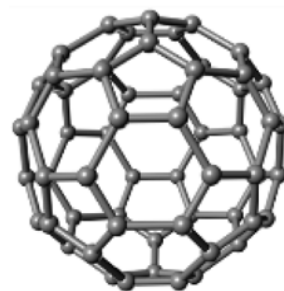


Figure 1.50. Représentation schématique d'un fullerène C₆₀. (Adapté de 137)

Par analogies avec les QD, les carbon-dots sont des nanoparticules de graphite sphéroïdales. D'abord injectés en sous-cutané et dans la patte, afin d'observer leur migration vers les ganglions lymphatiques,¹⁴⁶ les carbon-dots injectés par voie intraveineuse sont partiellement excrétés dans les urines après quelques heures.¹⁴⁷ Cela est dû à une taille inférieure à la limite de filtration glomérulaire qui est d'environ 5 nm (Figure 1.51 a et b).¹⁴⁸

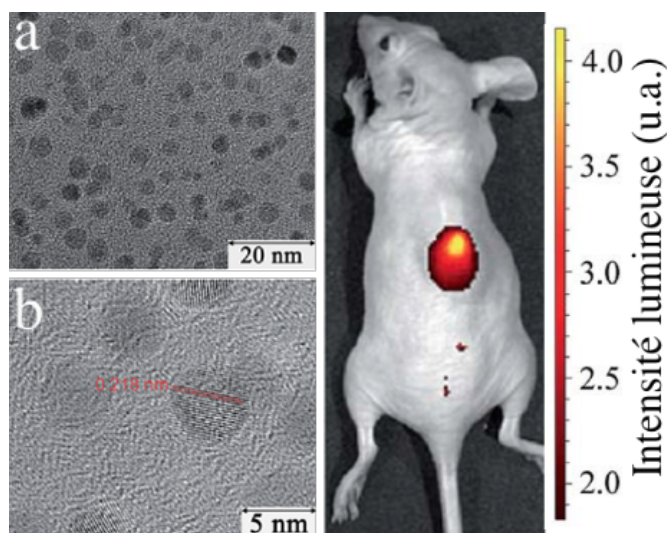


Figure 1.51. a-b) Images TEM de carbon-dots. c) Accumulation passive de carbon-dots dans une tumeur chez la souris. (Adapté de 150)

¹⁴¹ S. Toyokuni. Genotoxicity and carcinogenicity risk of carbon nanotubes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 2098.

¹⁴² C. A. Poland et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3 (7), 423.

¹⁴³ M. Boyles et al. The significance and insignificance of carbon nanotube-induced inflammation. *Fibers.* 2014, 2 (1), 45.

¹⁴⁴ G. Hong et al. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy. *Chem. Rev.* 2015, 115, 10816.

¹⁴⁵ D. S. Kwag et al. Hyaluronated fullerenes with photoluminescent and antitumoral activity. *Chem. Commun.* 2013, 49, 282.

¹⁴⁶ L. Cao et al. Competitive performance of carbon "quantum" dots in optical bioimaging. *Theranostics.* 2012, 2, 295.

¹⁴⁷ S.-T. Yang et al. Carbon dots for optical imaging *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131 (32), 11308.

¹⁴⁸ H. Soo Choi et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25 (10), 1165.

Lorsque ces particules sont illuminées à 470 ou 545 nm, une fluorescence est observée dans le vert (525 nm) ou dans le rouge (620 nm), respectivement. Des carbon-dots ont été améliorés afin que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission se situent dans le proche infrarouge et qu'ils puissent être observés dans les organes profonds tels que les reins,¹⁴⁹ ou dans des adénocarcinomes humains implantés en sous-cutané chez la souris (Figure 1.51.c).¹⁵⁰ Les longueurs d'onde d'excitation de ces nanoparticules semblent couvrir une gamme assez large pouvant aller des ultraviolets au rouge.^{151,152} De plus, la longueur d'onde d'émission des carbon-dots dépend de la longueur d'onde d'excitation (Figure 1.52).¹⁵³ Certaines publications ont rapporté un phénomène d'upconversion avec des carbon-dots.^{154,155} Cependant, ces phénomènes observés se sont avérés être des artefacts dus aux fluorimètres.¹⁵⁶

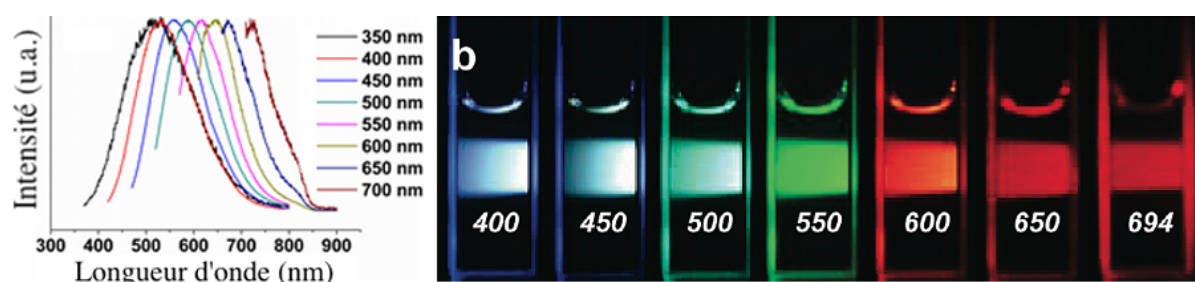


Figure 1.52. Dépendance entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des carbon-dots. Gauche : spectres d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation indiquée à droite des spectres. Droite : couleur de fluorescence de carbon-dots en solution aqueuse en fonction de la longueur d'onde d'excitation indiquée en nm. (Adapté de 149 et 153)

Les nanodiamants représentent une catégorie à part dans les nanoparticules de carbone: ce sont les seuls à être constitués de carbones sp^3 et non de carbones sp^2 (insert, Figure 1.53).¹⁴⁴ Leur mécanisme de fluorescence est unique car celle-ci est principalement due à la présence de lacunes d'azote (N-V) obtenues après irradiation et calcination des nanodiamants. Ces lacunes peuvent être neutre ($N-V^0$) ou chargées négativement ($N-V^-$) et sont responsables d'une émission à 575 ou 637 nm, respectivement, mais le couplage entre ces transitions électroniques et des phonons

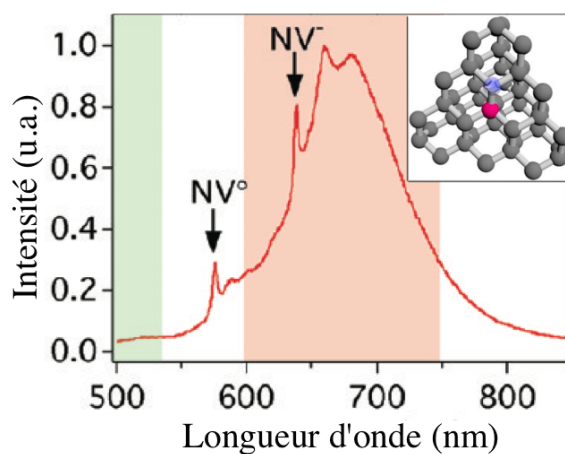


Figure 1. 53. Spectre d'émission de fluorescence des centres colorés NV des nanodiamants illuminés à 488 nm. (Adapté de 137 et 162)

¹⁴⁹ L. Wu et al. Surface passivation of carbon nanoparticles with branched macromolecules influences near-infrared bioimaging. *Theranostics*. 2013, 3, 677.

¹⁵⁰ M. Nurunnabi et al. Photoluminescent graphene nanoparticles for cancer phototherapy and imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014, 6, 12413.

¹⁵¹ H. Tao et al. *In vivo* NIR fluorescence imaging, biodistribution and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small*. 2012, 8 (2), 281.

¹⁵² Z. Wang et al. Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery. *Anal. Methods*. 2015, 7, 8911.

¹⁵³ Y.-P. Sun et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 7756.

¹⁵⁴ L. Cao et al. Carbon dots for multiphoton imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11318.

¹⁵⁵ H. Li et al. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 4430.

¹⁵⁶ X. Wen et al. On the upconversion fluorescence in carbon nanodots and graphene quantum dots. *Chem. Commun.* 2014, 50, 4703.

donne une bande d'émission large autour de 700 nm (Figure 1.53).¹⁵⁷ Les nanodiamants ont de nombreux avantages pour l'imagerie *in vivo* : ils sont hautement photostables, ont un rendement quantique élevé (supérieur à 0,7), facilement fonctionnalisables et probablement peu toxiques.^{158,159} On peut citer d'intéressants travaux utilisant ces nanodiamants *in vitro* pour réaliser du ciblage de cellules tumorales,¹⁶⁰ la détection à haute résolution de nanodiamants dans le cytoplasme de cellules de mammifères ainsi que la compréhension des mécanismes d'internalisation.^{161,162} D'autres applications sont décrites *in vivo* telles que leur suivi chez le ver *Caenorhabditis Elegans* (Figure 1.54)¹⁶³ ou l'étude de leur distribution chez la souris après différents modes d'injection.^{164,165}

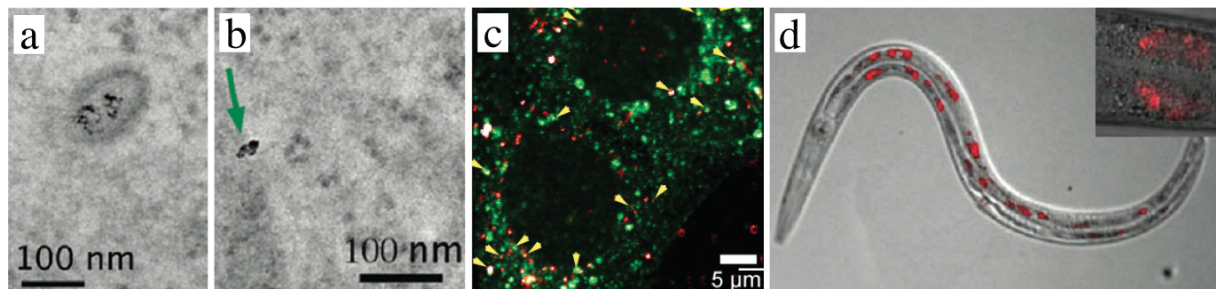


Figure 1.54. Nanodiamants observés *in vitro* ou *in vivo*. a-b) Images TEM de nanodiamants internalisés par des cellules humaines cancéreuses (HeLa), situés dans une vésicule intracellulaire (a) ou dans le cytoplasme (b). c) Superposition d'une image de microscopie confocale permettant de visualiser en vert les endosomes précoces marqués par des conjugués EEA-FITC ("early endosome antigen" lié à la fluorescéine) et d'une image de photoluminescence montrant les nanodiamants en rouge. Les flèches jaunes indiquent les 16 colocalisations nanodiamant-endosome sur les 65 nanodiamants visibles. d) Superposition d'une image de microscopie à contraste interférentiel et d'épifluorescence montrant un ver *C. elegans* nourrit pendant 3 h avec des nanodiamants recouverts de dextran, montrant leur internalisation par les cellules endothéliales de l'intestin. (Adapté de 162, 163 et 164)

Le graphène est le dernier né de cette famille de nanoparticules. C'est une nanofeuille constituée d'une monocouche d'atomes de carbone sp^2 (Figure 1.55). Des travaux rapportent la photoluminescence dans le proche infrarouge des nanoparticules de graphène^{166,167} mais les applications *in vivo* sont encore rares. Une publication utilisant les nanoparticules de graphène pour faire de l'imagerie *in vivo* peut être citée mais la longueur d'onde d'excitation située hors d'une fenêtre de transparence des tissus (inférieure à 550 nm) ne permet pas d'obtenir des images de bonne qualité.¹⁶⁷ En

¹⁵⁷ C. C. Fu et al. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104 (3), 727.

¹⁵⁸ S.-J. Yu et al. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 17604.

¹⁵⁹ A. Krueger et al. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological application. J. Mater. Chem. 2006, 16, 2322.

¹⁶⁰ Y. Dong et al. Folate-conjugated nanodiamond for tumor-targeted drug delivery. RSC Adv. 2015, 5, 82711.

¹⁶¹ O. Faklaris et al. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. Small. 2008, 4 (12), 2236.

¹⁶² O. Faklaris et al. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells. ACS Nano. 2009, 3 (12), 3955.

¹⁶³ N. Mohan et al. *In vivo* imaging and toxicity assessments of fluorescence nanodiamonds in *Caenorhabditis Elegans*. Nano Lett. 2010, 10, 3692.

¹⁶⁴ R. Igarashi et al. Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds *in vivo*. Nano Lett. 2012, 12, 5726.

¹⁶⁵ V. Vajjayanthimala et al. The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an *in vivo* contrast agent. Biomaterials. 2012, 33, 7794.

¹⁶⁶ X. Sun et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. Nano Res. 2008, 1 (3), 203.

¹⁶⁷ M. Nurunnabi et al. Near-infrared photoluminescent graphene nanoparticles greatly expand their use in noninvasive biomedical imaging. Chem. Commun. 2013, 49, 5079.

revanche, les nanoparticules de graphène ont souvent été décrites conjuguées à des fluorophore afin de faire du suivi par fluorescence *in vivo*.^{168,169,170}

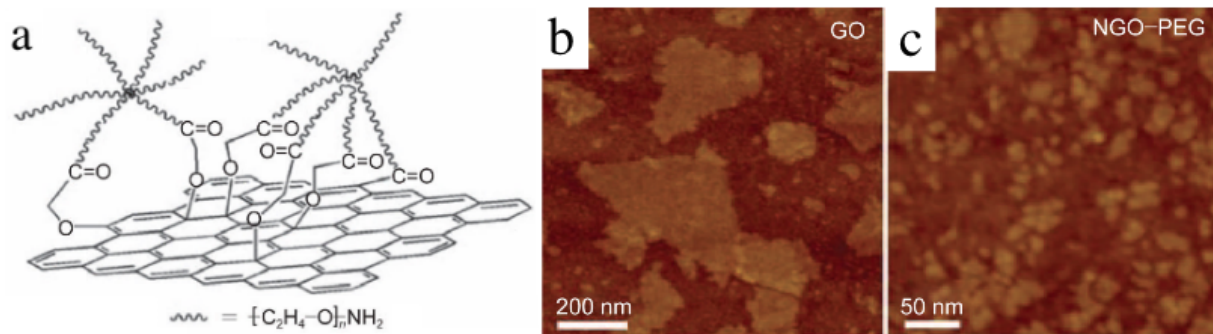


Figure 1.55. a) Représentation schématique d'une nanoparticule d'oxyde de graphène fonctionnalisée avec du PEG. b-c) Images TEM de nanoparticules d'oxyde de graphène non fonctionnalisées (b) ou fonctionnalisées avec du PEG (c). (Adapté de 166)

- Les boîtes quantiques, ou quantum-dots (QD) ont été présentés dans la première partie de l'introduction. Ils constituent la famille de nanoparticules fluorescentes la plus explorée pour l'imagerie *in vivo*. Si les premiers QD décrits n'avaient pas les propriétés de luminescence intéressantes pour faire de l'imagerie *in vivo*, elles ont vite été améliorées afin que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission soient dans la première fenêtre de transparence des tissus¹⁷¹ et des travaux plus récents ont permis la synthèse de QD émettant dans la seconde fenêtre.^{172,173} Le nombre de publications concernant les applications de QD pour faire de l'imagerie *in vivo* étant conséquent, je vais me contenter de citer deux exemples, un dans la fenêtre visible, l'autre dans la seconde fenêtre de transparence des tissus. L'équipe de Bawendi et Frangioni a synthétisé une série de QD avec un coeur de CdSe et une enveloppe de ZnS dont les diamètres hydrodynamiques, après fonctionnalisation, vont de 4,6 à 7,2 nm et dont les longueurs d'onde d'émission sont situées entre 500 et 600 nm.¹⁴⁸ Celles-ci ne sont pas situées dans la fenêtre optique idéale et l'observation en fluorescence a dû être réalisée en incisant la peau pour exposer les reins, les uretères et la vessie (Figure 1.56.a et b). Cependant, les résultats obtenus sont importants et permettent d'observer le lien entre diamètre hydrodynamique et biodistribution. L'intérêt particulier de cette étude est l'observation de la clairance rénale ainsi que la demi-vie plasmatique des QD : la condition à respecter pour qu'ils soient filtrés par les glomérules rénaux et éliminés dans les urines est que leur diamètre hydrodynamique soit inférieur à 5,5 nm (Figure 1.56.c).¹⁴⁸

¹⁶⁸ K. Yang et al. Multimodal imaging guided photothermal therapy using functionalized graphene nanosheets anchored with magnetic nanoparticles. *Adv. Mater.* 2012, 24, 1868.

¹⁶⁹ K. Yang et al. Graphene in mice: ultrahigh *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.* 2010, 10, 3318.

¹⁷⁰ X. Yan et al. Enhanced fluorescence imaging guided photodynamic therapy of sinoporphyrin sodium loaded graphene oxide. *Biomaterials.* 2015, 42, 94.

¹⁷¹ J. P. Zimmer et al. Size series of small indium arsenide-zinc selenide core-shell nanocrystals and their application to *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2526.

¹⁷² C. Li et al. *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag2S quantum dots in the NIR-II window. *Biomaterials.* 2014, 35, 393.

¹⁷³ T. Jin & Y. Imamura. Applications of highly bright PbS quantum dots to non-invasive near-infrared fluorescence imaging in the second optical window. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* 2016, 5 (1), R3138.

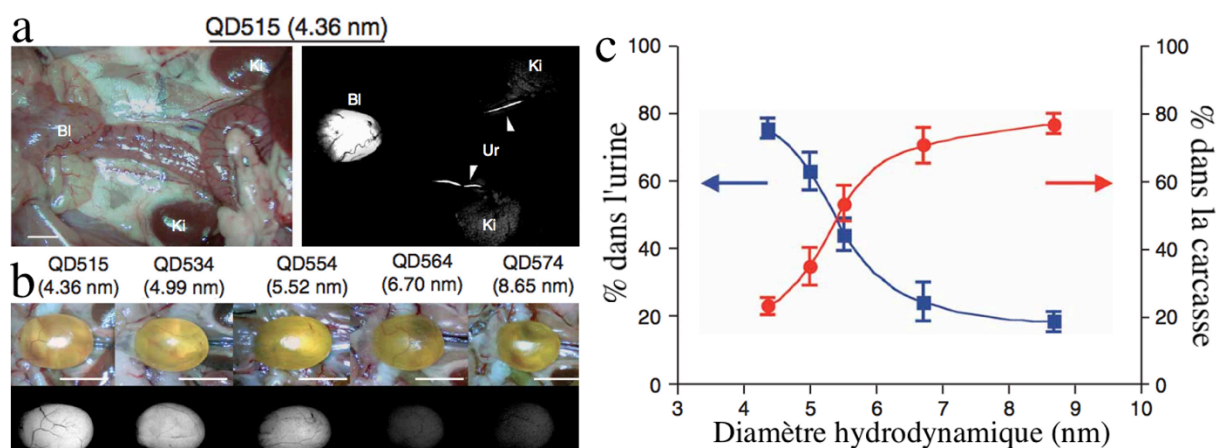


Figure 1.56. Démonstration de la clairance rénale de QD en fonction de leur taille. a) Images en lumière blanche et en fluorescence des reins, des uretères et de la vessie mis à jour par incision du péritoine chez une souris, 2h après injection de QD515 ayant un diamètre hydrodynamique de 4,36 nm. b) Images en lumière blanche et en fluorescence de vessies de souris, 4h après injection de QD de différentes tailles (4,36-4,99-5,52-6,7-8,65 nm, de gauche à droite, respectivement) (barres d'échelle : 1 cm). c) Pourcentages de QD récupérés dans l'urine de souris ou dans la carcasse, 4h après injection de QD, en fonction de leur taille. (Adapté de 148)

Il existe deux compositions de QD qui permettent de faire de l'imagerie *in vivo* dans la seconde fenêtre de transparence des tissus : le sulfure d'argent (Ag_2S) ou de plomb (PbS). Les QD de sulfure d'argent peuvent être excités à 808 nm, émettent vers 1,2 μm et permettent d'observer les organes profonds, la vascularisation et l'angiogénèse tumorale d'une souris avec une résolution spatiale impressionnante (Figure 1.57.a).¹⁷² Ceux constitués de PbS voient leur rendement quantique augmenter ainsi que leur pic de fluorescence se décaler de 1 à 1,3 μm avec l'augmentation de l'épaisseur de la coquille de sulfure de cadmium (CdS).¹⁷³ L'optimisation de la fenêtre d'acquisition permet d'augmenter encore la résolution en limitant au maximum l'autofluorescence des tissus : dans la seconde fenêtre de transparence des tissus (1 à 1,4 μm), la zone située entre 1,3 et 1,4 μm , appelée NIR-IIa, présente un minimum de diffusion, permettant même d'observer des vaisseaux sanguins à travers la boîte crânienne ou des canaux lymphatiques à travers la peau ("1300 nm", Figure 1.57.b) !^{174,175}

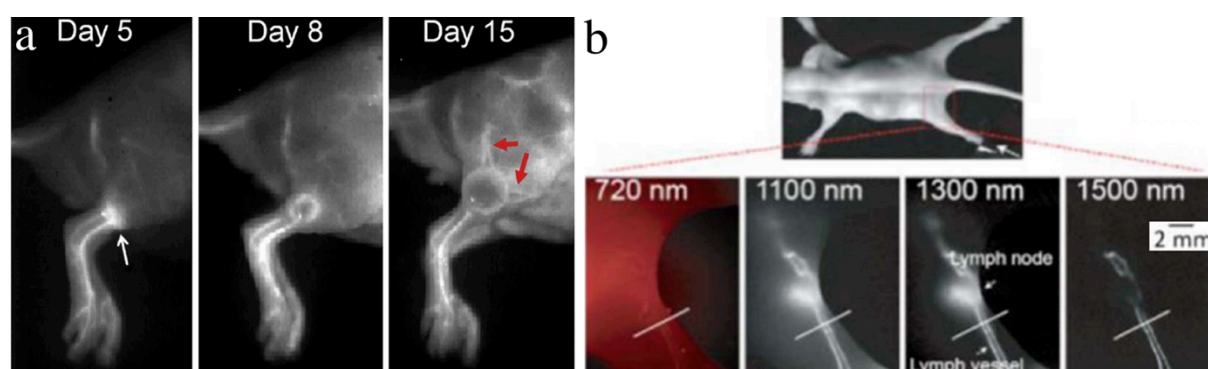


Figure 1.57. Utilisation de QD dans la seconde fenêtre optique *in vivo*. a) Observation de la vascularisation et de l'angiogénèse tumorale (flèches rouges, Day 15) d'une tumeur de 2-3 mm avec des QD de Ag_2S et une résolution spatiale de l'ordre de 40 μm . L'emplacement initial de la tumeur est indiqué par une flèche blanche (Day 5). b) Images de canaux lymphatiques fémoraux d'une souris à différentes longueurs d'onde avec des QD de PbS-CdS démontrant la baisse d'autofluorescence à 1,3 μm . Bien que la résolution semble être meilleure à 1,5 μm , on ne voit pas le ganglion lymphatique à cause d'une augmentation de l'absorption de l'eau à cette longueur d'onde. (Adapté de 172 et 173)

¹⁷⁴ Y.Taik Lim et al. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol. Imaging*. 2003,2,50.

¹⁷⁵ G. Hong et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new NIR window. *Nat. Photonics*. 2014, 8, 723.

Ces applications, quoique prometteuses, ont aujourd'hui du mal à être utilisées en clinique pour la principale raison que les QD sont des semi-conducteurs composés de métaux toxiques (cadmium, plomb, etc). Cependant ils représentent, ainsi que la plupart des nanoparticules présentées dans ce chapitre, de formidables outils de laboratoire pour la recherche biologique et médicale et peuvent être utilisés *in vitro* pour comprendre de nombreux mécanismes complexes de biologie moléculaire. Un exemple illustrant cette utilisation est le suivi en microscopie de fluorescence d'une protéine motrice, la kinésine, dans une cellule humaine HeLa en la liant à un QD (Figure 1.58).¹⁷⁶ Etre capable de suivre ces protéines motrices est d'un grand intérêt pour comprendre des processus cellulaires tels que la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire ou le déplacement de nombreuses substances au sein des cellules. Leur activité est primordiale, notamment le long des microtubules au sein des neurones car leur dysfonctionnement est associé à certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la chorée de Huntington comme l'a montré l'équipe de Frédéric Saudou.^{177,178}

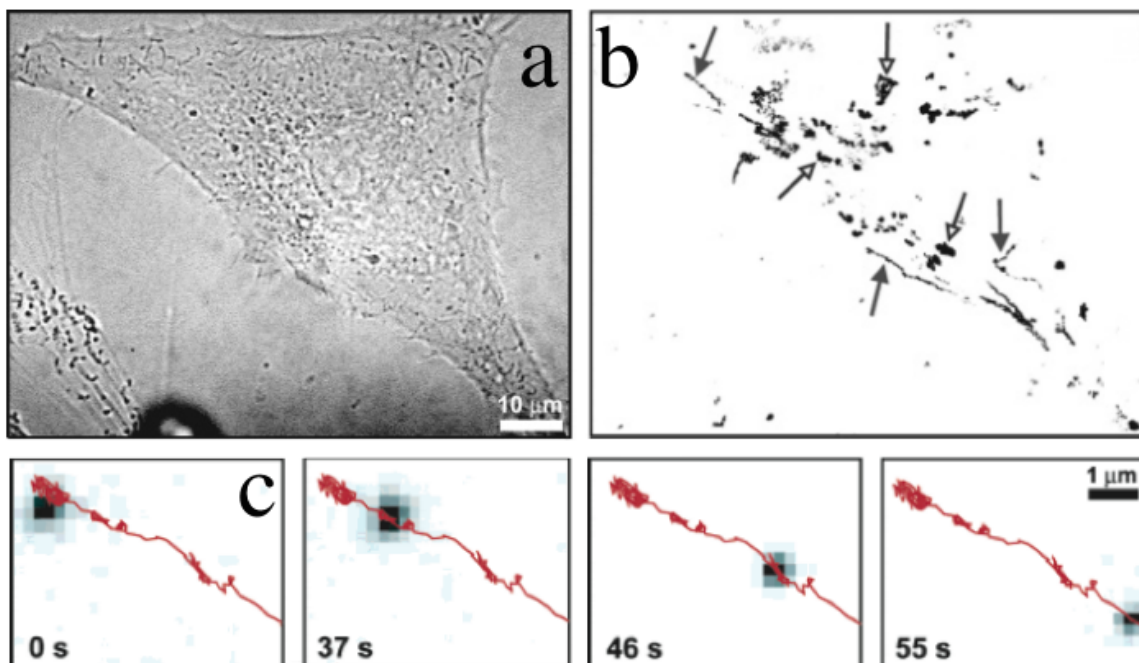


Figure 1.58. Suivi *in vitro* de QD en microscopie. a) Image en lumière blanche d'une cellule HeLa. b) Superposition de 600 images consécutives (230 ms par image). Les trajectoires linéaires de QD reliés à des kinésines (QD-K) se déplaçant le long de microtubules sont indiquées par des flèches grises pleines. Les trajectoires de QD dues à la diffusion sont indiquées avec des flèches à tête vide. c) Suivi d'un QD-K au cours du temps. (Adapté de 176)

- L'optique non linéaire se divise en trois catégories (cf. partie I.2.a de l'introduction "Fluorescence anti-Stokes et optique non linéaire") : la fluorescence biphotonique, la génération de seconde harmonique et la conversion ascendante, ou upconversion. La fluorescence biphotonique et la génération de seconde harmonique ont principalement des applications en microscopie. La fluorescence biphotonique n'a pas de nanoparticule attirée mais elle peut être réalisée en ajoutant un fluorophore. Par exemple, l'équipe de

¹⁷⁶ S. Courty et al. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett.* 2006, 6 (7), 1491.

¹⁷⁷ L. R. Gauthier et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell.* 2004, 118, 127.

¹⁷⁸ N. Hirokawa et al. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development and disease. *Neuron.* 2010, 68, 610.

Jean-Olivier Durand a développé des nanoparticules de silice^{179,180} ou de polymères de silsesquioxanes^{181, 182} contenant un dérivé synthétique du NADPH ou du diaminodiphenylbutadiène, une substance jouant à la fois le rôle de photosensibilisateur et de fluorophore à deux photons. Concernant la génération de seconde harmonique, des travaux montrent la possibilité d'en augmenter l'efficacité en marquant une protéine avec un acide aminé synthétique fortement polarisable¹⁸³ ou en utilisant des nanoparticules de titanate de baryum. Celles-ci ont été utilisées pour marquer des cellules¹⁸⁴ ou ont été suivies 72 heures post-fécondation dans un embryon de poisson zèbre ainsi que dans la queue d'une souris.¹⁸⁵ *In vivo*, ces nanoparticules peuvent être suivies en utilisant une illumination 10 fois moins puissante que celle nécessaire pour observer les protéines telles que le collagène, permettant ainsi de suivre ces sondes sans avoir de signal parasite.

Les nanoparticules à upconversion ont l'avantage, par rapport aux deux phénomènes évoqués ci-dessus, de nécessiter une illumination environ 10^5 fois moins intense pour être observées.¹⁸⁶ Elles présentent un intérêt identique aux matériaux excitables et luminescents dans une des fenêtres optiques présentés dans cette partie sauf que le phénomène d'upconversion permet d'émettre à une longueur d'onde inférieure à celle de l'excitation (le déplacement de Stokes est négatif). En choisissant bien la fenêtre d'observation, on peut ainsi diminuer, voire faire disparaître le signal parasite d'autofluorescence des tissus.

Les matériaux permettant de synthétiser des nanoparticules à upconversion ont un cahier des charges précis et complexe, et si certains sont connus depuis les années 1960,¹⁸⁷ leur synthèse sous la forme de nanocristaux permettant leur utilisation *in vivo* remonte à la fin des années 90.¹⁸⁸ La matrice cristalline la plus utilisée pour synthétiser des matériaux à upconversion est NaYF_4 , tandis que les ions Er^{3+} , Tm^{3+} et Ho^{3+} sont

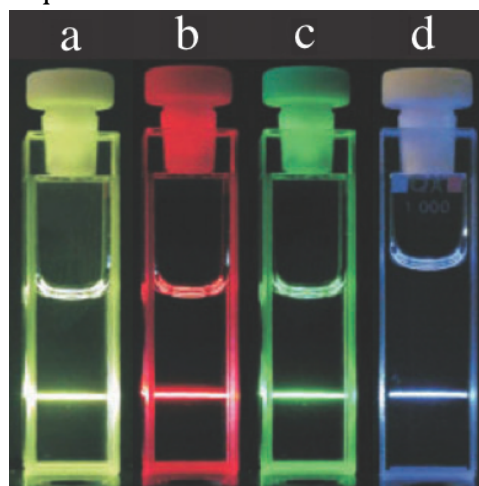


Figure 1.59. Luminescence d'UCNP. Luminescence totale (a), à travers un filtre rouge (b) ou vert (c) d'une solution de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (20/2 mol %), 1 % en masse dans le DMSO. d) Luminescence totale d'une solution de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ dans les mêmes conditions. (Adapté de 188)

¹⁷⁹ C. Mauriello-Jimenez et al. Porphyrin-functionalized mesoporous organosilica nanoparticles for two-photon imaging of cancer cells and drug delivery. *J. Mater. Chem. B.* 2015, 3, 3681.

¹⁸⁰ J. G. Croissant et al. Disulfide-gated mesoporous silica nanoparticles designed for two-photon-triggered drug release and imaging. *J. Mater. Chem. B.* 2015, 3, 6456.

¹⁸¹ J. G. Croissant et al. Enhanced two-photon fluorescence imaging and therapy of cancer cells via gold@bridged silsesquioxane nanoparticles. *Small.* 2015, 11 (3), 295.

¹⁸² J. G. Croissant et al. Synthesis of disulfide-based biodegradable bridged silsesquioxane nanoparticles for two-photon imaging and therapy of cancer cells. *Chem. Commun.* 2015, 51, 12324.

¹⁸³ J. S. Salafsky, B. Cohen. A second-harmonic-active unnatural amino acid as a structural probe of biomolecules on surfaces. *J. Phys. Chem. B.* 2008, 112, 15103.

¹⁸⁴ C. Dempsey et al. Coating baryum titanate nanoparticles with polyethylenimine improves cellular uptake and allows for coupled imaging and gene delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2013, 112, 108.

¹⁸⁵ P. Pantazis et al. Second harmonic generating nanoprobe for *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010, 107 (33), 14535.

¹⁸⁶ S. Wu et al. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106 (27), 10917.

¹⁸⁷ F. Auzel. Upconversion and anti-stokes processes with f and d ions in solids. *Chem. Rev.* 2004, 104, 139.

¹⁸⁸ F. Wang, X. Liu. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 976.

les plus utilisés comme activateurs, car ils ont des états excités métastables aux temps de demi-vie pouvant atteindre 0,1 s, en raison de faibles probabilités de transition f-f. Une des compositions les plus utilisées est $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. Er^{3+} est l'activateur, tandis que Yb^{3+} est le sensibilisateur, c'est à dire l'élément responsable de l'absorption puis du transfert d'énergie vers Er^{3+} . Lorsqu'il est illuminé à 976 nm, ce matériau émet dans le bleu, le vert et le rouge (Figures 1.59 et 1.60.a). Les mécanismes de ces émissions sont détaillés dans une publication récente de M. Berry et P. Stanley May.¹⁸⁹

Les applications *in vivo* de ces nanoparticules ressemblent à celles déjà évoquées précédemment pour les nanoparticules fluorescentes comme le suivi du drainage lymphatique de nanoparticules à upconversion vers les ganglions axillaires après injection dans la patte.¹⁹⁰ Concernant le ciblage de tumeurs, leur fonctionnalisation avec des ligands tels que du RGD permet de cibler sélectivement des tumeurs dont l'endothélium vasculaire surexprime l'intégrine $\alpha_v\text{-}\beta_3$ (Figure 1.60).¹⁹¹ L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le récepteur de l'EGFR dans un modèle d'adénocarcinome,¹⁹² ou de l'acide folique pour cibler son récepteur sur des cellules de carcinome hépatocellulaire sont aussi rapportées.¹⁹³

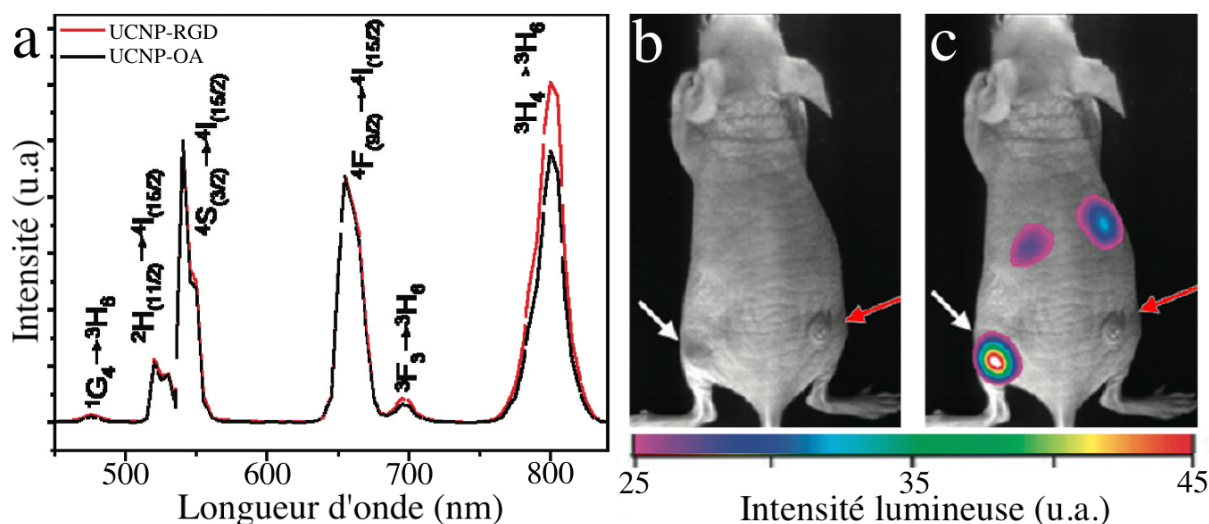


Figure 1.60. Propriétés de luminescence et utilisation *in vivo* d'UCNP. a) Spectre de luminescence de nanoparticules de NaYF_4 dopées avec de Yb^{3+} (20%), de Er^{3+} (1,8%) et du Tm^{3+} (0,2%), recouvertes d'acide oléique (UCNP-OA) ou de RGD (UCNP-RGD) et illuminées à 980 nm. Les raies d'émission à 522, 543 et 654 nm d'une part, et celles à 490, 695 et 800 nm d'autre part correspondent aux transitions respectives de Er^{3+} et Tm^{3+} . b-c) Image en lumière blanche (b) et superposition lumière blanche/upconversion en illuminant à 980 nm et en observant à 800 nm (c), montrant le ciblage de tumeurs *in vivo* avec des UCNP-RGD. On observe un ciblage sélectif à l'aide du ligand RGD 4h après injection de ces UCNP à une souris portant deux tumeurs sous-cutanées : un glioblastome surexprimant l'intégrine $\alpha_v\text{-}\beta_3$ (flèche blanche) accumule les UCNP contrairement à une tumeur mammaire avec une faible expression de $\alpha_v\text{-}\beta_3$ (flèche rouge). (Adapté de 191)

Une application assez originale a été proposée par une équipe de Shanghai en fonctionnalisant des nanoparticules à upconversion de NaYF_4 avec une cyanine modifiée

¹⁸⁹ M. T. Berry, P. Stanley May. Disputed mechanism for NIR-to-red upconversion luminescence in $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$. J. Phys. Chem. A. 2015, 119, 9805.

¹⁹⁰ T. Cao et al. High-quality water-soluble and surface-functionalized upconversion nanocrystals as luminescent probes for bioimaging. Biomaterials. 2011, 32, 2959.

¹⁹¹ L. Xiong et al. High contrast upconversion luminescence targeted imaging *in vivo* using peptide-labeled nanophosphors. Anal. Chem. 2009, 81, 8687.

¹⁹² C. Liu et al. Magnetic/upconversion fluorescent $\text{NaGdF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ nanoparticle based dual-modal molecular probes for imaging tiny tumors *in vivo*. ACS Nano. 2013, 7 (8), 7227.

¹⁹³ X. Liu et al. *In vivo* 808 nm image-guided photodynamic therapy based on an upconversion theranostic nanoplatfrom. Nanoscale. 2015, 7, 14914.

pour détecter *in vitro* ou *in vivo* du méthylmercure,¹⁹⁴ un polluant aquatique responsable d'altérations développementales, notamment neurologiques. Le CNRS mène d'ailleurs une étude pour comprendre le cycle de vie de ce polluant dans le lac Titicaca, en Bolivie, où sa concentration est particulièrement importante.¹⁹⁵ La présence de méthylmercure modifie la structure de la cyanine utilisée et par conséquent la luminescence du complexe nanoparticule-cyanine, ce qui permet de déterminer la présence du polluant en solution ainsi qu'*in vivo* dans le foie de souris exposées. Les nanoparticules jouent ici le rôle d'illuminateur de la cyanine en excitant la cyanine autour de 670 nm à partir d'une illumination extérieure à 980 nm, permettant une détection de très faibles doses de méthylmercure(0,18 ppb), notoirement inférieures aux 5,8 ppb préconisés comme taux sanguin maximal acceptable de l'agence de protection de l'environnement américaine (EPA).

Bien que les nanoparticules à upconversion permettent de limiter le bruit de fond dû à l'autofluorescence, ces nanoparticules émettent souvent dans le bleu et le vert en plus du rouge. Or, le bleu et le vert n'étant pas situés dans une fenêtre de transparence des tissus, ils sont fortement diffusés et peuvent exciter des fluorophores endogènes, ce qui peut faire chuter la résolution spatiale ou engendrer un bruit de fond qui ne serait pas présent si l'acquisition se faisait plusieurs secondes ou minutes après l'illumination.

- γ . Nanoparticules à luminescence persistante

La première preuve de concept d'utilisation de matériaux à luminescence persistante sous la forme de nanoparticules comme sondes d'imagerie optique *in vivo* est issue des travaux de thèse de Quentin Le Masne de Chermont en 2007.^{38,39} Depuis, la communauté scientifique s'est emparée de ce phénomène afin de produire des sondes ne nécessitant pas d'illumination continue lors de l'acquisition, éliminant ainsi le bruit de fond dû à l'autofluorescence des tissus.

Il est possible de distinguer trois principales familles de matériaux à luminescence persistante utilisés pour l'imagerie optique *in vivo* : les silicates, les aluminates et les gallates. Deux autres composés seront aussi présentés : le stannate de strontium et l'apatite.

- Les silicates sont les premiers matériaux dont les longueurs d'onde d'émission se situent dans la première fenêtre de transparence des tissus. La composition $\text{MgSiO}_3:\text{Eu}^{2+},\text{Dy}^{3+},\text{Mn}^{2+}$ présente une luminescence à 660 nm après illumination UV.¹⁹⁶ Mais, pour le silicate, la voie de synthèse utilisée (synthèse par voie solide) menait à la synthèse de microparticules.^{39,196} L'optimisation de la composition du matériau d'intérêt (de MgSiO_3 à $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ avec les mêmes dopants), la mise au point d'une synthèse sol-gel de ce matériau¹⁹⁷ suivie de l'extraction des plus petites particules par sédimentation sélective, et l'amélioration de l'efficacité des détecteurs ont permis de réaliser la première utilisation de nanoparticules à luminescence persistante comme sondes d'imagerie optique *in vivo* en 2007.^{38,39}

¹⁹⁴ Y. Liu et al. A cyanine-modified nanosystem for *in vivo* upconversion luminescence bioimaging of methylmercury. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 9869.

¹⁹⁵ <https://www.lejournal.cnrs.fr/videos/les-chasseurs-de-mercure-du-lac-titicaca>

¹⁹⁶ X.-J. Wang et al. Mn^{2+} activated green, yellow and red long persistent phosphors. J. Lumin. 2003, 103, 34.

¹⁹⁷ L. Lin et al. Synthesis and luminescence properties of red phosphors : Mn^{2+} doped MgSiO_3 and Mg_2SiO_4 prepared by sol gel method. J. Rare Earth. 2006, 24, 104.

Ces silicates ont ensuite été améliorés et utilisés par le laboratoire, lors de la thèse de Thomas Maldiney.³² D'une part, les effets de la taille et de la fonctionnalisation des nanoparticules sur leur biodistribution ont été étudiés (Figure 1.61),¹⁹⁸ d'autre part leur composition a été optimisée afin d'en augmenter la luminescence.⁴³

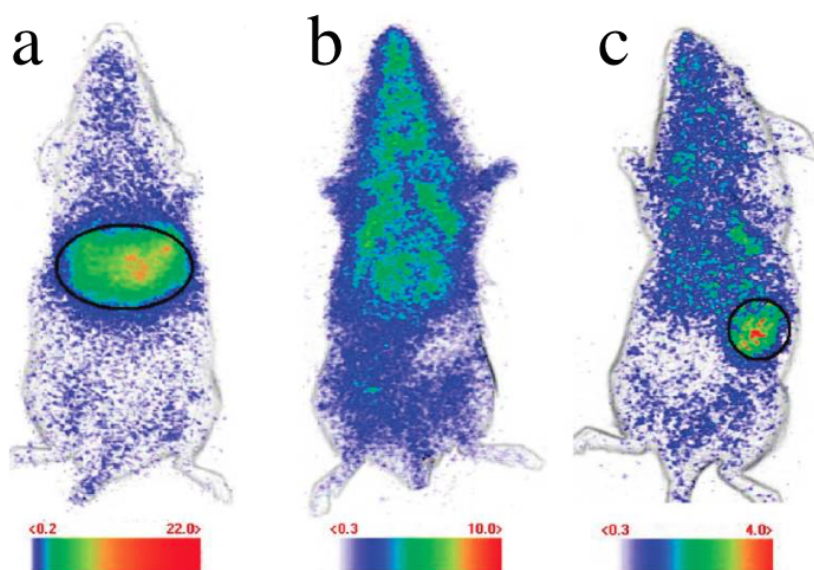


Figure 1.61. Influence de la taille et du recouvrement de nanoparticules de silicates sur leur biodistribution 15 min après injection intraveineuse. a) NPLP de 120 nm non fonctionnalisées, on constate une capture hépatique rapide. b) NPLP de 120 nm fonctionnalisées avec du PEG, ce qui permet d'augmenter leur demi-vie de circulation sanguine. c) NPLP de 180 nm fonctionnalisées avec du PEG. On observe une accumulation plus importante dans la rate (cercle noir) que pour les NPLP de 120 nm. (Adapté de 198)

- Les aluminates sont les premiers matériaux à luminescence persistante à avoir eu des applications dans la vie courante. Le matériau SrAl_2O_4 a une émission à une longueur d'onde inférieure à 600 nm, cependant les nanoparticules synthétisées et injectées *in vivo* ont pu être illuminées après injection avec une DEL puissante dans le visible.¹⁹⁹ Des compositions légèrement différentes ont permis d'obtenir une luminescence dans la première fenêtre de transparence des tissus.²⁰⁰ Mais ces matériaux sont synthétisés par voie solide, ce qui ne permet pas l'obtention de nanoparticules.

- Les gallates sont les derniers nés des NPLP et sont de plus en plus utilisés pour l'imagerie optique. Abdukayum et al ont synthétisé et optimisé la composition de gallogermanates de zinc ($\text{Zn}_{2,94}\text{Ga}_{1,96}\text{Ge}_2\text{O}_{10}:\text{Cr}^{3+},\text{Pr}^{3+}$) avec une luminescence dans la première fenêtre de transparence des tissus.²⁰¹ Ces particules fonctionnalisées avec du PEG ou du RGD permettent de cibler des tumeurs sous-cutanées de glioblastome humain *in vivo*. Il n'est malheureusement pas possible de différencier des souris ayant reçu des NPLP-PEG de celles ayant reçu des NPLP-RGD après 30 min post-injection. On observe cependant une accumulation tumorale des NPLP-RGD *ex vivo*, mais celle des NPLP-PEG n'est pas donnée. Shi et al ont aussi fonctionnalisé des NPLP de gallate avec de l'acide

¹⁹⁸ T. Maldiney et al. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. ACS Nano. 2011, 5 (2), 854.

¹⁹⁹ M. Sun et al. Persistent luminescence nanoparticles for super-long time *in vivo* and *in situ* imaging with repeatable excitation. J. Lumin. 2014, 145, 838.

²⁰⁰ Y. Li et al. A strategy for developing near-infrared long persistent phosphors: taking $\text{MAlO}_3:\text{Mn}^{4+},\text{Ge}^{4+}$ (M = La, Gd) as an example. J. Mater. Chem. C. 2014, 2, 2019.

²⁰¹ A. Abdukayum et al. Functional near infrared-emitting $\text{Cr}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$ co-doped zinc gallogermanate persistent luminescent nanoparticles with superlong afterglow for *in vivo* targeted bioimaging. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14125.

folique pour cibler des carcinomes hépatocellulaires murins surexprimant le récepteur de l'acide folique (Figure 1.62.a).²⁰² L'équipe de Pan a aussi introduit le gallate de lithium comme matrice permettant de synthétiser des nanoparticules pour l'imagerie optique.^{203,204} Mais une limite importante à l'utilisation de ces matériaux *in vivo* est la nécessité de les illuminer en UV pour activer la luminescence persistante.

Or, lors de la thèse de Thomas Maldiney dans le laboratoire (2009-2012), il a été montré que le gallate de zinc (ZGO) dopé avec du Cr³⁺ pouvait être activé avec une DEL orange dans la première fenêtre de transparence des tissus.⁴⁵ Cela permet de suivre ces NPLP aussi longtemps que souhaité en illuminant la souris sous une DEL orange intense. De plus, une simple fonctionnalisation par du PEG permet d'observer l'accumulation de nanoparticules de ZGO dans des tumeurs colorectales murines implantées en sous-cutané chez la souris (Figure 1.62.b et c).⁴⁵ Cette accumulation est certainement due à l'effet EPR des tumeurs, pour "enhanced permeability and retention", associé à la formation d'un réseau vasculaire chaotique et fenestré. La possibilité d'activer la luminescence des ZGO avec une DEL a ainsi permis d'observer ces tumeurs alors que la majorité des nanoparticules avaient été captées par le foie et la rate, plusieurs heures après injection.

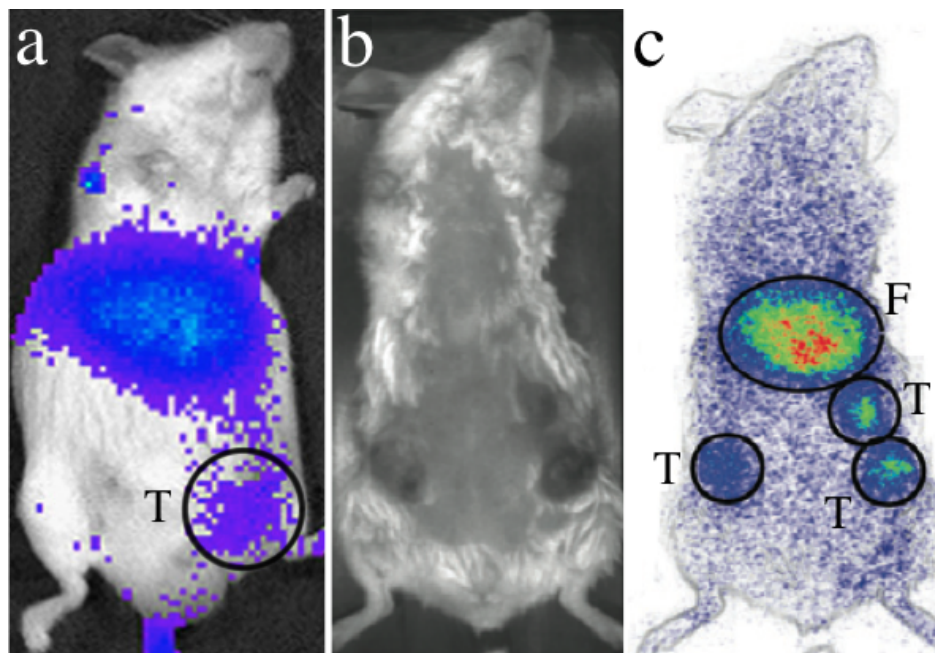


Figure 1.62. Utilisation de NPLP pour l'imagerie de tumeurs chez la souris. a) Image en luminescence d'une souris ayant une tumeur surexprimant le récepteur de l'acide folique et ayant reçu 0,2 mg de NPLP recouvertes d'acide folique. L'image est réalisée 2 h après injection et à la suite d'une illumination DEL orange de 2 min. b,c) Image en lumière blanche (b) et en luminescence persistante (c) d'une souris ayant reçu 2 mg de ZGO-PEG par voie intraveineuse. 4 h après injection, la souris est illuminée pendant 2 min avec une DEL orange avant de réaliser une acquisition de luminescence. On voit alors distinctement le foie (F) et les tumeurs (T). (Adapté de 202 et 45)

Le ZGO:Cr³⁺ développé par le laboratoire a aussi été fonctionnalisé par une couche de silice mésoporeuse, permettant de charger un médicament et de combiner imagerie et

²⁰² J. Shi et al. Multifunctional near-infrared emitting long-persistence luminescent nanoprobes for drug delivery and targeted tumor imaging. *Biomaterials*. 2015, 37, 260.

²⁰³ F. Liu et al. Photostimulated near-infrared persistent luminescence as a new optical read-out from Cr³⁺-doped LiGa₅O₈. *Sci. Rep.* 2013, 3, 1554.

²⁰⁴ X. Fu et al. Long persistent near infrared luminescence nanoprobes LiGa₅O₈: Cr³⁺-PEG-OCH₃ for *in vivo* imaging. *Opt. Mat.* 2014, 36 (11), 1792.

thérapie.²⁰⁵ Si ce matériau est dopé avec du Gd^{3+} en plus du Cr^{3+} , il possède aussi une activité en imagerie par résonance magnétique.²⁰⁶ Ses propriétés seront détaillées dans la Partie III sur la multimodalité.

Récemment, nous avons montré qu'il était possible d'observer *in vivo* une luminescence de type anti-Stokes avec les ZGO.²⁰⁷ Après avoir été illuminés avec des UV, tous les pièges sont peuplés, y compris les plus profonds. La majorité se vide par activation thermique à température ambiante, mais une faible proportion des pièges, les plus profonds, ne se vident qu'à des températures supérieures à 400 K (déterminée par thermoluminescence stimulée, Figure 1.63.a). Or, en illuminant ces matériaux avec une diode laser à 977 nm, on fournit au matériau une énergie environ cinquante fois supérieure à l'énergie thermique disponible ($1,27 \text{ eV}$ contre $2,6 \cdot 10^{-2} \text{ eV}$). Cette illumination permet de faire passer les électrons encore piégés dans la bande de conduction, avant de se retrouver à nouveau piégés ou de se recombiner en émettant un photon. Ce phénomène appelé photostimulation ou phototransfert a apparemment un déplacement de Stokes négatif, bien que l'illumination initiale par UV soit indispensable. Ce n'est donc pas vraiment une luminescence anti-Stokes, mais plutôt une luminescence provoquée par une longueur d'onde inférieure à la longueur d'onde d'émission. Ce phénomène peut aussi être réalisé *in vivo* : nous avons montré qu'il était possible d'observer cette luminescence après illumination à 977 nm de nanoparticules ZGO injectées en sous-cutané chez la souris (Figure 1.63.b et c).

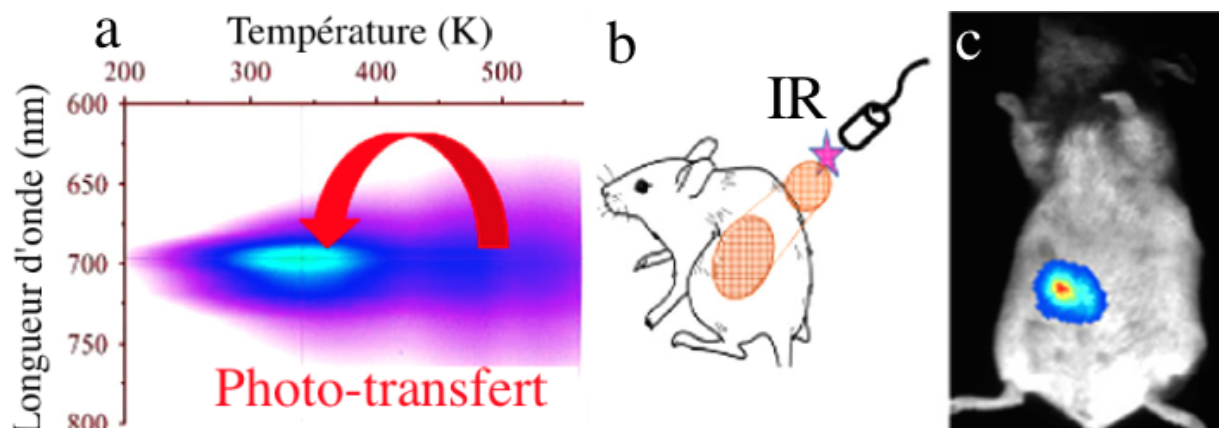


Figure 1.63. Phénomène de luminescence photostimulée du ZGO:Cr³⁺. a) Spectre de luminescence thermostimulée montrant la population de pièges trop profonds pour être responsables de la luminescence persistante à température ambiante. Une souris ayant reçu une injection sous-cutanée de nanoparticules de ZGO illuminées par des UV est laissée dans le noir jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de luminescence persistante perceptible. Puis la zone où les nanoparticules ont été injectées est illuminée 20 secondes avec une diode laser à 977 nm (b) avant qu'une nouvelle acquisition de luminescence ne soit réalisée (c). (Adapté de 207)

- Deux cas isolés ont aussi été utilisés pour faire de l'imagerie *in vivo* : en 2004, une publication montre que l'apatite de calcium ($Ca_9(PO_4)_5(HPO_4)(OH)$) dopée par de l' Eu^{2+} a une émission à 614 nm.²⁰⁸ Mais il a fallu attendre 2016 pour voir se concrétiser une

²⁰⁵ T. Maldiney et al. Mesoporous persistent nanophosphors for *in vivo* optical bioimaging and drug-delivery. *Nanoscale* 2014, 6, 13970.

²⁰⁶ T. Maldiney et al. Gadolinium-doped persistent nanophosphors as versatile tool for multimodal *in vivo* imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2015, 25 (2), 331.

²⁰⁷ B. Viana et al. Long term *in vivo* imaging with Cr³⁺ doped spinel nanoparticles exhibiting persistent luminescence. *J. Lumin.* 2016, 170 (3), 879.

²⁰⁸ A. Doat et al. Synthesis of luminescent bioapatite nanoparticles for utilization as a biological probe. *J. Solid. State Chem.* 2004, 177, 1179.

application *in vivo*.²⁰⁹ Le second cas est celui du stannate de strontium (Sr₂SnO₄)²¹⁰ dopé avec Nd³⁺. Mais une synthèse par voie solide n'a pas permis de suivi après injection systémique.

Le tableau ci-dessous présente toutes les compositions ayant déjà été utilisées pour une application plus ou moins proche du *vivo*.²¹¹ Les références aux publications du laboratoire ou de nos collègues de l'Institut de Recherche de Chimie Paristech (IRCP), spécialisés dans la physique des matériaux luminescents, sont surlignées en bleu. La plupart de ces matériaux doit être illuminée avec des UV avant injection, ce qui empêche une excitation *in vivo* donc un suivi prolongé. Cette caractéristique est précisée par l'inscription "UV" dans la colonne des remarques. Quelques compositions sont synthétisées par voie solide, ce qui ne permet pas d'obtenir des nanoparticules (remarque "voie solide"). Dans ce cas la preuve de concept d'imagerie est souvent réalisée à travers un doigt ou une tranche de viande.^{200,210}

Matrice	Dopant(s)	Référence(s)	Remarque(s)
Ca _{0,2} Zn _{0,9} Mg _{0,9} Si ₂ O ₆	Mn ²⁺ , Eu ²⁺ , Dy ³⁺	38, 198 (2007, 2011)	UV
CaMgSi ₂ O ₆	Mn ²⁺ , Eu ²⁺ , Pr ³⁺	43 (2011)	UV
Ca ₂ Si ₅ N ₈	Eu ²⁺ , Tm ³⁺	212 (2012)	UV
Sr ₂ SnO ₄	Nd ³⁺	210 (2014)	UV / voie solide
SrAl ₂ O ₄	Eu ²⁺ , Dy ³⁺	199 (2014)	UV / λém<600 nm
MAIO ₃ (M=La, Gd)	Mn ⁴⁺ /Ge ⁴⁺	200 (2014)	UV / voie solide
Ca ₃ (PO ₄) ₂ , HAp	Mn ²⁺ , Tb ³⁺ , Dy ³⁺	209 (2015)	UV
Zn _{2,94} Ga _{1,96} Ge ₂ O ₁₀	Cr ³⁺ , Pr ³⁺	201 (2013)	UV
LiGa ₅ O ₈	Cr ³⁺	203,204 (2013, 2014)	
ZnGa ₂ O ₄	Cr ³⁺	45, 205 (2014)	
ZnGa ₂ O ₄	Cr ³⁺ , Gd ³⁺	206 (2015)	Actif en IRM
Zn _{1,1} Ga _{1,8} Ge _{0,1} O ₄	Cr ³⁺ , Eu ³⁺	202 (2015)	

Tableau 1.1. Compositions de matériaux à luminescence persistante qui font l'objet de travaux d'imagerie optique *in vivo*. (Adapté de 211)

Si les premiers matériaux luminescents utilisaient principalement le Mn²⁺ et des lanthanides comme dopants, le Cr³⁺ est de plus en plus utilisé dans la composition des matériaux à luminescence persistante. Sa structure électronique et ses interactions avec les matrices utilisées permettent d'obtenir un phénomène de luminescence persistante avec un seul dopant, tout en ayant une excitation et une émission dans la première fenêtre de transparence des tissus.

Parmi les nombreux outils disponibles pour l'imagerie optique *in vivo*, les nanoparticules à luminescence persistante tirent leur épingle du jeu en s'affranchissant totalement de la nécessité d'illumination concomitante à l'acquisition du signal. De plus, certains matériaux peuvent être activés dans la première fenêtre de transparence des tissus, ce qui permet de les suivre facilement *in vivo*. Outre les applications *in vivo* précédemment décrites, la modalité optique peut être utilisée afin de suivre des cellules

²⁰⁹ C. Rosticher et al. Persistent luminescence of Eu, Mn, Dy doped calcium phosphates for *in-vivo* optical imaging. J. Lumin. 2016, 170, 460.

²¹⁰ S. Kamimura et al. Long-persistent luminescence in the near-infrared from Nd³⁺-doped Sr₂SnO₄ for *in vivo* optical imaging. Jpn. J. Appl. Phys. 2014, 59 (9), 092403.

²¹¹ B. Viana et al. Long term *in vivo* imaging with Cr³⁺ doped spinel nanoparticles exhibiting persistent luminescence. J. Lumin. 2016, 170, 879.

²¹² T. Maldiney et al. *In vivo* optical imaging with rare earth doped Ca₂Si₅N₈ persistent luminescence nanoparticles. Opt. Mat. Exp. 2012, 2 (3), 261.

injectées chez l'animal. Les outils ayant montré une efficacité pour cette application sont décrits ci-dessous.

c) Les nanoparticules luminescentes pour le suivi cellulaire

Les premières applications de suivi cellulaire *in vivo* ont été réalisées en marquant des cellules souches à l'aide de fluorophores tels que des analogues fluorescents de la thymidine,²¹³ des lipides fluorescents²¹⁴ ou encore différentes cyanines.^{215,216} Après avoir été isolés du sang, des macrophages ont été marqués avec une cyanine fluorescente dans la première fenêtre de transparence des tissus. Ces cellules sont ensuite réinjectées à des souris auxquelles des gels de polyacrylamide ont été injectés sous la peau. Afin de mimer une inflammation, certains de ces gels ont été chargés avec des lipopolysaccharides. Un suivi en fluorescence a ainsi permis d'observer une accumulation plus importante des macrophages marqués autour des gels contenant des lipopolysaccharides (Figure 1.64.a et b). Des cellules souches embryonnaires marquées avec la même cyanine et injectées par voie intraveineuse à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanée ont aussi permis de visualiser ces tumeurs en fluorescence (Figure 1.64.c).

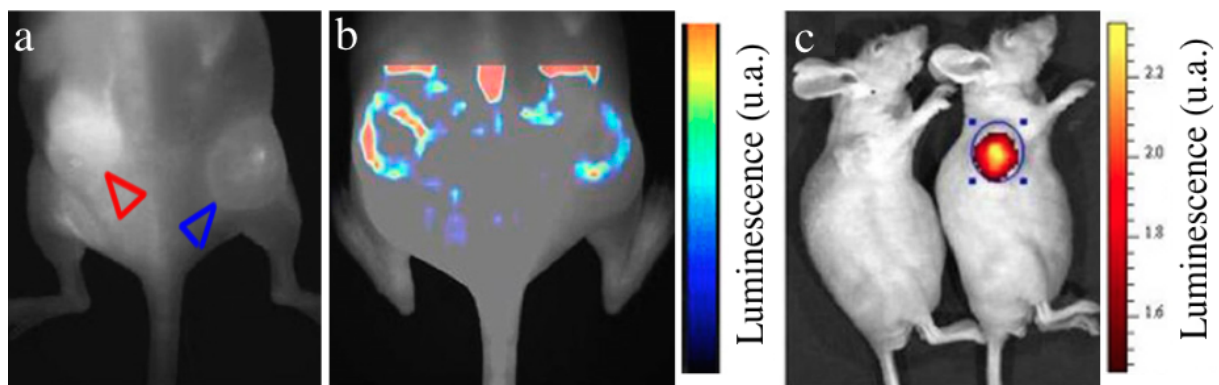


Figure 1.64. Suivi *in vivo* de cellules marquées avec la cyanine DiR. a-b) Image de fluorescence (a) et tomographie de fluorescence (b) de souris portant des gels de polyacrylamide contenant des lipopolysaccharides (pointe de flèche rouge) ou non (pointe de flèche bleue) 72 h après avoir reçu une injection intraveineuse de $5 \cdot 10^6$ macrophages marqués avec une cyanine. c) Image de fluorescence d'une souris témoin (gauche) et d'une souris portant une tumeur sous-cutanée 4 h après injection intraveineuse de $5 \cdot 10^6$ cellules souches embryonnaire marquées avec une cyanine. (Adapté de 215 et 216)

Mais une photostabilité et une stabilité chimique restreintes de ces fluorophores limitent fortement leur utilisation pour marquer et suivre ces cellules *in vivo*. Les nanoparticules luminescentes représentent ainsi une bonne alternative pour cette application et les travaux décrivant le suivi cellulaire *in vivo* à l'aide d'un marquage avec des nanoparticules luminescentes sont nombreux. Depuis leur première utilisation pour marquer des fibroblastes murins par l'équipe de Paul Alivisatos en 1998,²¹⁷ beaucoup de

²¹³ L. Pang et al. Studies on BrdU labeling of haematopoietic cells: stem cells and cell lines. *J. Cell. Physiol.* 2003, 197, 251.

²¹⁴ C. Weir et al. Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and *in vivo* fluorescent dye tracking. *Heart Lung Circ.* 2008, 17, 315.

²¹⁵ M. Eisenblätter et al. *In vivo* optical imaging of cellular inflammatory response in granuloma formation using fluorescence-labeled macrophages. *J. Nucl. Med.* 2009, 50, 1676.

²¹⁶ J. Ruan et al. DiR-labeled embryonic stem cells for targeted imaging of *in vivo* gastric cancer cells. *Theranostics.* 2012, 2 (6), 618.

²¹⁷ M. Bruchez et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 1998, 281 (5385), 2013.

travaux ont été publiés concernant le marquage et le suivi cellulaire à l'aide de QD. On peut citer notamment l'utilisation de cellules souches dérivées d'embryons,²¹⁸ de cellules souches adultes mésenchymateuses,²¹⁹ hématopoïétiques²²⁰ ou dérivées d'adipocytes,²²¹ mais dans la plupart des cas la seule preuve de concept de suivi *in vivo* est réalisée après injection sous-cutanée des cellules. Récemment, et afin de réduire le signal parasite d'autofluorescence, des QD actifs dans la seconde fenêtre de transparence des tissus ont été utilisés pour marquer des CSM et suivre leur infiltration au niveau d'une blessure cutanée (Figure 1.65).²²²

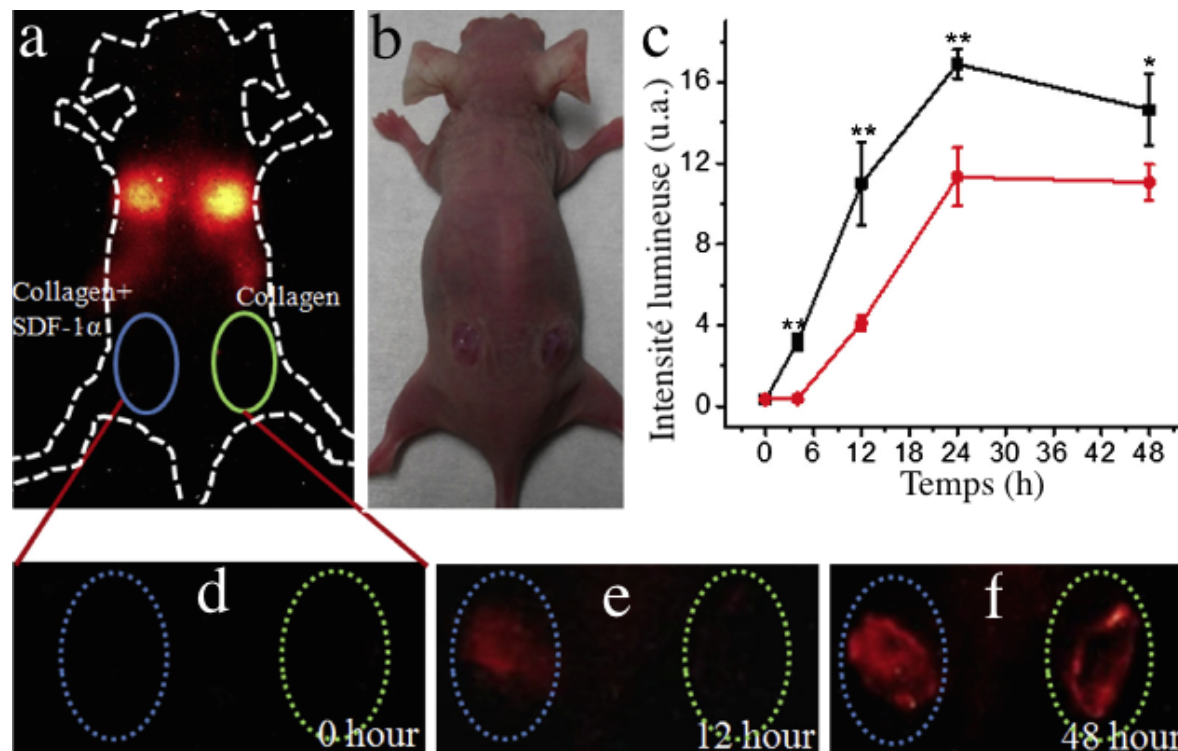


Figure 1.65. Suivi de CSM marquées avec des QD de Ag₂S après injection intraveineuse sur une souris portant deux blessures sous-cutanées. Les blessures cutanées ont été remplies par du collagène avec (oval bleu) ou sans SDF-1α (oval vert). On peut voir la souris en fluorescence après injection des cellules (a) et en lumière visible (b). c-d) La fluorescence issue des deux blessures est mesurée au cours du temps après injection des cellules. On observe une augmentation plus importante du signal de fluorescence dans la blessure contenant le SDF-1α après 12 (e) et 48 h (f). (Adapté de 222)

Dix ans après la première utilisation des QD pour marquer des cellules, les UCNP ont aussi montré leur efficacité pour marquer différents types cellulaires.²²³ Le marquage de CSM avec des UCNP ne semble pas affecter leurs caractéristiques²²⁴ et permet une

²¹⁸ S. Lin et al. Quantum dot imaging for embryonic stem cells. BMC Biotechnol. 2007, 7, 67.

²¹⁹ Y. Ohyabu et al. Stable and nondisruptive *in vitro/in vivo* labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. Hum. Gene Ther. 2009, 20, 217.

²²⁰ S. Ranjbarvaziri et al. Quantum dot labeling using positive charged peptides in human hematopoietic and mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2011, 32, 5195.

²²¹ H. Yukawa et al. Quantum dots labeling using octa-arginine peptides for imaging of adipose tissue-derived stem cells. Biomaterials. 2010, 31, 4094.

²²² G. Chen et al. *In vivo* real-time visualization of mesenchymal stem cell tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging. Biomaterials. 2015, 53, 265.

²²³ R. A. Jalil & Y. Zhang. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. Biomaterials. 2008, 29, 4122.

²²⁴ L. Zhao et al. Stem cell labeling using polyethylenimine conjugated (α-NaYF₄:Tm³⁺)/CaF₂ upconversion nanoparticles. Theranostics. 2013, 3 (4), 249.

détection *in vivo* avec une grande sensibilité.²²⁵ En effet, il est possible de visualiser seulement une dizaine de CSM marquées avec des UCNP et injectées en sous-cutanée, faisant de cette technique la plus sensible actuellement pour le suivi cellulaire (Figure 1.66.a). En revanche, le nombre de cellules suivies après injection par voie intraveineuse s'élève à 5.10^5 (Figure 1.66.b).²²⁵

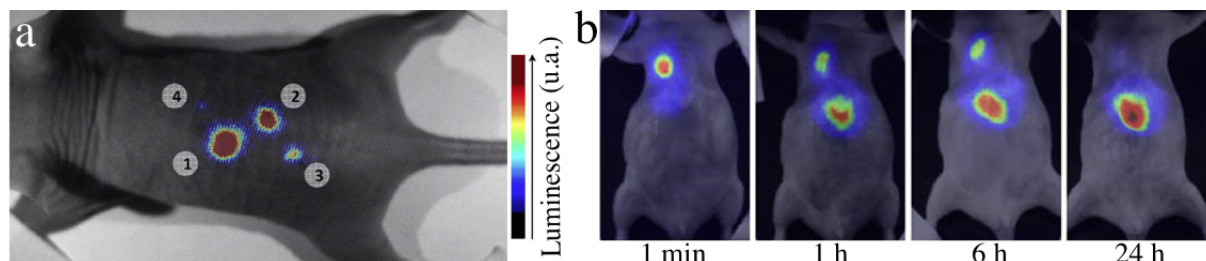


Figure 1.66. Suivi cellulaire *in vivo* par upconversion. a) Des quantités décroissantes de CSM marquées avec des UCNP sont injectées en sous-cutanée (de 10^4 à 10^1 pour les points 1 à 4, respectivement). b) Des images d'upconversion sont réalisées au cours du temps après injection de 5.10^5 CSM marquées avec des UCNP. (Adapté de 225)

La Figure 1.66.b montre bien un des écueils du suivi cellulaire après injection intraveineuse : la rétention des cellules dans les capillaires pulmonaires. Cela est probablement dû à une agrégation des cellules avant injection. On observe progressivement un transfert de la luminescence des poumons au foie.

D'autres nanoparticules luminescentes telles que les vanadates dopés à l'euprécium développés par le Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (LPMC) à l'école Polytechnique ont été internalisées par des cellules.^{226,227} De plus, lorsque de l'ytterbium est rajouté comme second dopant, ces particules ont des propriétés de conversion ascendante.²²⁸ Une application originale de ces nanoparticules est leur utilisation comme nanocapteur pour mesurer la concentration intracellulaire de H_2O_2 .²²⁹ Lorsque ces vanadates YVO_4 dopés avec Eu^{3+} sont illuminés 466 nm, l' Eu^{3+} est réduit en Eu^{2+} entraînant une perte de luminescence à 617 nm. Ces nanoparticules internalisées par des cellules vasculaires de muscle lisse de souris (Figure 1.67.a) ont été illuminées afin de réduire l'euprécium. En présence d'un facteur de croissance ou d'endothéline, ces cellules sont stimulées, ce qui entraîne la production intracellulaire de H_2O_2 : Eu^{2+} est oxydé, les vanadates sont à nouveau luminescents (Figure 1.67.b). Le suivi de luminescence d'une cellule permet ainsi de suivre son métabolisme à partir de la concentration intracellulaire de H_2O_2 (Figure 1.67.c). Cette expérience montre la possibilité d'utiliser certaines nanoparticules luminescentes comme sondes de biologie moléculaire.

²²⁵ C. Wang et al. Towards whole-body imaging at the single cell level using ultra-sensitive stem cell labeling with oligo-arginine modified upconversion nanoparticles. *Biomaterials*. 2012, 33, 4872.

²²⁶ E. Beaurepaire et al. Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level. *Nano Lett.* 2004, 4 (11), 2079.

²²⁷ Y. Liu et al. Fabrication of MPEG-b-PMAA capped $YVO_4:Eu$ nanoparticles with biocompatibility for cell imaging. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2015, 136, 721.

²²⁸ G. Mialon et al. High up-conversion efficiency of $YVO_4:Yb,Er$ nanoparticles in water down to the single-particle level. *J. Phys. Chem. C*. 2010, 114, 22449.

²²⁹ D. Casanova et al. Single europium-doped nanoparticles measure temporal pattern of reactive oxygen species production inside cells. *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 581.

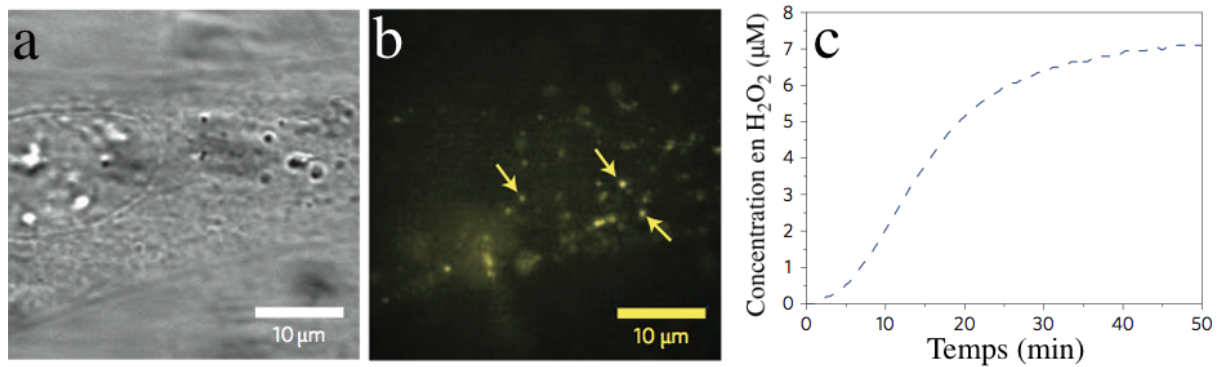


Figure 1.67. Utilisation de vanadates comme nanocapteurs intracellulaires. a-b) Images de microscopie optique (a) et de fluorescence (b) d'une cellule endothéliale de muscle lisse de souris ayant internalisé des nanoparticules de YVO₄:Eu, 30 min après stimulation par de l'endothéline. c) Profil d'évolution temporelle de la concentration intracellulaire de H₂O₂ déduit de la luminescence de nanoparticules de vanadate internalisées après stimulation des cellules par le facteur de croissance dérivé de plaquettes. (Adapté de 229)

Si les nanoparticules luminescentes donnent la possibilité de suivre en temps réel la biodistribution de cellules injectées *in vivo*, la faible résolution spatiale de la modalité optique ne permet pas de localiser très précisément ces cellules. Bien que certains outils tels que des nanotubes de carbone ou des QD fluorescents dans la seconde fenêtre de transparence des tissus où la diffusion est minimale permettent de résoudre ce problème, leur suivi cellulaire en imagerie optique avec une haute résolution spatiale n'a pas encore été décrit.

Afin de localiser précisément des cellules injectées *in vivo*, il est envisageable d'utiliser une autre modalité possédant une bonne résolution spatiale telle que l'IRM. Cela sera décrit dans la troisième partie de l'introduction.

II. L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

A. PRINCIPE PHYSIQUE	p. 82
∇	
1) La résonance magnétique nucléaire	p. 83
a) Le moment magnétique de spin	p. 83
b) La précession de Larmor	p. 84
c) Les relaxations	p. 85
2) Application médicale	p. 87
a) Historique	p. 87
b) Détails techniques	p. 87
i. Aimants et champs	p. 87
ii. Que voit-on en T ₁ ...	p. 88
iii. ... et en T ₂ ?	p. 88
c) Les agents de contraste	p. 89
B. APPLICATIONS EN NANOTECHNOLOGIE	p. 91
B	
1) Les agents de contraste positif	p. 91
a) Les complexes ioniques	p. 91
b) Les nanoparticules	p. 93
2) Les agents de contraste négatif	p. 95
a) Les oxydes de fer	p. 95
b) Les dérivés du Dysprosium	p. 96
3) Les nanoparticules magnétiques pour le suivi cellulaire	p. 97
a) Le suivi cellulaire en T ₁ ...	p. 97
b) ... et en T ₂	p. 98

A. PRINCIPE PHYSIQUE

Cette seconde partie se penche sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire à la base de l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Je présenterai aussi quelques notions essentielles à la compréhension de mes travaux de thèses portant sur la description d'un nouvel outil d'imagerie multimodal (Résultats, Partie IV).

La matière n'interagit pas qu'avec les rayonnements électromagnétiques visibles. Les noyaux de certains éléments chimiques placés dans un champ magnétique peuvent interagir avec des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est environ 10^3 fois plus grande que celle du visible. Ce phénomène s'appelle la résonance magnétique nucléaire. Il est mis à profit en imagerie médicale, et connu sous le nom d'IRM. Cette modalité non invasive permet d'obtenir des images avec une grande résolution spatiale et représente donc un outil précieux pour explorer l'anatomie (Figure 2.1). En plus de la clinique, l'IRM est de plus en plus utilisée en recherche, notamment pour comprendre le fonctionnement du cerveau et sa structure.^{230,231}

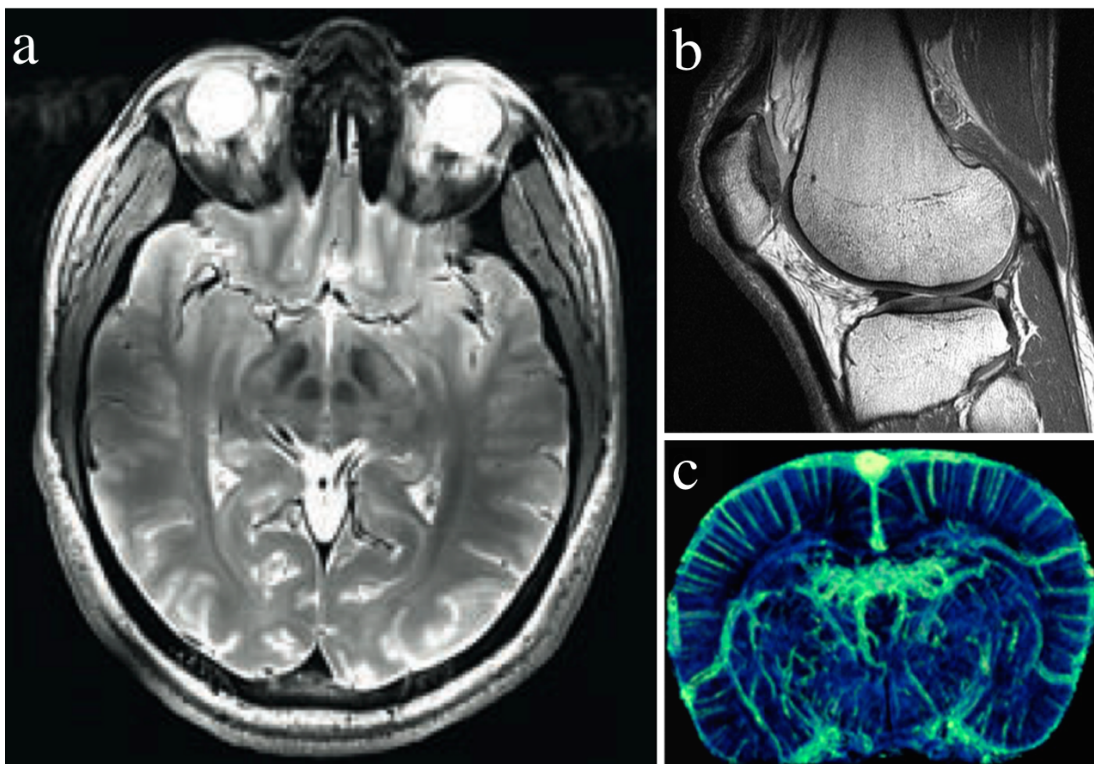


Figure 2.1. Exemples d'IRM à haute résolution. a) Coupe transverse de cerveau humain enregistré sur le système IRM 7 Teslas de Neurospin avec de nombreux détails anatomiques. b) Coupe sagittale de l'articulation d'un genou humain en IRM. On peut distinguer les os, les tendons, les ligaments et les cartilages avec précision. c) Angiographie cérébrale par résonance magnétique microscopique chez le rat. Reconstruction à haute définition à partir de trois observations IRM d'une coupe coronale de 1 mm d'épaisseur réalisée dans un champ de 7 T, après inhalation d'air, de dioxygène pur ou de "carbogen" (95% O₂ + 5% CO₂). (Adapté de 230 et 231)

²³⁰ Le cerveau exploré. Les clefs du CEA n°62, automne 2014.

²³¹ C.-H. Huang et al. High-resolution structural and functional assessments of cerebral microvasculature using 3D gas ΔR_2^* -mMRA. Plos One. 2013, 8 (11), e78186.

1) La résonance magnétique nucléaire

La découverte du phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) est attribuée à Isidor Isaac Rabi, en 1938, ce qui lui valu le prix Nobel de physique en 1944.²³² Felix Bloch et Edward Mills Purcell ont reçu en 1952 le prix Nobel de physique pour "le développement de nouvelles méthodes permettant la mesure précise du magnétisme nucléaire et les découvertes associées".²³³ C'est cette dernière découverte qui est à la base des applications de la RMN aujourd'hui : l'effet de l'induction magnétique sur la RMN. Commençons par tenter d'expliquer comment fonctionne la RMN.

a) Le moment magnétique de spin

Il est difficile d'expliquer le phénomène de RMN sans aborder le concept de spin (ou moment cinétique de spin). Le spin est une propriété intrinsèque des particules élémentaires, tout comme la charge électrique ou la masse. Sa découverte est le résultat de la célèbre expérience de Stern et Gerlach, en 1922.²³⁴ Le spin est un concept abstrait, sans équivalent classique macroscopique, qu'il est certainement difficile de totalement appréhender sans connaître et comprendre les lois et les équations de la mécanique quantique qui lui sont associées. Il est cependant possible de le représenter en faisant quelques analogies simplificatrices, ce dont je vais me contenter ici.

Le spin ne peut avoir que des valeurs entières et demi-entières (le proton et le neutron ont un spin qui vaut 1/2). On lui associe une grandeur appelée moment magnétique de spin, qui caractérise son interaction avec un champ magnétique dans lequel il est placé. Pour des particules sub-atomique, le moment magnétique est proportionnel au moment cinétique de spin S , à la charge q , au facteur de Landé g et inversement proportionnel à la masse m :

$$\vec{\mu}_S = g \frac{q}{2m} \vec{S} = \gamma \vec{S}$$

γ est appelé rapport gyromagnétique et peut être exprimé en C.kg⁻¹ ou en MHz.T⁻¹. On verra plus loin que ce rapport a un intérêt particulier en RMN. On considère parfois que le moment magnétique de spin agit comme un petit aimant. Le champ magnétique, noté B , est exprimé en Tesla (T). Cette unité est inadaptée aux champs naturellement présents à la surface de la Terre dont le champ magnétique s'élève à 50 μ T²³⁵ (on préfère parfois utiliser le Gauss, qui vaut 10⁻⁴T). Cependant, les champs utilisés dans les spectromètres RMN ou IRM peuvent aller jusqu'à 20 T (ce qui reste tout de même très faible comparé aux champs magnétiques de certains vestiges d'étoiles pouvant s'élever à plus de 10¹⁴ T).

²³² http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1944

²³³ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952

²³⁴ J. Dalibard. Cours donné à Polytechnique. 2010. www.phys.ens.fr/~dalibard/transparentsX/2010/cours2.pdf

²³⁵ M. H. Levitt. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance, 2nd edition. Wiley. 2008. ISBN 978-0-470-51117-6

Les assemblages de particules élémentaires ont aussi un spin dépendant de cet assemblage. Certains noyaux d'atomes possèdent un moment magnétique non nul, ou spin, qui se comporte comme un aimant. La technologie de la RMN n'est applicable qu'à ces noyaux ayant un spin non nul. On peut citer par exemple le noyau d'hydrogène, sous sa forme classique (le noyau n'est constitué que d'un seul proton et a donc le même spin que le proton). La majorité des applications de la RMN est basée sur le proton, mais on peut aussi citer le ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P ... En revanche les noyaux possédant un nombre pair de protons et de neutrons ont un spin nul, n'ont pas de moment magnétique et ne peuvent donc pas être visualisés en RMN (^{12}C , ^{16}O).

b) La précession de Larmor

En l'absence de champ magnétique, la distribution de ces moments magnétiques est aléatoire. Bien qu'il s'agisse d'un phénomène quantique, on peut le représenter de façon un peu plus concrète : l'application d'un champ magnétique \vec{B}_0 va entraîner un mouvement de précession de tous les systèmes possédant un moment magnétique non nul et n'étant pas alignés avec le champ. Ce mouvement peut être visualisé comme une rotation du moment magnétique le long d'un cône dont l'axe est celui du champ magnétique, dessinant ainsi un cornet à glace (Figure 2.2).²³⁵ On peut imaginer l'aiguille d'une boussole qui s'aligne avec un champ magnétique extérieur : au moment où le champ \vec{B}_0 est appliqué, l'aiguille s'aligne mais avant de s'immobiliser dans la direction du champ, son inertie fait qu'elle va légèrement osciller autour de la position d'équilibre. Il en est de même pour un moment magnétique dans un champ \vec{B}_0 , sauf que l'oscillation se fait en deux dimensions : le cône décrit par le moment magnétique va ainsi paraître de plus en plus étroit au cours du temps. Nous verrons que le temps mis par ce moment pour rejoindre l'axe du champ \vec{B}_0 donne des informations sur son environnement. La fréquence de rotation de ce moment, appelée fréquence de Larmor, est donnée par le rapport gyromagnétique γ (à un facteur 2π près) :

$$f = \frac{\gamma}{2\pi} B$$

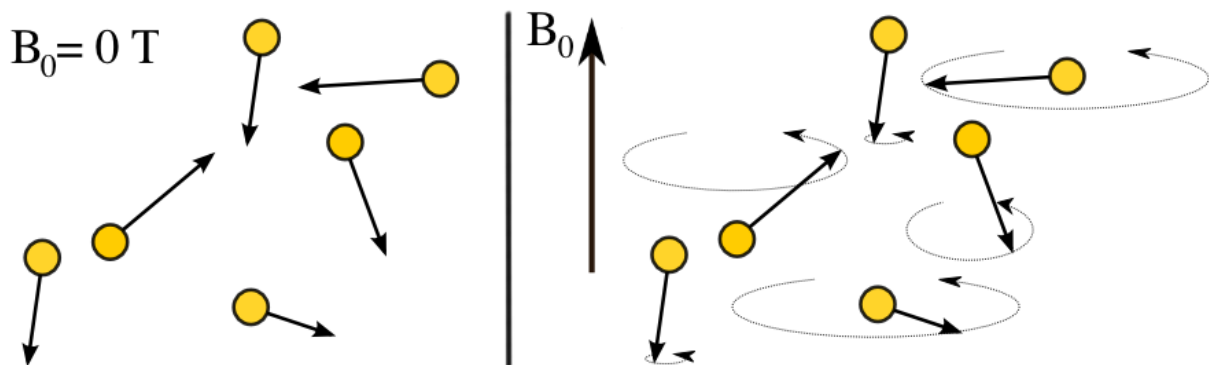


Figure 2.2. Représentation de la précession de Larmor de moments magnétiques. En l'absence de champ magnétique les moments sont orientés de manière aléatoire (gauche). Lorsqu'un champ \vec{B}_0 est appliqué, les moments vont effectuer un mouvement de précession autour de l'axe du champ (droite), c'est la précession de Larmor.

Cette fréquence de Larmor est la fréquence qui va être absorbé par le système ayant le rapport gyromagnétique γ correspondant. Ce rapport étant propre à une particule ou à un noyau atomique, il est possible d'observer sélectivement la résonance magnétique d'un type de noyaux. Il est erroné de penser que tous les moments magnétiques vont finir par s'orienter selon l'axe du champ. L'agitation thermique empêche qu'une proportion importante s'alignent avec \vec{B}_0 : environ un moment sur 10^6 fini par s'aligner avec \vec{B}_0 , lorsqu'il vaut 0,3 T.²³⁶ Cette faible proportion suffit à être détectée, tandis que le reste des moments continue à être aléatoirement orienté et possède donc statistiquement une aimantation nulle. On se doute alors que la température est liée à la qualité du signal perçu. Malheureusement, pour les applications médicales, il n'est pas possible de refroidir les tissus que l'on veut observer. Pour avoir une meilleure définition, il est aussi possible d'augmenter le champ B_0 mais les barrières technologiques limitent l'obtention de champs très intenses dans des volumes importants. Pour cette raison, les IRM ayant les champs les plus élevés sont des spectromètres RMN pour la chimie (jusqu'à 24 T), puis pour l'imagerie préclinique (l'IRM préclinique le plus puissant est à Neurospin et présente un champ de 17,2 T). L'IRM clinique ayant l'aimant le plus puissant en France est un 7 T, mais il est dédié à la recherche en neurosciences.

c) Les relaxations

Une fois l'objet plongé dans le champ \vec{B}_0 , on envoie une excitation radiofréquence à la fréquence de Larmor du système que l'on veut observer. Par exemple, la fréquence de Larmor du proton est de 42,6 MHz.T⁻¹,²³⁷ ce qui correspond à des ondes radios. Cette onde va faire osciller avec une même phase les moments magnétiques excités dans un plan perpendiculaire à \vec{B}_0 . L'arrêt de l'excitation va permettre à ces moments de revenir vers leur position initiale proche de l'axe \vec{B}_0 . Cette phase de retour à l'équilibre, appelée relaxation, se fait avec un mouvement de précession à la fréquence de Larmor. Il en résulte l'émission d'un signal, appelé signal de précession, mesuré par l'antenne réceptrice du système utilisé (spectromètre RMN ou IRM). On caractérise ce phénomène en mesurant deux durées caractéristiques :

- Le temps de relaxation longitudinal (noté T_1) correspond au temps mis pour retrouver 63% de l'aimantation longitudinale avant perturbation. En plus de tourner autour de l'axe, les moments vont s'en rapprocher de plus en plus et le champ magnétique selon l'axe de \vec{B}_0 va réaugmenter selon une loi exponentielle. T_1 représente le temps caractéristique de ce phénomène, M_{0z} l'aimantation longitudinale avant excitation (Figure 2.3.a) et $M_z(t)$ l'aimantation longitudinale après la fin de l'excitation en fonction du temps :

$$M_z(t) = M_{0z} \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right)$$

²³⁶ R. W. Brown et al. Magnetic resonance imaging, physical principles and sequence design, 2nd edition. Wiley-Blackwell. 2014. ISBN 978-0-471-72085-0.

²³⁷ M. A. Bernstein et al. Handbook of MRI Pulse Sequences. Elsevier Acad. Press. 2004. ISBN 0-1209-2861-2

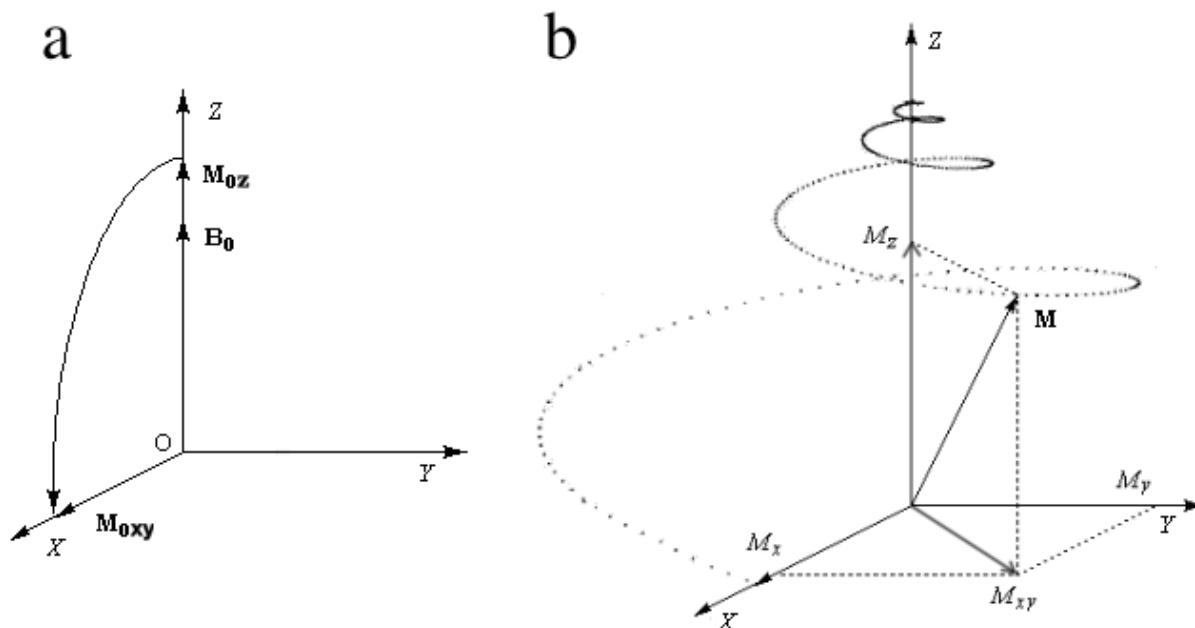


Figure 2.3. Représentation schématique du phénomène de relaxation d'un moment magnétique plongé dans un champ \vec{B}_0 . a) Initialement, le moment est aligné avec l'axe du champ, l'aimantation longitudinale est notée M_{0z} . Puis une onde excitatrice fait basculer le moment à 90° , celui-ci, noté M_{0xy} , est alors contenu dans le plan Oxy. b) Ce moment M retourne à sa position initiale en effectuant un mouvement de précession autour de l'axe du champ, ici confondu avec l'axe Oz. On peut distinguer deux composantes de ce vecteur M : M_z qui est la projection de M sur l'axe Oz, appelée aimantation longitudinale, et M_{xy} qui est la projection de M sur le plan Oxy, appelée aimantation transversale. (Adapté de "Cours de chimie organique", Pr. G. Dupuis, Lycée Faidherbe, Lille)

- Le temps de relaxation transversal (noté T_2) correspond à la diminution du signal de précession. En effet, l'onde excitatrice a pour effet de faire tourner tous les moments magnétiques en même temps, on dit qu'ils sont en phase. Une fois l'excitation stoppée, les moments excités vont continuer à tourner. Ils seront donc responsables d'une aimantation dite transversale (Figure 2.3), car perpendiculaire à la direction de \vec{B}_0 . Mais l'agitation thermique et surtout les différences locales de champ magnétique (les différences d'environnement électronique) de chaque moment vont modifier légèrement la vitesse à laquelle tournent ces moments. Il s'agit d'une perte de cohérence entre tous les moments oscillant. On peut faire un analogie avec des horloges dont les tic-tac sont initialement superposés et qui vont se désynchroniser au cours du temps.²³⁵ En fonction du temps mis pour observer un déphasage de ces moments, on verra disparaître plus ou moins rapidement l'aimantation transversale. Le temps caractéristique de disparition de cette aimantation, qui se fait aussi selon une loi exponentielle, est appelé T_2 , M_{0xy} représente l'aimantation transversale juste avant la fin de l'excitation et $M_{xy}(t)$ l'aimantation transversale après la fin de l'excitation en fonction du temps :

$$M_{xy}(t) = M_{0xy} e^{-\frac{t}{T_2}}$$

L'aimantation transverse due à l'excitation radiofréquence est très faible. Elle reste néanmoins détectable car elle oscille à une fréquence bien définie. La rotation cohérente des moments magnétiques engendre un champ magnétique en rotation. L'équation de Maxwell-Faraday (ci-dessous) prédit qu'un champ magnétique variable engendre un champ électrique :

$$\vec{\nabla} \vec{E} = - \frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$$

Si une bobine conductrice est à proximité de l'échantillon, le champ électrique créé met les électrons en mouvement. On peut alors détecter un faible courant oscillant dans la bobine.²³⁵

Ces durées T_1 et T_2 varient en fonction de l'environnement des moments et dépendent par exemple du tissu observé en IRM. La densité d'un tissu et l'agitation moléculaire présente dans ce tissu sont deux éléments à prendre en compte pour expliquer ces variations (voir ci-dessous paragraphe 2) b). On peut noter que T_1 et T_2 vont environ de 100 ms à quelques secondes pour l'atome d'hydrogène dans un champ de quelques Teslas.

De manière synthétique, un spectromètre RMN est un appareil capable d'appliquer un champ magnétique important afin d'aimanter les moments magnétiques de spin, d'envoyer des pulses radio-fréquence afin de faire tourner ces moments pour produire une aimantation transverse et enfin de détecter le signal électrique oscillant induit par la précession des moments magnétiques. Aujourd'hui, le phénomène de RMN a principalement des applications en chimie organique, en biologie structurale et en imagerie médicale.

2) Application médicale

a) Historique

En 1973, Lauterbur et Mansfield ont proposé une idée assez simple : si un objet est placé dans un gradient de champ magnétique, les fréquences de Larmor des composants de cet objet vont varier spatialement. Ainsi, s'il est possible de séparer les différentes fréquences du signal reçu après excitation, on doit pouvoir récupérer une information sur les variations spatiales de la composition de l'objet. Cette idée novatrice a représenté le premier pas vers l'IRM. Lauterbur et Mansfield ont d'ailleurs reçu le prix Nobel de Médecine en 2003 pour leurs découvertes concernant l'IRM.²³⁸

b) Détails techniques

i. Aimants et champs

En clinique, les spectromètres IRM actuels ont des champs magnétiques allant de 0,1 à 7 T, bien que la norme soit plutôt de 1,5 T. L'aimant utilisé pour créer le champ magnétique \vec{B}_0 dans lequel baigne le patient peut être de trois sortes : permanent, résistif ou supraconducteur. Les premiers aimants utilisés étaient permanents, mais les risques liés à leur utilisation et leur masse (impossibilité de suspendre leur champ en cas d'urgence, 10 tonnes pour un 0,3 T) limitent aujourd'hui leur développement

²³⁸ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2003/

sachant que d'autres aimants sont disponibles. Les aimants résistifs sont constitués d'une bobine de cuivre parcourue par un courant électrique, ce sont des électroaimants. Les principaux désavantages sont une difficulté à dépasser 0,5 T, une variation de ce champ avec la température et une dépense énergétique importante pour compenser l'effet Joule. La troisième option, les aimants supraconducteurs, est aujourd'hui la plus répandue. Ce sont aussi des électroaimants : ils sont constitués de bobinages de niobium-titane refroidis par de l'hélium liquide (4,2 K, environ -269°C), ce qui permet de faire disparaître la résistance électrique. Les champs magnétiques atteints peuvent ainsi s'élever à plusieurs Teslas.

ii. Que voit-on en T_1 ...

L'agitation moléculaire, la densité et la structure d'un tissu influencent le T_1 . Les petites molécules ayant une faible inertie sont assez inefficaces pour stopper rapidement la relaxation. Leur agitation moléculaire peut être caractérisée par une donnée temporelle. Par exemple, cela correspond au temps que met la molécule d'eau à faire 180°. La fréquence correspondante (l'inverse de ce temps) est égale à 2,9 GHz, c'est la fréquence utilisée dans les fours à micro-ondes. Cette durée doit être comparée à la fréquence de Larmor du noyau que l'on observe (42,6 MHz pour le proton à 1T). Lorsque ces deux valeurs sont très différentes, la relaxation est lente. C'est le cas de l'eau (il y a presque un facteur 10^2 entre la fréquence caractéristique de l'agitation de l'eau et la fréquence de Larmor du proton) : plus un tissu contient d'eau, plus le T_1 est long. C'est le cas du liquide céphalo-rachidien. Les tissus denses (dents, cartilages, os), bien que contenant peu d'eau, n'ont pas l'agitation moléculaire nécessaire pour stopper la relaxation rapidement (la fréquence caractéristique est très inférieure à la fréquence de Larmor), et ont des T_1 encore plus long, ils restent sombres sur les images d'IRM, on parle d'hyposignal. Lorsque cette durée caractéristique de l'agitation moléculaire est proche de la fréquence de Larmor, la relaxation est rapide : T_1 est court. C'est le cas de tissus contenant de grandes molécules ayant beaucoup d'inertie, comme les protéines, dans un milieu relativement aqueux : la plupart des tissus mous vont donc apparaître en clair, ou en hypersignal, sur les images d'IRM pondérées en T_1 .²³⁹ Les valeurs caractéristiques de T_1 à un champ de 1 T sont précisées dans le tableau ci-dessous.

Tissu	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Graisse	250	80
Foie	400	40
Rein	550	60
Rate	400	60
Substance blanche	650	90
Substance grise	800	100
Liquide céphalo-rachidien	2000	150
Eau	3000	3000
Os, dents	Très long	Très court

Tableau 2.1. Valeurs des temps T_1 et T_2 pour le proton dans différents tissus, à un champ de 1 T. (Adapté de 239)

iii. ... et en T_2 ?

Un proton plongé dans un champ \vec{B}_0 (de l'ordre de quelques Teslas) voit en réalité un champ légèrement différent car chaque proton du voisinage crée un champ additionnel de 1 μ T environ. Chaque proton voit ainsi un champ particulier lié à sa position dans

²³⁹ P. Allisy-Roberts & J. R. Williams. Farr's physics for medical imaging. Saunders Ltd.2007.ISBN 978-0-7020-2844-1.

l'espace. Cette hétérogénéité, bien que minime, va progressivement entraîner une décohérence de la précession des moments magnétiques, aboutissant à une disparition de l'aimantation transverse. Les tissus dans lesquels les variations spatiales de champ magnétique sont les plus importantes sont donc ceux pour lesquels T_2 est le plus court, ils apparaîtront sombres. C'est le cas des solides ou macromolécules dans lesquels les atomes sont fixes. Ainsi la décohérence est rapide dans les os, les dents, les tendons et les calculs. En revanche elle est bien plus lente dans l'eau, l'urine, les liquides amniotique et céphalo-rachidien ou tout autre solution aqueuse (Tableau 2.1). Dans ce dernier cas, cela signifie que les moments magnétiques de spin effectuent environ quelques dizaines de millions de précessions de Larmor avant de perdre leur cohérence!²³⁵ Ces tissus apparaîtront donc en hypersignal (Figure 2.4).

L'IRM utilise en réalité des protocoles, appelés "séquences", permettant de différencier les tissus et d'arriver à réaliser un diagnostic.²⁴⁰ Ces séquences sont très nombreuses et il serait fastidieux de les décrire ici. Lorsqu'elles ne permettent pas de conclure avec certitude, les radiologues peuvent utiliser des produits de contraste qui vont s'accumuler dans une zone spécifique et y modifier la relaxation, permettant parfois d'établir un diagnostic.^{241,242}



Figure 2.4. Coupes transverses du foie vu en IRM avec différentes séquences. On peut observer un adénome hépatocellulaire fibrosé (longue flèche noire ou blanche) à côté de la vésicule biliaire (indiquée par un triangle blanc) en séquence pondérée en T_2 (a), en T_1 (b) ou en T_1 avec opposition de phase (c). L'adénome est hypointense en T_2 et T_1 (a et b, respectivement) et difficilement distinguable tandis qu'une chute importante de son contraste est observée en T_1 avec opposition de phase (c), permettant une meilleure caractérisation. La vésicule biliaire se voit bien en hypersignal en T_2 (a). (Adapté de 240)

c) Les agents de contraste

Comme montré sur la Figure 2.4, l'IRM produit parfois des images trop peu contrastées pour pouvoir distinguer différents tissus. Sa sensibilité peut être augmentée en utilisant des substances modifiant la relaxation dans un tissu ciblé et le signal obtenu (le contraste), le rendant ainsi plus facilement observable. On peut distinguer deux catégories d'agents de contraste : ceux accélérant la relaxation longitudinale (entraînant principalement une diminution de T_1) et ceux perturbant la relaxation transverse (diminuant T_2). Pour caractériser un agent de contraste, on précise que c'est un agent de contraste positif ou négatif, selon qu'il réduit T_1 ou T_2 , respectivement.

²⁴⁰ J. Belghiti et al. Diagnosis and management of solid benign liver lesions. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014, 11, 737.

²⁴¹ S. N. Gandhi et al. MR contrast agents for liver imaging: what, when, how. Radiographics. 2006, 26 (6), 1621.

²⁴² H. Shokrollahi. Contrast agents for MRI. Mater. Sci. Eng. C Mater. 2013, 33, 4485.

Les agents de contraste sont caractérisés par des grandeurs appelées relaxivités. La relaxivité, notée r_i ($i = 1$ ou 2), se calcule en mesurant les temps T_i de solutions de ces agents. On définit alors les taux de relaxation magnétique nucléaire longitudinal (R_1) et transverse (R_2) (voir équations ci-dessous). Les valeurs des relaxivités r_i sont ensuite calculées selon la formule suivante (R_{i0} représente le taux de relaxation endogène du dispersant utilisé, $[X]$ est la concentration en agent actif) :

$$R_i = \frac{1}{T_i} ; r_i = \frac{R_i - R_{i0}}{[X]}$$

Les taux de relaxation s'expriment en s^{-1} et les relaxivités s'expriment par mmol.L^{-1} d'agent par seconde ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Le rapport $\frac{r_2}{r_1}$ donne une information sur la capacité de la substance considérée à modifier plutôt T_1 ou plutôt T_2 , c'est à dire son caractère d'agent de contraste positif ou négatif. Des exemples d'utilisation de ces agents de contraste en nanosciences sont donnés dans le chapitre B de cette partie, ci-dessous.

B. APPLICATIONS EN NANOTECHNOLOGIES

B

De manière similaire à l'imagerie optique, il existe des molécules et des nanoparticules pouvant être utilisées en IRM. En optique, les substances utilisées sont responsables du signal de luminescence mesuré. Dans le cas de l'IRM, les substances présentées ci-dessous modifient le temps de relaxation des protons contenus dans les tissus observés. Sur les images obtenues, le contraste va être différent selon que cette substance est présente ou non dans le tissu. Pour cette raison, ces substances sont appelées des produits ou agents de contraste.

1) Les agents de contraste positif

Les substances réduisant T_1 sont paramagnétiques. Il s'agit notamment de métaux de transition et de lanthanides avec de nombreux électrons non appariés dans leurs orbitales de valence.²⁴³ Le tableau 3.2 cite les éléments ayant les moments magnétiques (exprimés en magnéton de Bohr) les plus importants.

	Ion	Configuration électronique		Moment magnétique
		3d : - - - - -	4f : - - - - -	
Métaux de transition	²⁴ Cr ³⁺	↑ ↑ ↑ - -		3,88
	²⁵ Mn ²⁺	↑ ↑ ↑ ↑ ↑		5,92
	²⁶ Fe ³⁺	↑ ↑ ↑ ↑ ↑		5,92
Lanthanides trivalents	⁶³ Eu ³⁺		↑ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	3,4
	⁶⁴ Gd ³⁺		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	7,94
	⁶⁶ Dy ³⁺		↑ ↓ ↑ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	10,65

Tableau 2.2. Configurations électroniques et moments magnétiques de quelques ions paramagnétiques. (Adapté de 243)

D'autres métaux de transition ont des électrons non appariés, mais pour qu'un élément réduise efficacement T_1 , il faut que l'inverse du temps de relaxation de ses spins électroniques coïncide avec la fréquence de Larmor du proton (dans le cas de la RMN du proton).²⁴³ Cette condition est remplie pour Mn²⁺, Fe³⁺ et Gd³⁺. Cependant il n'est pas possible d'utiliser ces ions libres en solution. Ceux-ci peuvent être utilisés sous une forme ionique au sein de complexes moléculaires, ou être incorporés à des nanoparticules.

a) Les complexes ioniques

L'ion le plus utilisé comme agent de contraste positif est le Gd³⁺, sous la forme de complexe. Deux familles de produits sont aujourd'hui autorisées en clinique : les complexes linéaires (Gd-DTPA par exemple) et les complexes macrocycliques (comme le Gd-DOTA). Il y a cependant des risques non négligeables chez les insuffisants rénaux qui peuvent mettre plus de temps à éliminer ces produits que la population moyenne.²⁴⁴ Les agents de contraste positif basés sur le gadolinium et utilisés en clinique ont des

²⁴³ H. B. Na et al. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. Adv. Mater. 2009, 21, 2133.

²⁴⁴ J.-P. Goullé et al. MRI gadolinium-based contrast agents. Radiologist beware! Ann. Pharm. Fr. 2009, 67, 335.

relaxivités r_1 qui vont de 4,2 à 7,3 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et r_2 qui vont de 6,7 à 9,1 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, pour le Dotarem et le Primovist, respectivement.²⁴⁵ Le milieu et le champ magnétique ont une influence importante sur les valeurs obtenues²⁴⁵ : ces valeurs correspondent à des mesures réalisées dans le sang à 37°C et à un champ de 1,5 T. Ces agents de contraste peuvent être utilisés pour visualiser les zones du cerveau lésées lors d'un accident vasculaire cérébral (Figure 2.5.a et b).

En recherche préclinique, des sels de manganèse (MnCl_2) permettent d'augmenter le contraste d'images par résonance magnétique du cerveau car les ions Mn^{2+} pénètrent les neurones par les canaux calciques (Figure 2.5.c, d, e et f).^{246,247} Mais ces ions peuvent provoquer une insuffisance hépatique et sont toxiques pour le coeur, ce qui empêche leur utilisation en clinique.²⁴³

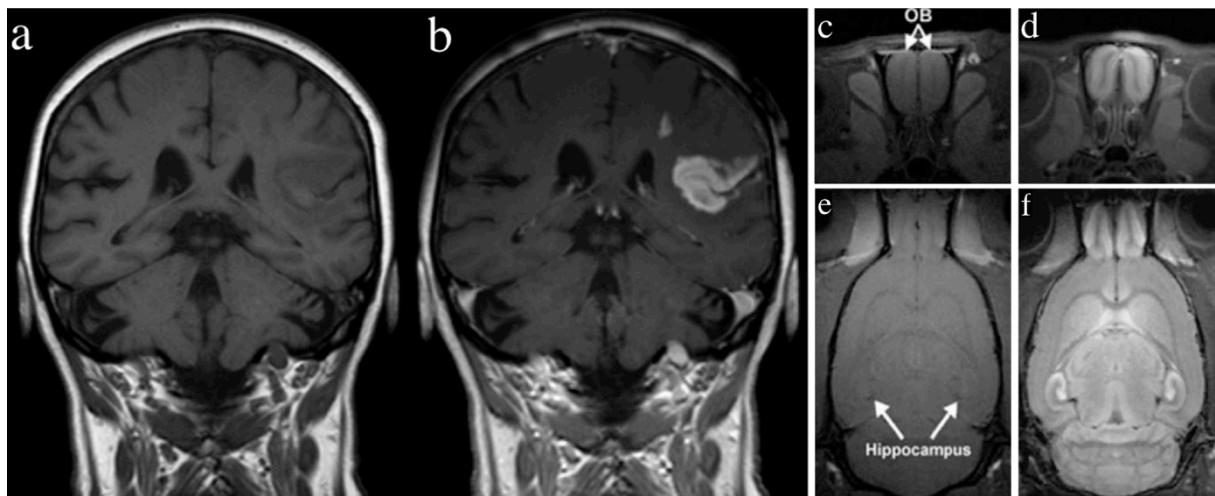


Figure 2.5. Coupes IRM de cerveau pondérées en T_1 , en l'absence (a, c, e) ou présence (b, d, f) d'agent de contraste positif. a,b) Coupes coronales d'un patient ayant eu un accident vasculaire cérébral avant (a) et après (b) injection d'un complexe de gadolinium. c-f) Coupes de cerveau de rats avant (a,c) et après (b,d) injection de MnCl_2 . a-b) Coupes coronales réalisées au niveau du bulbe olfactif (OB). c-d) Coupes transverses permettant notamment d'observer l'hippocampe. (Adapté de 247)

Les sels de manganèse et les complexes de gadolinium ne sont pas des nanoparticules, et il n'existe pas d'agent de contraste positif nanoparticulaire utilisé en clinique. Les complexes de gadolinium ont des désavantages liés à leurs caractères moléculaires. Ils possèdent une faible sensibilité et sont rapidement excrétés par les reins. On retrouve ici la même problématique que celle présentée pour les fluorophores, et les solutions sont similaires. Trois catégories peuvent être distinguées : les nanoparticules arborant des complexes de gadolinium, les nanoparticules de gadolinium et les nanoparticules de manganèse.²⁴⁸

²⁴⁵ M. Rohrer et al. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest. Radiol.* 2005, 40 (11), 715.

²⁴⁶ Y.-J. Lin & A. P. Koretsky. Manganese ion enhances T_1 -weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn. Reson. Med.* 1997, 38 (3), 378.

²⁴⁷ C. A. Massaad & R. G. Pautler. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Methods Mol. Biol.* 2011, 711, 145.

²⁴⁸ D. Zhu et al. Nanoparticle-based systems for T_1 -weighted magnetic resonance imaging contrast agents. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 10591.

b) Les nanoparticules

Les complexes de gadolinium ont été incorporés à des dendrimères,^{249, 250} des nanoparticules polymériques,^{251,252} des liposomes,²⁵³ des nanotubes de carbone²⁵⁴ ou des nanoparticules inorganiques (nanoparticules d'or²⁵⁵ ou de silice²⁵⁶) pour être utilisés comme agents de contraste positif *in vivo*. Cela permet d'augmenter le signal perçu en IRM et d'allonger le temps de persistance dans l'organisme, mais aussi éventuellement de diminuer la toxicité car la dose à injecter est moindre, et tout le produit de contraste peut se concentrer efficacement dans la zone d'intérêt si la surface de la nanoparticule est fonctionnalisée avec des ligands de ciblage (Figure 2. 6).

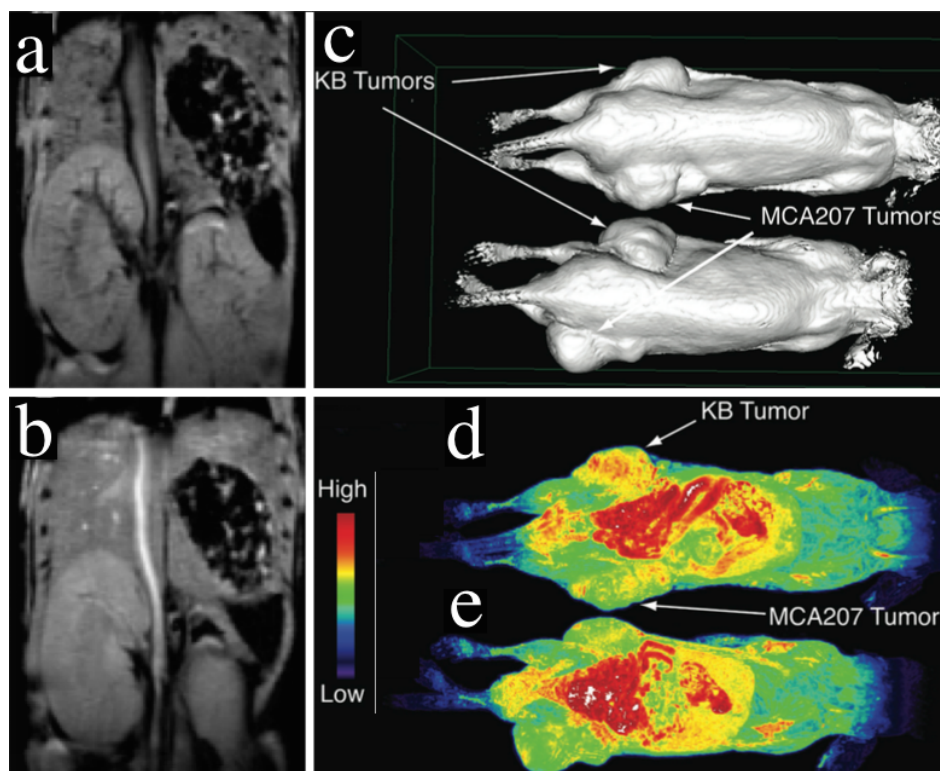


Figure 2.6. IRM en présence de nanoparticules contenant des complexes de gadolinium, pondération T₁. a-b) Coupes transverses d'abdomen de souris avant (a) et après (b) injection de nanoparticules de silices fonctionnalisées avec des complexes Gd-DTTA. On peut observer l'augmentation du contraste de l'aorte. c-e) Image en relief (c) et coupes IRM transverses (d,e) d'abdomen de souris portant deux tumeurs différentes, dont une surexprime le récepteur de l'acide folique (KB). Après injection de dendrimères portant des complexes Gd-DOTA et fonctionnalisées avec (d) ou sans (e) acide folique, on observe une accumulation et un ciblage modifié des tumeurs. (Adapté de 256 et 249)

²⁴⁹ S. D. Swanson et al. Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int. J. Nanomedicine*. 2008, 3 (2), 201.

²⁵⁰ Z. Cheng et al. Gadolinium-conjugated dendrimer nanoclusters as a tumor-targeted T₁ magnetic resonance imaging contrast agent. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 346.

²⁵¹ G. Ratzinger et al. Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents. *Biomaterials*. 2010, 31, 8716.

²⁵² G. Liang et al. Ultrasmall gadolinium hydrated carbonate nanoparticle: an advanced T₁ MRI contrast agent with large longitudinal relaxivity. *J. Mater. Chem. B*. 2013, 1, 629.

²⁵³ S. Erdogan et al. Enhanced tumor MR imaging with gadolinium-loaded polychelating polymer-containing tumor-targeted liposomes. *J. Magn. Reson. Imaging*. 2008, 27, 574.

²⁵⁴ C. Richard et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic Gd³⁺ chelates: toward powerful T₁ and T₂ MRI contrast agents. *Nano Lett.* 2008, 8 (1), 232.

²⁵⁵ J.-A. Park et al. Gold nanoparticles functionalized by gadolinium-DTPA conjugate of cysteine as a multimodal bioimaging agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 2287.

²⁵⁶ K. M. L. Taylor et al. Mesoporous silica nanospheres as highly efficient MRI contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 2154.

Les nanoparticules basées sur le gadolinium sont nombreuses (Gd_2O_3 , $Gd_2O(CO_3)_2 \cdot H_2O$, GdF_3 , $GdPO_4$, etc)²⁵⁷ et ont généralement des propriétés plus intéressantes que les complexes de gadolinium. Certaines nanoparticules de Gd_2O_3 ont une relaxivité r_1 de $9,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, supérieure à celle des complexes de gadolinium.²⁵⁸ Il semble que la relaxivité de ces nanoparticules dépende plus de leur taille que de leur forme et de leur composition. Le diamètre qui permet d'obtenir la relaxivité maximale semble être situé entre 1 et 2,5 nm.^{257,259}

L'équipe de Hyeon a aussi développé des nanoparticules d'oxyde de manganèse comme agents de contraste positif.²⁶⁰ Après fonctionnalisation de ces nanoparticules, ces nanoparticules ont montré une accumulation ciblée dans une tumeur cérébrale et une meilleure délimitation de ses contours (Figure 2.7).²⁶⁰

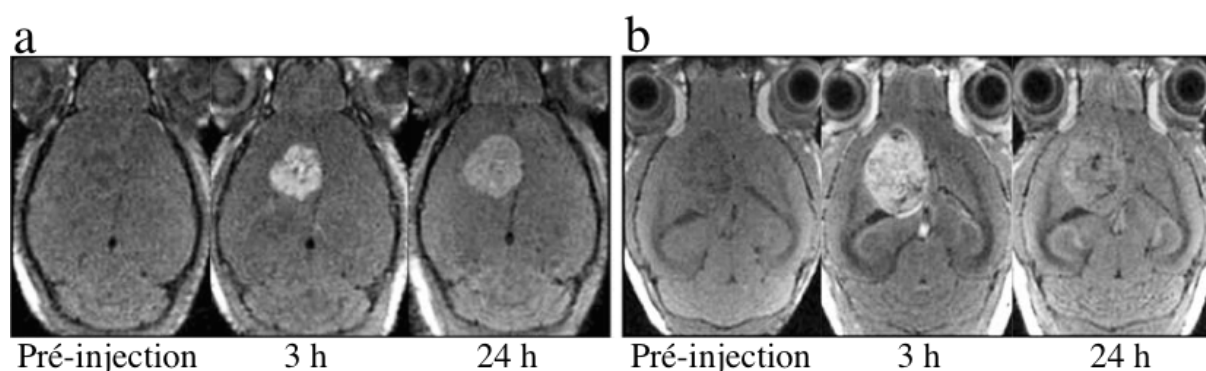


Figure 2.7. Coupes IRM transverses de cerveaux de souris, pondération T_1 . Images réalisées avant et après injection de nanoparticules de MnO fonctionnalisées avec (a) ou sans (b) hercceptine, un anticorps monoclonal du récepteur HER surexprimé par des cellules de cancer du sein métastatique. (Adapté de 260)

Enfin, on peut citer certaines nanoparticules d'oxyde de fer (IONP) comme agents de contraste positif. Cela nécessite de bien contrôler la taille et le recouvrement de ces nanoparticules.²⁵⁷ De plus, cet effet T_1 semble apparaître lorsque les nanoparticules d'oxyde de fer sont présentes à faible concentration dans le tissu observé.²⁶¹ Récemment, l'équipe de Hyeon a montré l'influence de la taille sur la relaxivité r_1 en synthétisant des nanoparticules de différentes tailles avec une haute monodispersité.²⁶² Un suivi IRM pondéré en T_1 après injection de ces nanoparticules permet d'observer le réseau vasculaire d'un rat en hypersignal (Figure 2.8).

²⁵⁷ F. Hu & Y. S. Zhao. Inorganic nanoparticle-based T_1 and T_1/T_2 magnetic resonance contrast probes. *Nanoscale*. 2012, 4, 6235.

²⁵⁸ J. Y. Park et al. Paramagnetic ultrasmall gadolinium oxide nanoparticles as advanced T_1 MRI contrast agent: account for large longitudinal relaxivity, optimal particle diameter, and *in vivo* T_1 MR images. *ACS Nano*. 2009, 3, 3663.

²⁵⁹ A. T. M. Anishur Rahman et al. Gd_2O_3 nanoparticles: size-dependent nuclear magnetic resonance. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2013, 8 (1), 92.

²⁶⁰ H. B. Na et al. Development of a T_1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5397.

²⁶¹ C. Chambon et al. Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Magn. Reson. Imaging*. 1993, 11 (4), 509.

²⁶² B. H. Kim et al. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T_1 magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12624.

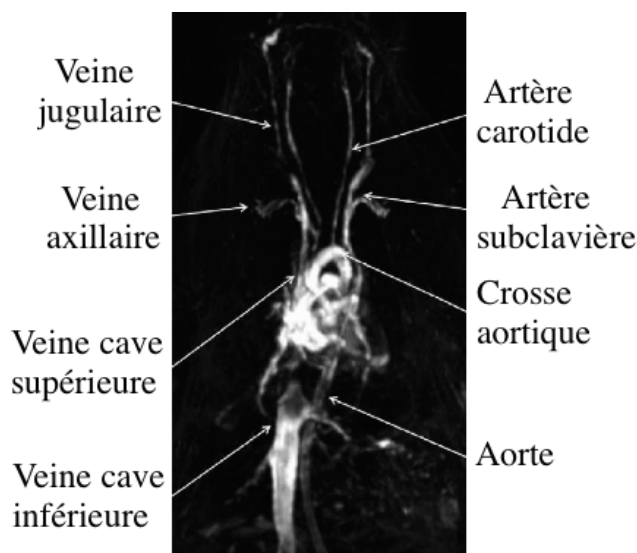


Figure 2.8. Observation de la vascularisation d'un rat en IRM pondérée en T₁ après injection de nanoparticules d'oxyde de fer. (Adapté de 262)

2) Les agents de contraste négatif

A l'inverse, les substances actives en T₂ sont appelées agents de contraste négatif car ils ont tendance à assombrir les zones où ils s'accumulent lorsqu'on observe en pondération T₂.

a) Les oxydes de fer

Ce sont des substances superparamagnétiques telles que les IONP. Celles-ci ont apparemment l'avantage de ne pas présenter de toxicité *in vivo*. En effet, le fer est un élément très bien toléré et métabolisé par l'organisme. Des IONP ont montré leur capacité à cibler des tumeurs après fonctionnalisation dans de nombreux modèles différents.²⁶³ Des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de dextran (Ferumoxtran-10, Combidex) sont autorisées en clinique pour cibler les ganglions lymphatiques atteints par les métastases, notamment pour des cancers de la prostate.²⁶⁴ Les agents de contraste négatif utilisés en clinique sont des IONP ayant des valeurs de r_1 de 7,0 et 8,0 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et des r_2 de 66 et 77 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, pour le Feridex et le Resovist, respectivement. Ces mesures ont aussi été réalisées dans le sang à 37°C et à 1,5 T.²⁴⁵ Ces IONP peuvent être fonctionnalisées pour cibler des tumeurs^{265, 266} et caractériser leurs réseaux vasculaires.^{267, 268}

²⁶³ X.-H. Peng et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int. J. Nanomed.* 2008, 3 (3), 311.

²⁶⁴ M. G. Harisinghani et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 2491.

²⁶⁵ Y.-M. Huh et al. *In vivo* magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12387.

²⁶⁶ C. Sun et al. *In vivo* MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobe. *Small.* 2008, 4 (3), 372.

²⁶⁷ G. R. Reddy et al. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12 (22), 6677.

Des nanoparticules dérivées d'IONP ont été optimisées afin d'obtenir une relaxivité r_2 maximale. Ces nanoparticules ont pour composition FeFe_2O_4 , CoFe_2O_4 et NiFe_2O_4 et les r_2 respectifs s'élèvent à 218, 172 et 152 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à 1,5 T.²⁶⁹ Pour une même composition, des nanoparticules de 12 nm ont un r_2 supérieur à celles de 9 et 6 nm. Lorsque ces nanoparticules sont fonctionnalisées avec un ligand du récepteur HER, elles permettent de cibler efficacement des tumeurs et de les visualiser en IRM bien plus efficacement qu'en utilisant les IONP initiales.

Les meilleurs agents T_2 ont des relaxivités r_2 approchant 300 $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$.^{270,271} L'équipe de Hyeon travaille aujourd'hui sur des nanocubes d'oxyde de fer ferrimagnétiques (FION) de 58 nm, présentant des relaxivités r_2 de 324 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un champ de 1,5 T.²⁷² Récemment, la même équipe a optimisé ces FION pour obtenir des propriétés prometteuses : un r_2 de 761 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ dans un champ de 3 T pour une taille de 22 nm,²⁷³ permettant d'observer des tumeurs avec une grande précision. On peut aussi remarquer que de plus en plus de nanoparticules hybrides développées aujourd'hui possèdent des capacités de contraste en T_1 et en T_2 (Figure 2.9).^{248,274,275}

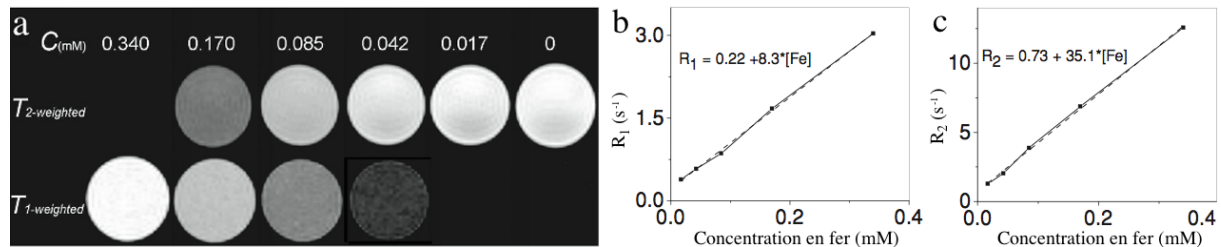


Figure 2.9. Caractérisation d'agents hybrides de contraste positif et négatif. a) Images IRM pondérées en T_1 (bas) et T_2 (haut) de solutions de très petites nanoparticules (3,3 nm) d'oxyde de fer magnétiques. b, c) Courbes de relaxation de ces particules montrant leur influence sur le T_1 et le T_2 . (Adapté de 275)

b) Les dérivés du Dysprosium

Le dysprosium représente aussi un agent de contraste négatif potentiel. Il a déjà été utilisé *in vivo* sous la forme de complexes afin d'observer la perfusion de zones ischémiques du cerveau^{276,277} ou des blessures du myocarde chez le cochon.²⁷⁸ Plus

²⁶⁸ C. Zhang et al. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007, 67 (4), 1555.

²⁶⁹ J.-H. Lee et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* 2007, 13 (1), 95.

²⁷⁰ Y. S. Song & J. H. Ku. Monitoring transplanted human mesenchymal stem cells in rat and rabbit bladders using molecular magnetic resonance imaging. *Neurourol. Urodyn.* 2007, 26 (4), 584.

²⁷¹ M. Babic et al. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 740.

²⁷² N. Lee et al. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011, 108, 2662.

²⁷³ N. Lee et al. Water-dispersible ferrimagnetic iron oxide nanocubes with extremely high r_2 relaxivity for highly sensitive *in vivo* MRI of tumors. *Nano Lett.* 2012, 12, 3127.

²⁷⁴ E. S. Choi et al. Water-soluble ultra-small manganese oxide surface doped gadolinium oxide ($\text{Gd}_2\text{O}_3@MnO$) nanoparticles for MRI contrast agent. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010, 4555.

²⁷⁵ Z. Li et al. Ultrasmall water-soluble and biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles as positive and negative dual contrast agents. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22, 2387.

²⁷⁶ E. C. Unger et al. Contrast agents for cerebral perfusion MR imaging. *J. Magn. Reson. Imaging.* 1994, 4, 235.

récemment, des nanoparticules et nanobatonnets d'oxyde de dysprosium ont montré un potentiel comme agents de contraste négatif *in vivo*.²⁷⁹ Leurs différences de formes et de tailles (diamètres hydrodynamiques moyens de 6,5 et 349 nm, respectivement) entraînent une différence de biodistribution et on observe notamment une excrétion rénale des nanoparticules durant l'heure qui suit l'injection (Figure 2.10).

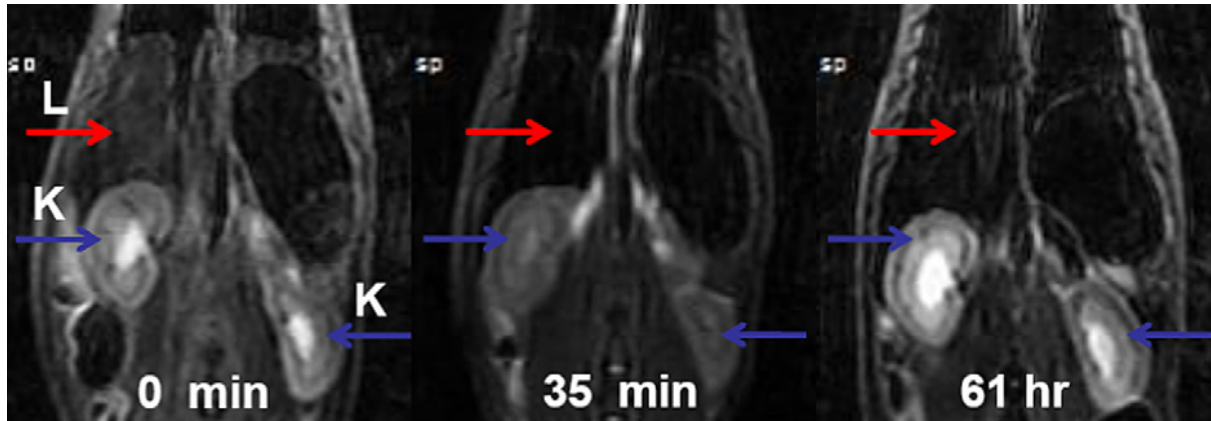


Figure 2.10. Coupes coronales d'IRM en pondération T2 avant et après injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de dysprosium. On observe une diminution du contraste des reins (K) et du foie (L) 35 min après injection. Après 61 h, les reins apparaissent à nouveau en hypersignal, tandis que le foie reste en hyposignal. Cela est dû à la différence des vitesses de clairance hépatique et rénale. (Adapté de 279)

3) Les nanoparticules magnétiques pour le suivi cellulaire

Tout comme les nanoparticules luminescence, il est possible d'utiliser des substances actives en IRM afin de réaliser du suivi cellulaire *in vivo*.

a) Le suivi cellulaire en T₁...

Des complexes de Gd³⁺ encapsulés dans des nanoparticules ont permis de suivre en IRM des cellules souches injectées dans l'hippocampe de rats après un accident ischémique.²⁸⁰ Des nanoparticules de Gd₂O₃ ont aussi permis de marquer des cellules *in vitro*.²⁸¹ Des oxydes de manganèse ont été utilisés comme agents de marquage cellulaire, pour suivre des cellules cancéreuses²⁸² ou des cellules souches mésenchymateuses (CSM) dérivées d'adipocytes²⁸³ après injection dans le cerveau de souris (Figure 2.11).

²⁷⁷ O. Haraldseth et al. Comparison of dysprosium DTPA BMA and superparamagnetic iron oxide particles as susceptibility contrast agents for perfusion imaging of regional cerebral ischemia in the rat. *J. Magn. Reson. Imaging*. 1996, 6 (5), 714.

²⁷⁸ M. Saeed et al. MR guidance of targeted injections into border and core of scarred myocardium in pigs. *Radiology*. 2006, 240 (2), 419.

²⁷⁹ K. Kattel et al. Paramagnetic dysprosium oxide nanoparticles and dysprosium hydroxide nanorods as T₂ MRI contrast agents. *Biomaterials*. 2012, 33, 3254.

²⁸⁰ M. Modo et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast-agent enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2002, 17, 803.

²⁸¹ A. Klasson et al. Positive MRI contrast enhancement in THP-1 cells with Gd₂O₃ nanoparticles. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2008, 3, 106.

²⁸² A. A. Gilad et al. MR Tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. *Magn. Reson. Med*. 2008, 60, 1.

²⁸³ T. Kim et al. Mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles as positive T₁ contrast agents for labeling and MRI tracking of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Am. Chem. Soc*. 2011, 133, 2955.

Suite à un marquage cellulaire par électroporation, ces cellules ont été suivies *in vivo* en IRM pendant 14 jours.

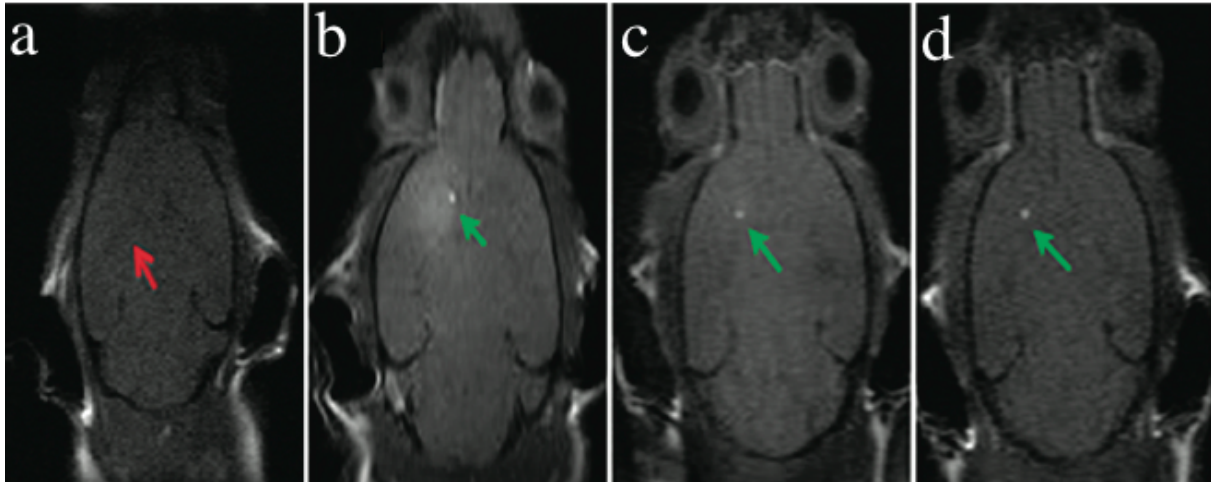


Figure 2.11. Suivi IRM de CSM injectées dans le cerveau de souris. a) CSM non marquées. b-d) CSM marquées avec des nanoparticules d'oxyde de manganèse recouvertes de silice mésoporeuse 1, 6 et 14 jours après injection (b, c et d, respectivement). (Adapté de 283)

b) ... et en T_2

Parmi les agents de contraste négatif utilisés pour marquer des cellules, on retrouve évidemment ceux déjà utilisés en imagerie clinique ou préclinique : les IONP. Dès les années 2000, l'équipe de Weissleder a fonctionnalisé des IONP avec le peptide Tat pour marquer des progéniteurs hématopoïétiques et neuraux.²⁸⁴ Ainsi, ils ont atteint des marquages de 10 à 30 pg de fer par cellule et pu les suivre *in vivo* en IRM. En 2001, Bulte et al ont développé des dendrimères magnétiques contenant une centaine d'atomes de fer pour marquer et suivre des progéniteurs d'oligodendrocyte ou neuronaux après injection intracérébrale pendant 45 jours.²⁸⁵ Plus récemment, plusieurs études ont réalisé le suivi de cellules marquées avec des IONP *in vivo*.^{286,287,288} Grâce à leur r_2 élevé, les FION de l'équipe d'Hyeon permettent d'obtenir un signal plus important qu'avec les IONP pour une même concentration en fer et de suivre des îlots pancréatiques de 3000 cellules marquées pendant 150 jours (Figure 2.12) !²⁷²

²⁸⁴ M. Lewin et al. TAT peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow *in vivo* tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 410.

²⁸⁵ J. W. M. Bulte et al. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and *in vivo* tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 1141.

²⁸⁶ C. Bos et al. *In vivo* MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology.* 2004, 233, 781.

²⁸⁷ J. Xie et al. Human serum albumin coated iron oxide nanoparticles for efficient cell labeling. *Chem. Commun.* 2010, 46, 433.

²⁸⁸ K. Andreas et al. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials.* 2012, 33, 4515.

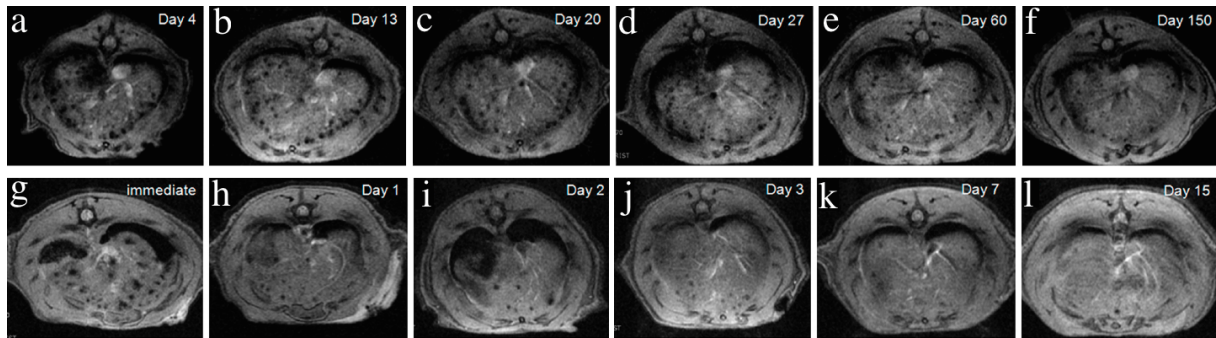


Figure 2.12. Suivi d'îlots de Langerhans injectés par la veine porte dans le foie de rats. Les 3000 îlots injectés ont le même génome (îlots syngéniques) (a-f) ou un autre génome (îlots allogéniques) (g-l) que les rats recevant les injections. Cela permet d'observer leur temps de survie dans le foie de rats. Des coupes IRM permettent d'observer ces îlots 4, 13, 20, 27, 60 et 150 jours après injection (a, b, c, d, e et f, respectivement) lorsque ceux-ci sont syngéniques au rat. En revanche, lorsque ces îlots sont allogéniques, on voit que des coupes IRM réalisées à 0, 1, 2, 3, 7 et 15 jours (g, h, i, j, k et l, respectivement) montrent leur disparition rapide. Cette différence est assimilée à un rejet de greffe dans ce dernier cas. (Adapté de 272)

Des lymphocytes ont aussi été marqués avec des IONP par Pierre Smirnov et al afin de cibler des tumeurs.^{289, 290} Dans le premier cas, l'injection intraveineuse de 3.10^6 lymphocytes contenant en moyenne 1,3 pg de fer à des souris portant une tumeur sous-cutanée a permis d'observer en IRM leur accumulation initiale dans la rate, puis un transfert progressif dans la tumeur pendant 72 h (Figure 2.13.a à f).²⁸⁹ Dans le second cas, une expérience similaire et l'utilisation d'une antenne haute résolution a permis de détecter des lymphocytes uniques infiltrés dans une tumeur chez la souris (Figure 2.13.g et h).²⁹⁰

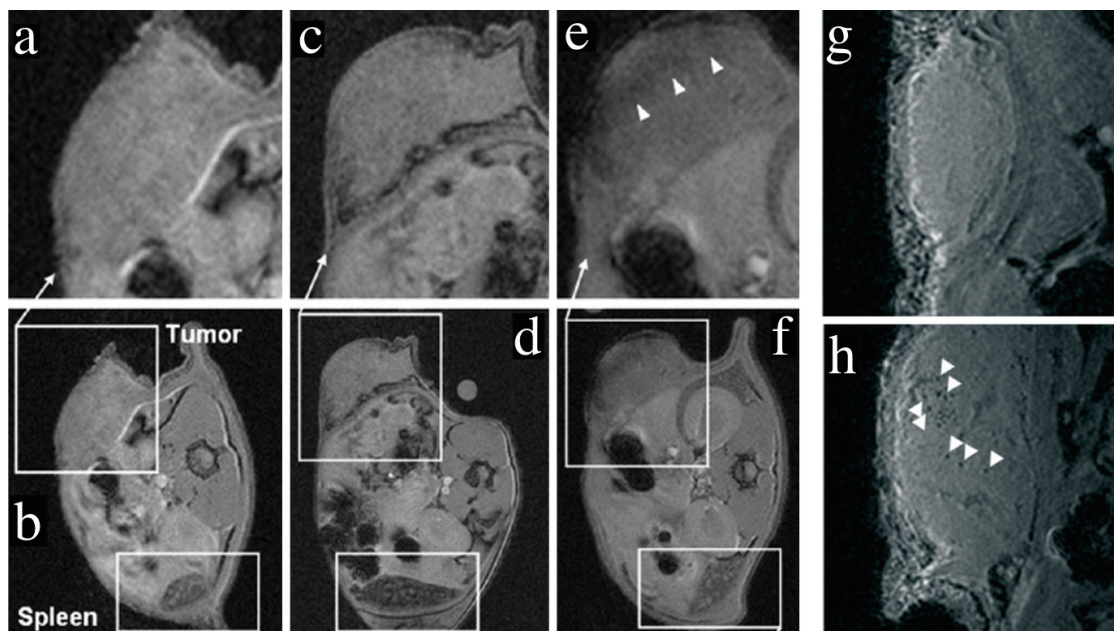


Figure 2.13. Observation en IRM (pondération T₂) de l'infiltration de lymphocytes marqués avec des IONP dans des tumeurs chez la souris. a-f Coupes transverses permettant d'observer l'évolution du contraste de tumeurs ("Tumor" et carrés blancs, b, d, f) et de rates ("Spleen" et rectangles blancs, b, d, f) avant (a et b) et après 24 (c et d) et 72 h (e et f) injection intraveineuse de 3.10^6 lymphocytes marqués avec des IONP. a, c, e Coupes transverses des tumeurs. g, h Observations IRM de tumeurs avant (g) et 48 h après (h) injection de 3.10^6 lymphocytes marqués avec des IONP. h) Des zones sombres ponctuelles peuvent être observées, correspondant à des lymphocytes uniques. (Adapté de 289 et 290)

²⁸⁹ P. Smirnov et al. *In vivo* cellular imaging of lymphocyte trafficking by MRI: a tumor model approach to cell-based anticancer therapy. *Magn. Reson. Med.* 2006, 56, 498.

²⁹⁰ P. Smirnov et al. *In vivo* single cell detection of tumor-infiltrating lymphocytes with a clinical 1.5 Tesla MRI system. *Magn. Reson. Med.* 2008, 60, 1292.

Les nanoparticules magnétiques, contrairement aux outils basés sur la modalité optique, ont été décrites maintes fois comme des marqueurs cellulaires permettant une localisation spatiale très précise. Cependant, L'IRM a le défaut de ne pas pouvoir donner d'information en temps réel au sein d'une zone spatiale étendue, ce que l'imagerie optique permet. Afin de réaliser un marquage cellulaire offrant la possibilité de suivre les cellules en temps réel et de pouvoir déterminer leur localisation avec précision, il est possible de coupler ces deux modalités en utilisant des nanoparticules luminescentes et magnétiques. On réalise alors ce qu'on appelle de l'imagerie multimodale. Des possibilités de multimodalité optique et IRM, ainsi que leurs applications pour le marquage et le suivi cellulaire sont présentées dans la dernière partie de l'introduction : "La multimodalité".

III. LA MULTIMODALITE

1) Principe général	p. 103
2) Les nanoparticules multimodales pour l'imagerie optique et l'IRM	p. 103
a) Association nanoparticules magnétiques et fluorophores	p. 103
b) Association nanoparticules luminescentes et gadolinium	p. 104
3) Les agents multimodaux pour le suivi cellulaire	p. 106
4) Les agents multimodaux pour la vectorisation cellulaire	p. 106

Cette dernière partie d'introduction se concentre sur les avancées récentes de la recherche en nanosciences, concernant le développement de nanoparticules multimodales pour faire de l'imagerie optique et IRM *in vivo*.

De nombreuses technologies d'imagerie médicale se sont fortement améliorées ces dernières décennies. Parmi celles-ci on peut notamment évoquer la tomodensitométrie (CT), l'IRM ou encore la TEP. Si elles présentent un intérêt important pour le diagnostic en clinique, elles ont aussi une utilité croissante en recherche fondamentale pour observer et comprendre des mécanismes biologiques à l'échelle cellulaire ou moléculaire *in vivo*. De plus, de nouveaux appareils d'imagerie combinant plusieurs de ces techniques commencent à voir le jour, en clinique comme en recherche (Figure 3.1).

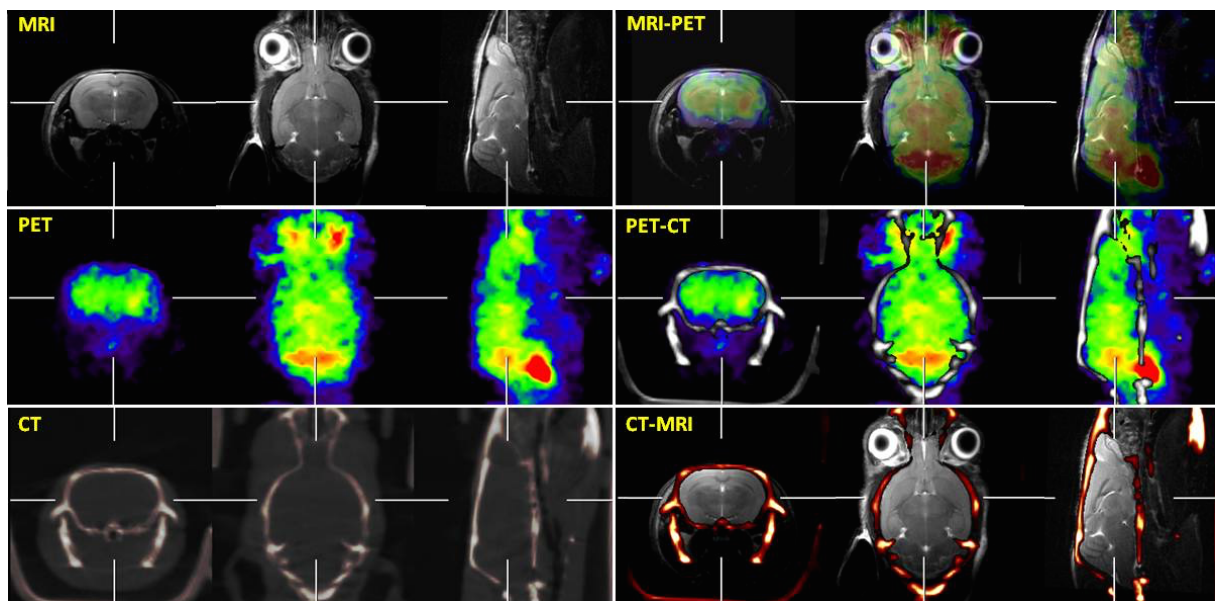


Figure 3.1. Co-enregistrement haute résolution de coupes transversales, coronales et sagittales en IRM (pondérée en T₂), TEP-scan au 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (¹⁸F-FDG) et CT-scan ainsi que les superpositions correspondantes, montrant l'activité métabolique du cerveau d'une souris. Ces images ont été réalisées par la plateforme d'imagerie du vivant (PIV) au PARCC.

L'association de plusieurs modalités permet de compenser les défauts de l'une avec les avantages d'une autre. Cela donne la possibilité de recueillir plus d'informations sur les phénomènes biologiques observés, ou facilite un suivi à différentes échelles spatiales et temporelles.

1) Principe général

Toute association entre plusieurs modalités d'imagerie permet de réaliser de l'imagerie dite multimodale. Cela permet de bénéficier des avantages de chacune de modalités utilisées. En effet, malgré l'amélioration des systèmes d'imagerie et des algorithmes permettant l'analyse des images, une modalité clinique isolée ne permet pas aujourd'hui d'obtenir des informations anatomiques, physiologiques et fonctionnelles précises.²⁹¹ En réponse à cette limite, de nombreux appareils associant plusieurs modalités voient le jour dans les services de radiologie hospitaliers (TEP/CT ou TEP/IRM). Il en est de même avec les nanoparticules développées en recherche préclinique. S'il existe des nanoparticules multimodales de toutes sortes, certaines associant jusqu'à quatre modalités différentes,²⁹² je vais me contenter de présenter ici les sondes permettant d'associer imagerie optique et IRM.

2) Les nanoparticules multimodales pour l'imagerie optique et l'IRM

On peut imaginer lier de manière covalente deux substances moléculaires, l'une active en IRM, l'autre en optique, pour réaliser de la bimodalité optique/IRM.²⁹³ Mais généralement, ce type d'association a été décrit en utilisant des nanoparticules comme cargos de ces substances. On peut citer des liposomes chargés avec des complexes de dysprosium et de la rhodamine,²⁹⁴ des nanoparticules polymériques contenant des complexes de gadolinium et des porphyrines,²⁹⁵ ou des nanoparticules de silice encapsulant des complexes de gadolinium et du vert d'indocyanine.²⁹⁶ Il est aussi possible de lier une nanoparticule avec une substance moléculaire ayant une activité dans une autre modalité. Par exemple des IONP avec un fluorophore ou une nanoparticule luminescente avec un complexe de gadolinium.

a) Association nanoparticules magnétiques et fluorophores

Des nanoparticules d'oxyde de fer, fonctionnalisées avec du PEG et du chitosan sur lesquels ont été greffées de la cyanine 5.5 et de la chlorotoxine, un peptide de 36 acides aminés issu du venin d'un scorpion, ont la capacité de se fixer à des cellules de tumeurs cérébrales chez la souris.^{297,298} Un autre exemple est celui de nanoparticules d'oxyde de

²⁹¹ W.-Y. Huang & J. J. Davis. Multimodality and nanoparticles in medical imaging. Dalton Trans. 2011, 40, 6087.

²⁹² Y. Sun et al. Core-shell lanthanide upconversion nanophosphors as four-modal probes for tumor angiogenesis imaging. ACS Nano. 2013, 7 (12), 11290.

²⁹³ E. Vucic et al. Well-defined, multifunctional nanostructures of a paramagnetic lipid and a lipopeptide for macrophage imaging. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 406.

²⁹⁴ D. D. Castelli et al. Evidence for *in vivo* macrophage mediated tumor uptake of paramagnetic/fluorescent liposomes. NMR Biomed. 2009, 22, 1084.

²⁹⁵ R. Kumar et al. Combined magnetic resonance and optical imaging of head and neck tumor xenografts using gadolinium-labelled phosphorescent polymeric nanomicelles. Head Neck Oncol. 2010, 2, 35.

²⁹⁶ P. Sharma et al. Gadolinium-doped silica nanoparticles encapsulating indocyanine green for near-infrared and magnetic resonance imaging. Small. 2012, 8 (18), 2856.

²⁹⁷ S. A. Lyons et al. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origins. GLIA. 2002, 39 (2), 162.

²⁹⁸ O. Veisheh et al. Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the blood-brain barrier. Cancer Res. 2009, 69 (15), 6200.

fer marquées à l'aide de cyanine 5.5 injectées à des rats porteurs de gliosarcomes. Ces particules vont s'accumuler passivement et spécifiquement dans la tumeur, permettant une chute du contraste des tissus cancéreux sur des images d'IRM pondérées en T₂ ainsi qu'une visualisation en fluorescence de la tumeur lors de l'ablation chirurgicale (Figure 3.2).²⁹⁹

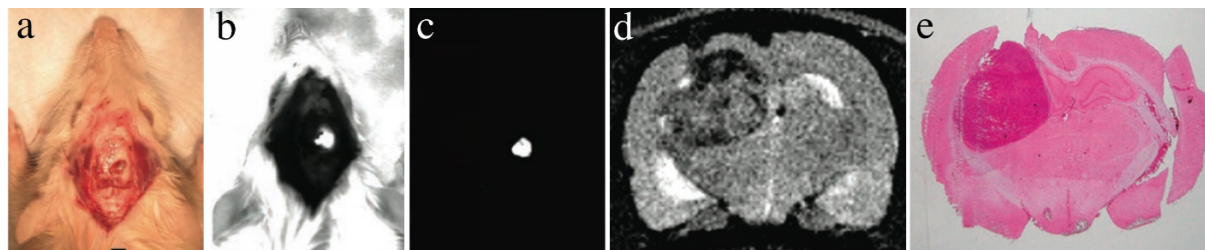


Figure 3.2. Délimitation d'un gliome 9L surexprimant la GFP après injection d'IONP marquées avec de la cyanine 5.5. Images intraopératives en lumière blanche (a) et en fluorescence pour observer la GFP (b) et la cyanine 5.5 (c). d) Coupe IRM pondérée en T₂ permettant de délimiter la tumeur avant opération. e) Coloration histologique à l'hématoxyline et l'éosine *ex vivo* montrant l'efficacité du marquage *in vivo* avec les IONP bimodales. (Adapté de 299)

On trouve aussi dans la littérature scientifique, des nanoparticules multimodales fabriquées en associant des perovskites magnétiques ($\text{La}_x\text{Sr}_{1-x}\text{MnO}_3$) à des fluorophores.^{300,301} Les nanoparticules d'oxyde de gadolinium peuvent aussi être transformées en sondes multimodales en les dopant à l'aide de terres rares³⁰² ou en les recouvrant de silice poreuse contenant un fluorophore comme l'a démontré l'équipe d'Olivier Tillement.³⁰³ Récemment, des propriétés luminescentes ont été ajoutées à des nanoparticules magnétiques de Dy_2O_3 , de $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3$ ou Gd_2O_3 en les dopant avec un lanthanide tel que le terbium.^{304,305,306}

b) Association nanoparticules luminescentes et gadolinium

Les nanoparticules multimodales synthétisées à partir de nanoparticules luminescentes le sont en suivant des voies similaires à celles utilisées dans le paragraphe précédent. Ainsi, des QD peuvent être associés au gadolinium par greffage de complexes de gadolinium en surface^{307,308} ou en les encapsulant dans des micelles de lipides

²⁹⁹ M. F. Kircher et al. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. *Cancer Res.* 2003, 63 (23), 8122.

³⁰⁰ M. Kacenska et al. Dual imaging probes for magnetic resonance imaging and fluorescence microscopy based on perovskite manganite nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 157.

³⁰¹ M. Kacenska et al. Fluorescent magnetic nanoparticles for cell labeling: flux synthesis of manganite particles and novel functionalization of silica shell. *J. Colloid Interface Sci.* 2015, 447, 97.

³⁰² R. Bazzi et al. Synthesis and properties of europium-based phosphors on the nanometer scale: Eu_2O_3 , $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}$, and $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}$. *J. Colloid Intef. Sci.* 2004, 273, 191.

³⁰³ J.-L. Bridot et al. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5076.

³⁰⁴ G. K. Das et al. Single phase $\text{Dy}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ nanocrystals as dual-modal contrast agent for high field magnetic resonance and optical imaging. *Chem. Mater.* 2011, 23, 2439.

³⁰⁵ Y. Wu et al. A new type of silica-coated $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3:\text{Tb}$ nanoparticle as a bifunctional agent for magnetic resonance imaging and fluorescent imaging. *Nanotechnology.* 2012, 23 (20), 205103.

³⁰⁶ F. Chen et al. Terbium-doped gadolinium oxide nanoparticles prepared by laser ablation in liquid for use as a fluorescence and magnetic resonance imaging dual-modal contrast agent. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 1189.

³⁰⁷ T. Jin et al. Gd^{3+} -functionalized near-infrared quantum dots for *in vivo* dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging. *Chem. Commun.* 2008, 44, 5764.

³⁰⁸ L. Prinzen et al. Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin A5-functionalized quantum dots. *Nano Lett.* 2007, 7 (1), 93.

paramagnétiques.³⁰⁹ Une fonctionnalisation de ces hybrides avec un peptide RGD permet de visualiser la vascularisation de tumeurs chez la souris.³¹⁰ Les NPLP peuvent aussi être dopées avec du gadolinium afin de leur conférer des propriétés de magnétisme (Figure 3.3).²⁰⁶ Les nanoparticules à upconversion sont souvent citées pour réaliser de l'imagerie bimodale. Cela peut-être réalisé en les dopant avec du gadolinium³¹¹ mais aussi en utilisant une composition contenant du gadolinium telle que NaGdF₄.¹⁹² La composition des vanadates (YVO₄:Eu) du LPMC peut aussi être modifiée (GdVO₄:Eu ou Gd_{0,6}Eu_{0,4}VO₄:Eu) pour donner des nanoparticules luminescentes ayant un effet T₁ plus important que le Dotarem commercial à 20 MHz.³¹² Ces stratégies de dopage ou d'utilisation d'un coeur possédant des capacités d'imagerie dans plusieurs modalités ont l'avantage de laisser libre la surface des nanoparticules. Contrairement aux nanoparticules recouvertes de complexes de gadolinium, ces particules peuvent être fonctionnalisées pour cibler des zones d'intérêt *in vivo*.

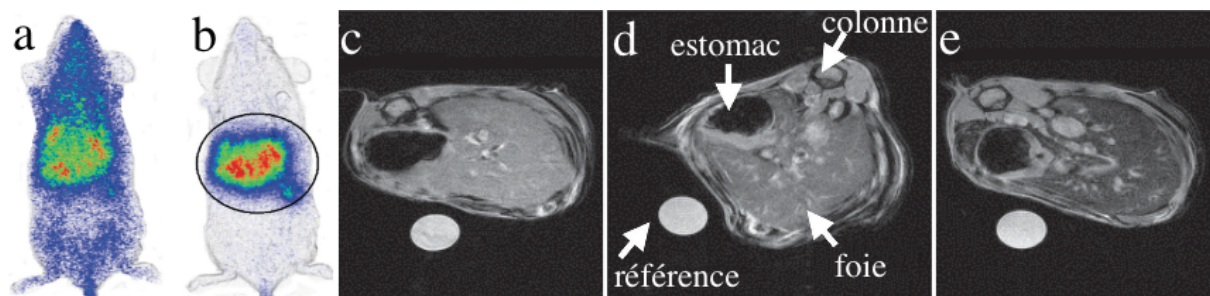


Figure 3.3. Suivi *in vivo* en luminescence (a,b) et IRM (d,e) de nanoparticules de ZGO dopées avec 2 ou 4 % de gadolinium. On peut observer l'accumulation des ZGO:Gd (4 %) dans le foie et la rate au cours du temps : 5 min (a) et 45 min (b) après injection intraveineuse. 1 h après injection de ZGO:Gd (2 ou 4 %) on peut observer une diminution significative du contraste du parenchyme hépatique (d et e, respectivement) par rapport à l'absence de ZGO:Gd (c) en IRM pondérée T₂*. (Adapté de 206)

Comme nous l'avons vu dans les premières parties de l'introduction, les nanoparticules sont des outils de choix pour marquer et suivre des cellules *in vivo*. Cependant, après injection de cellules marquées *in vivo*, l'imagerie optique ou l'IRM seule ne suffit pas à bien caractériser leur comportement. Ainsi, il est logique de vouloir utiliser des nanoparticules multimodales pour réaliser des expériences similaires.

Concernant les applications cellulaires de la multimodalité, je vais distinguer deux types de travaux :

- ceux concernant le suivi cellulaire, c'est à dire la caractérisation du comportement et de la biodistribution de cellules après leur injection *in vivo*,
- ceux présentant des expériences réalisées afin de tenter de contrôler cette biodistribution, je parlerai alors de vectorisation cellulaire *in vivo*.

³⁰⁹ W. J. M. Mulder et al. Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe. *Nano Lett.* 2006, 6 (1), 1.

³¹⁰ W. J. M. Mulder et al. Molecular imaging of tumor angiogenesis using $\alpha_v\text{-}\beta_3$ -integrin targeted multimodal quantum dots. *Angiogenesis.* 2009, 12, 17.

³¹¹ F. Chen et al. Gd³⁺-ion-doped upconversion nanoproboscopes: relaxivity mechanism probing and sensitivity optimization. *Adv. Funct. Mater.* 2013, 23, 298.

³¹² M. Abdesselem et al. Multifunctional rare-earth vanadate nanoparticles: luminescent labels, oxidant sensors, and MRI contrast agents. *ACS Nano.* 2014, 8 (11), 11126.

3) Les agents multimodaux pour le suivi cellulaire

Les nanoparticules associant plusieurs modalités et ayant été utilisées pour marquer des cellules sont assez nombreuses et variées. Ce sont principalement des IONP fluorescentes,^{313, 314} des CNT fonctionnalisés^{315, 316} ou encore des nanoparticules luminescentes et magnétiques basées sur des UCNPs.³¹⁷ Les premiers marquages multimodaux utilisant des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées avec un fluorophore ne permettaient pas le suivi *in vivo* en imagerie optique, mais seulement *in vitro*. Cela s'explique notamment par le fait que les fluorophores utilisés étaient la fluorescéine ou la rhodamine et que la quantité de fluorophore internalisée par les cellules était trop faible.^{318,319}

Les CNT fonctionnalisés constituent des nanoplateformes prometteuses afin de marquer des cellules en associant IRM et fluorescence.³¹⁵ Mais il n'y a pas de travail décrivant un suivi cellulaire *in vivo* avec de tels CNT. Les particules de Gd₂O₃:Eu³⁺ utilisées pour marquer des cellules souches n'ont pas montré la possibilité de suivi en luminescence *in vivo*.³²⁰ Cependant, si toutes les publications présentant une expérience de suivi cellulaire *in vivo* après un marquage avec des nanoparticules bimodales luminescentes et magnétiques réalisent des observations en IRM, aucune observation n'est faite en imagerie optique, à une exception près : une publication réalise à la fois de l'imagerie optique et de l'IRM, mais uniquement après injection sous-cutanée de CSM marquées par des IONP fonctionnalisées avec de la rhodamine B.³²¹ Dans tous ces travaux, la modalité optique n'est utilisée que pour confirmer *ex vivo* ce que l'IRM a observé *in vivo*. Il est nécessaire de préciser que cette remarque ne s'applique qu'aux publications réalisant du suivi cellulaire, car dès qu'il s'agit de vectorisation cellulaire, les deux modalités sont généralement utilisées *in vivo*.

4) Les agents multimodaux pour la vectorisation cellulaire

Le nombre de travaux réalisant de la vectorisation cellulaire *in vivo* est assez faible. Ce type d'expérience nécessite l'utilisation de nanoparticules magnétiques afin que les

³¹³ L. Wang et al. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(DL-lactic acid-co- α,β -malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials*. 2010, 31, 3502.

³¹⁴ O. Detante 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 Cell Transl. Med.* 2012, 1, 333.

³¹⁵ H. Gul et al. Magnetic carbon nanotube labelling for haematopoietic stem/progenitor cell tracking. *Nanotechnology*. 2010, 21, 155101.

³¹⁶ C. Wang et al. Protamine functionalized single-walled carbon nanotubes for stem cell labeling and *in vivo* Raman/magnetic resonance/photoacoustic triple-modal imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22, 2363.

³¹⁷ L. Cheng et al. Multifunctional upconversion nanoparticles for dual-modal imaging-guided stem cell therapy under remote magnetic control. *Adv. Funct. Mater.* 2013, 23, 272

³¹⁸ C.-W. Lu et al. Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling. *Nano Lett.* 2007, 7 (1), 149.

³¹⁹ Y. Wang et al. High MR sensitive fluorescent magnetite nanocluster for stem cell tracking in ischemic mouse brain. *Nanomed. Nanotechnol.* 2011, 7, 1009.

³²⁰ Z. Shi et al. Bifunctional Eu³⁺-doped Gd₂O₃ nanoparticles as a luminescent and T₁ contrast agent for stem cell labeling. *Contrast Media Mol. Imaging*. 2010, 5, 105.

³²¹ K.-S. Park et al. Characterization, *in vitro* cytotoxicity assessment and *in vivo* visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine*. 2010, 6 (2), 263.

cellules puissent être contrôlées avec un aimant. L'IRM est donc la première modalité utilisée pour évaluer la possibilité de vectoriser des cellules *in vivo*. En 2007, Claire Wilhelm et al ont montré qu'il était possible de modifier la biodistribution de progéniteurs endothéliaux injectés dans des implants sous-cutané de Matrigel à l'aide d'un aimant (Figure 3.4.a et b).³²² Cependant, le suivi n'a été réalisé qu'en IRM. Plus récemment, des cellules dérivées de cardiosphères ont été marquées avec des nanoparticules magnétiques et fluorescentes puis injectées par voie intracardiaque chez des rats avec ou sans aimant sur le myocarde.³²³ La quantification de la rétention des cellules au myocarde est réalisée en fluorescence mais seulement *ex vivo*. Celle-ci permet tout de même de montrer une augmentation significative à court terme ainsi qu'à moyen terme (24 h et 3 semaines) de la quantité de cellules retenues au myocarde (Figure 3.4.c, d, e et f).

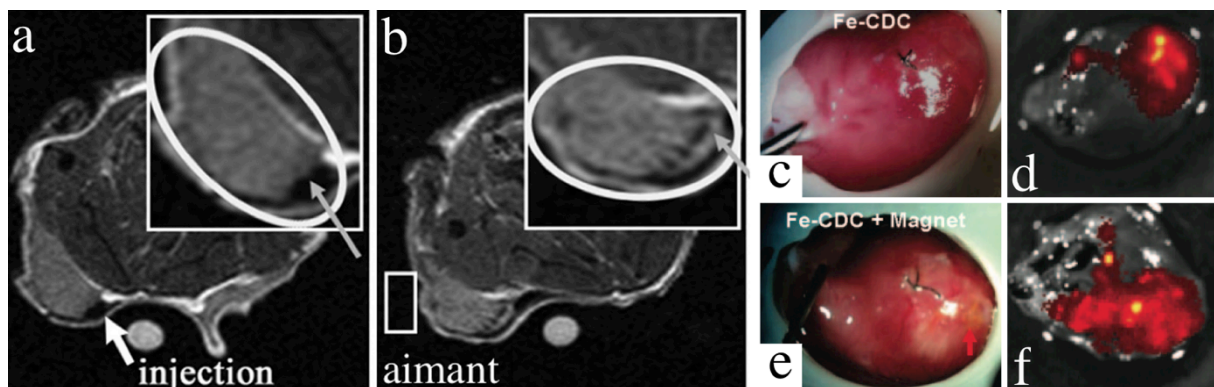


Figure 3.4. Vectorisation magnétique *in vivo* après injection dans un implant de Matrigel (a,b) ou dans le myocarde (c-f). a,b Coupes IRM en pondération T₂ montrant les progéniteurs endothéliaux marqués avec des IONP au moment de l'injection (a) et 18 h plus tard (b). Après injection, un aimant est apposé sur l'implant de Matrigel, du côté opposé à l'injection (rectangle blanc, b). b) L'insert montre une infiltration des cellules dans le Matrigel. c-f) Suivi *ex vivo* en fluorescence de cellules marquées avec des nanoparticules magnétiques fluorescentes retenues à proximité du site d'injection en l'absence (c, d) ou en présence (e, f) d'un aimant après 24 h. (Adapté de 322 et 323)

Un travail original de marquage d'érythrocytes avec des IONP fluorescentes a permis de les rendre manipulables à l'aide d'un aimant *in vitro* (Figure 3.5.a, b et c). Après injection intraveineuse, la biodistribution de ces érythrocytes est visualisée en IRM pondérée en T₂ par une chute du contraste du foie et de la rate, ainsi qu'en fluorescence à l'aide d'une technique de microscopie confocale adaptée à l'imagerie *in vivo*.³²⁴

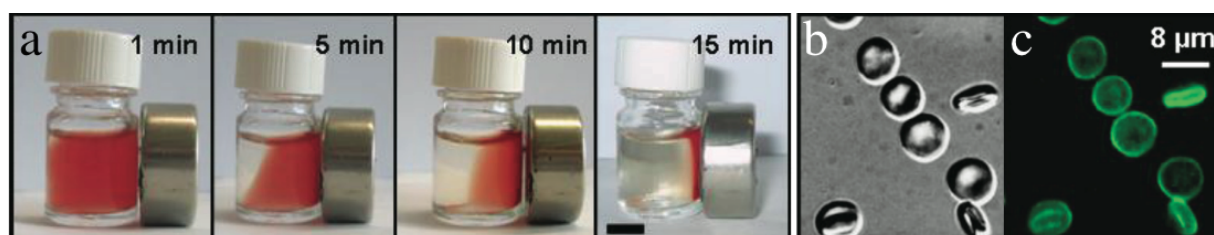


Figure 3.5. a) Des érythrocytes marqués avec des IONP sont fortement attirés par un aimant *in vitro*. b,c) Images de microscopie à contraste interférentiel (b) et de fluorescence des érythrocytes marqués. (Adapté de 324)

³²² C. Wilhelm et al. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells. *Biomaterials*. 2007, 28, 3797.

³²³ K. Cheng et al. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ. Res.* 2010, 106, 1570.

³²⁴ M. Laurencin et al. Human erythrocytes covered with magnetic core-shell nanoparticles for multimodal imaging. *Adv. Healthcare Mater.* 2013, 2, 1209.

Enfin, plus récemment, le suivi *in vivo* de la biodistribution globale lors d'une expérience de vectorisation de cellules marquées à l'aide de nanoparticules multimodales a été réalisé en imagerie optique. On peut envisager de réaliser cette expérience en injectant des cellules marquées par voie intraveineuse³²⁵ ou dans une cavité³²⁶ (vessie, cavité péritonéale) et en plaçant un aimant à proximité du lieu de l'injection afin d'observer une accumulation. Ces deux conditions ont déjà montré des résultats (Figure 3.6) mais le nombre de travaux portant sur le sujet est faible. Des CSM humaines marquées avec des IONP fluorescents ont pu être retenues dans la partie proximale de la queue de souris avec un aimant après avoir été injectées dans sa partie distale. Dans ce cas, la rétention des cellules à proximité de l'aimant est observable immédiatement, et on peut aussi constater une modification de la biodistribution des cellules dans le reste du corps. On voit notamment une baisse de la luminescence provenant des poumons lorsqu'un aimant a été placé à proximité de la queue, suggérant que les cellules retenues sont sous forme d'agrégats (Figure 3.6.a et b).³²⁵ Des particules à conversion ascendante (de quelques centaines de nanomètres) ont été recouvertes par des IONP afin de marquer des cellules, de les suivre *in vivo* en IRM et en luminescence et de les attirer à l'aide d'un aimant après injection dans la cavité péritonéale. Cette expérience de vectorisation a été réalisée sur une durée plus importante car l'observation des cellules à proximité de l'aimant est réalisée 6 h après injection (Figure 3.6.c, d, e et f).³²⁶

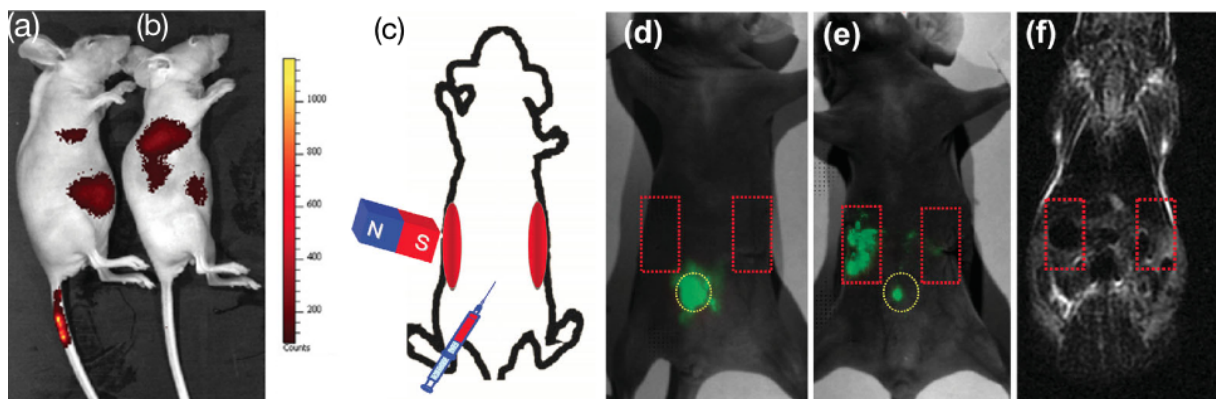


Figure 3.6. Suivi et vectorisation magnétique *in vivo* de cellules marquées. a,b) Des CSM humaines marquées avec des IONP fonctionnalisées avec un fluorophore ont été injectées dans la partie distale de la veine caudale de souris. Cette injection a été réalisée en présence (a) ou en l'absence (b) d'un aimant autour de la partie proximale de la queue, permettant une rétention des cellules marquées. c-f) Injection intrapéritonéale de 10^6 CSM murines marquées avec des nanoparticules bimodales UCNP/IONP. c) Représentation schématique de l'expérience de thérapie cellulaire réalisée : les cellules marquées sont injectées au milieu de la cavité péritonéale (d) tandis qu'un aimant est placé sur le flanc de la souris. 6 h après injection, une image de luminescence (e) ainsi qu'une coupe frontale IRM (pondération T₂) (f) sont réalisées, démontrant l'accumulation des cellules à proximité de l'aimant. (Adapté de 325 et 326)

De nombreux travaux ont aussi montré la possibilité d'utiliser certaines nanoparticules d'imagerie comme cargos pour délivrer de manière ciblée des agents à intérêt thérapeutique tels que des anticancéreux,^{72,205,327} des brins d'acide ribonucléique,^{328,329}

³²⁵ N. Landazuri et al. Magnetic targeting of human mesenchymal stem cells with internalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small*. 2013, 9 (23), 4017.

³²⁶ L. Cheng et al. Multifunctional upconversion nanoparticles for dual-modal imaging-guided stem cell therapy under remote magnetic control. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 23 (3), 272.

³²⁷ N. Z. Knezevic & J.-O. Durand. Targeted treatment of cancer with nanotherapeutics based on mesoporous silica nanoparticles. *ChemPlusChem*. 2015, 80, 26.

³²⁸ P. Keshawani et al. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. *Biomaterials*. 2012, 33, 7138.

³²⁹ R. Thomas et al. Magnetic iron oxide nanoparticles for multimodal imaging and therapy of cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 15910.

mais aussi pour faire de la photothérapie thermique ou dynamique.^{330,331} Lorsque les nanoparticules utilisées associent des propriétés de diagnostic avec des propriétés de thérapie, on appelle ce domaine émergent la théragnostic, mot valise associant thérapie et diagnostic. Parmi ces nanoparticules, on trouve de plus en plus souvent des propriétés de multimodalité.^{329,332}

³³⁰ A. K. A. Silva et al. Magnetic drug carriers: bright insights from light-responsive magnetic liposomes. *Nanomedicine (Lond.)*. 2015, 10 (18), 2797.

³³¹ R. Di Corato et al. Combining magnetic hyperthermia and photodynamic therapy for tumor ablation with photoresponsive magnetic liposomes. *ACS Nano*. 2015, 9 (3), 2904.

³³² S. S. Kelkar & T. M. Reineke. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug. Chem.* 2011, 22, 1879.

CONCLUSION DE L'INTRODUCTION

Ces trois chapitres d'introduction permettent de cerner les utilisations potentielles ainsi que les limites des techniques d'imagerie optique et par résonance magnétique. Pour répondre aux limites des nanoparticules à luminescence persistante initialement utilisées au laboratoire, il a semblé intéressant de développer une sonde hybride associant ce phénomène à une modalité ayant une haute résolution spatiale. L'IRM, facilement accessible, n'utilisant pas de rayonnements ionisants ni de traceurs radioactifs et dont les agents de contraste sont peu coûteux et utilisables en nanosciences, a représenté un choix logique. Ces sondes multimodales ont comme applications potentielles le marquage, le suivi cellulaire en temps réel, et la vectorisation magnétique *in vivo*.

Les résultats de ce travail sont présentés ci-dessous en trois parties. La première concerne la description de nouveaux outils multimodaux basés sur la luminescence persistante et l'IRM, la deuxième porte sur une utilisation potentielle de cet outil multimodal : le marquage et la vectorisation cellulaire *in vivo*, tandis que la troisième discute des limites et présente des pistes d'amélioration des nanoparticules que nous utilisons.

RESULTATS

Parmi les nombreux mécanismes biologiques que les nanotechnologies tentent d'observer, le suivi du recrutement cellulaire lors d'accidents vasculaires est peu décrit. La compréhension de ce phénomène est importante dans le cadre de thérapies cellulaires développées pour favoriser la régénération de tissus lésés lors d'accidents ischémiques. Pour cette raison, un projet intitulé ODICEO (Observation and Dynamics of *In vivo* CELL hOming) a été financé par le PRES Sorbonne Paris-Cité. Son objectif est de synthétiser un nouvel outil nanométrique multimodal, de l'utiliser pour marquer des cellules ayant un intérêt thérapeutique lors d'accidents ischémiques dans le but de les suivre après injection chez le petit animal.

Afin de réaliser un tel projet, une collaboration associant quatre laboratoires a été mise en place. Les différents laboratoires présentent des expertises complémentaires pour ce projet multidisciplinaire qui nécessite des compétences aussi bien en nanosciences, en culture et marquage cellulaire et en imagerie optique et IRM du petit animal :

- "l'Unité des Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé" (UMR 8258, CNRS), au sein de laquelle le Dr. Cyrille Richard est spécialisé dans l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie du petit animal et dont la collaboration avec le Pr. Catherine Boisson-Vidal, directrice du laboratoire "Thérapeutiques innovantes en hémostase" (UMR 1140, CNRS) permet de travailler sur des cellules à intérêt thérapeutique,
- le Centre de Recherche Cardiovasculaire de Paris (UMR 970, CNRS), où le Pr. Olivier Clément dirige l'équipe "Imagerie de l'angiogénèse" et la Plateforme d'Imagerie du Vivant,
- le laboratoire "Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques" (UMR 7244, CNRS), où le Pr. Laurence Motte et Dr. Yoann Lalatonne développent notamment des nanoparticules d'oxyde de fer au sein de l'équipe Biomatériaux pour la Santé.
- le laboratoire "Matière et Systèmes Complexes" (UMR 7057, CNRS), au sein duquel Pr. Florence Gazeau travaille sur le devenir des nanomatériaux et l'imagerie et la manipulation cellulaire *in vivo*.

Les résultats présentés ci-dessous s'articulent en trois parties :

- une première partie décrit la conception et la caractérisation de nano-outils multimodaux pour l'imagerie optique et l'IRM, cette partie correspond au premier objectif du projet ODICEO,
- une deuxième partie présente la preuve de concept de l'utilisation des nano-outils précédemment synthétisés comme agent de marquage pour le suivi cellulaire *in vivo*, ce travail ayant été effectué afin de réaliser le second objectif du projet ODICEO,
- une troisième partie discute des limites des systèmes utilisés, de réflexions sur les pistes d'amélioration et des résultats préliminaires concernant certains problèmes rencontrés.

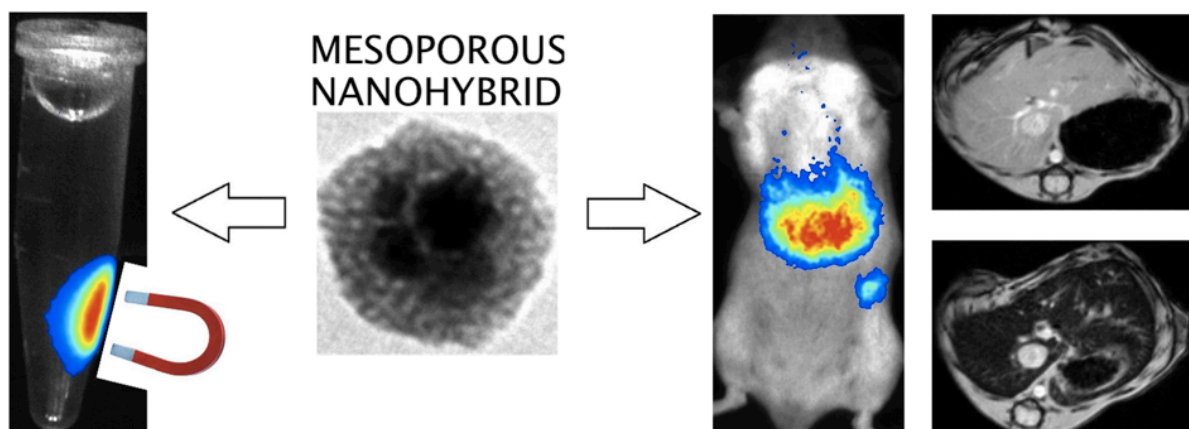
IV. SYNTHÈSE D'UN NANO-OUTIL MULTIMODAL

1) <u>Introduction</u>	p. 119
2) <u>Synthèse, composition, morphologie et caractéristiques physicochimiques</u>	p. 119
a) Synthèse et composition	p. 120
b) Propriétés hydrodynamiques	p. 122
c) Porosité des MPNH	p. 123
3) <u>Propriétés optiques et magnétiques des nanohybrides</u>	p. 123
a) Propriétés d'absorption et d'émission des MPNH	p. 123
b) Déclins de luminescence	p. 124
c) Caractérisations magnétiques	p. 125
4) <u>Comportement <i>in vivo</i> des nanohybrides</u>	p. 128
a) Fonctionnalisation des MPNH	p. 128
b) Imagerie optique et IRM <i>in vivo</i>	p. 129
c) Luminescence <i>ex vivo</i>	p. 131
5) <u>Marquage cellulaire et toxicité</u>	p. 132
6) <u>Conclusion</u>	p. 133
7) <u>Limites et perspectives</u>	p. 134
8) <u>Section expérimentale</u>	p. 134

Cette partie présente la synthèse et la description des propriétés physico-chimiques de nouvelles nanoparticules hybrides, appelées nanohybrides mésoporeux, superparamagnétiques et à luminescence persistante (MPNH pour "mesoporous nanohybrid"). Ce travail représente le premier objectif du projet ODICEO, dont les résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal Small en 2015.³³³

Design, Properties, and In Vivo Behavior of Superparamagnetic Persistent Luminescence Nanohybrids

Elliott Teston, Yoann Lalatonne, Dan Elgrabli, Gwennhael Autret, Laurence Motte, Florence Gazeau, Daniel Scherman, Olivier Clément, Cyrille Richard,* and Thomas Maldiney*



³³³ Teston et al. Design, properties, and *in vivo* behavior of superparamagnetic persistent luminescence nanohybrids. *Small*. 2015, 11 (22), 2696.

1) Introduction

Comme nous l'avons vu dans le troisième chapitre de l'introduction, la rencontre des nanotechnologies et de techniques d'imageries semble être une solution prometteuse pour améliorer les outils de diagnostic et dépasser certaines limites rencontrées par les sondes moléculaires existantes. Concernant la modalité optique, les nanoparticules présentent une photostabilité plus importante et une plus grande sensibilité que les sondes moléculaires. Le fait d'utiliser des nanoparticules permet de combiner facilement plusieurs modalités avec une durée de vie - et donc un suivi par imagerie - prolongée. De plus, il est possible de cibler un tissu d'intérêt en fonctionnalisant la surface des particules de manière appropriée.

Nous avons décidé de créer une nanosonde multimodale associant nos NPLP à des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (USPIO) modifiant le contraste en IRM et susceptibles d'être attirées à l'aide d'un aimant. Cet outil doit permettre de réaliser de l'imagerie optique en s'affranchissant du phénomène d'autofluorescence des tissus, ainsi que de l'IRM avec une haute résolution spatiale. Il s'agit donc de synthétiser une nanoparticule hybride (ou nanohybride) liant plusieurs nanoparticules en une seule possédant les propriétés des deux. Quatre types de nanohybrides, contenant des pourcentages croissants d'USPIO, ont ainsi été conçus. Leurs propriétés optiques et magnétiques ainsi que leurs comportements *in vivo* ont été étudiés.

2) Synthèse, composition, morphologie et caractéristiques physicochimiques

Il a été précédemment montré au sein du laboratoire la possibilité de former une coquille de silice mésoporeuse autour des ZGO.³³⁴ Pour le présent travail, il a été décidé de reprendre la même synthèse en ajoutant différentes quantités d'USPIO avant la formation de la couche de silice mésoporeuse. L'idée était de former le même type de structure que dans cette publication de référence mais en rendant l'outil obtenu utilisable en IRM. La Figure 4.1 montre des images de MET des ZGO et des USPIO.

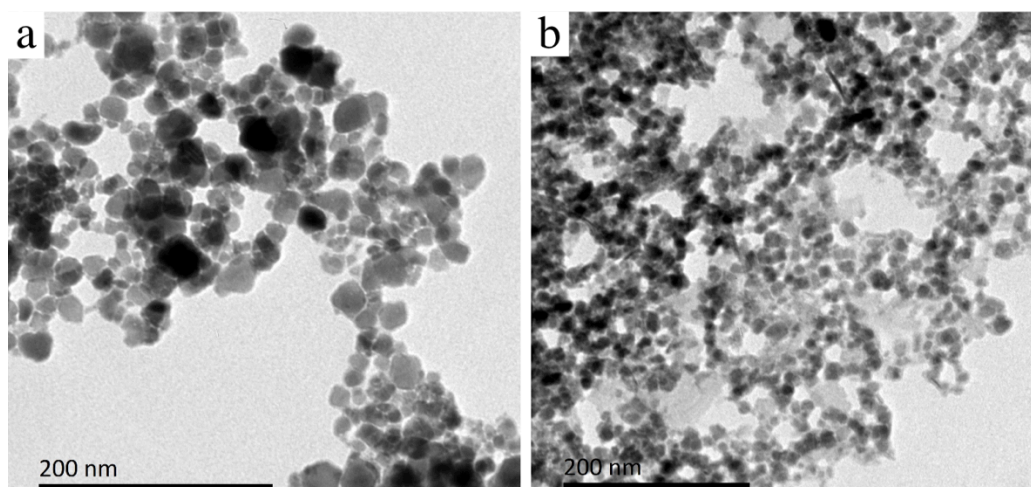


Figure 4.1. Images de MET de nanoparticules de ZGO extraites dans la soude (a) et d'USPIO (b).

³³⁴ T. Maldiney et al. Mesoporous persistent nanophosphors for *in vivo* optical bioimaging and drug-delivery. *Nanoscale*. 2014, 6, 13970.

a) Synthèse et composition

En présence d'un surfactant cationique (CTAB), un précurseur de silice (TEOS) s'organise et se polycondense autour des nanoparticules luminescentes et d'oxyde de fer, formant une structure coeur-coquille (Figure 4.2).

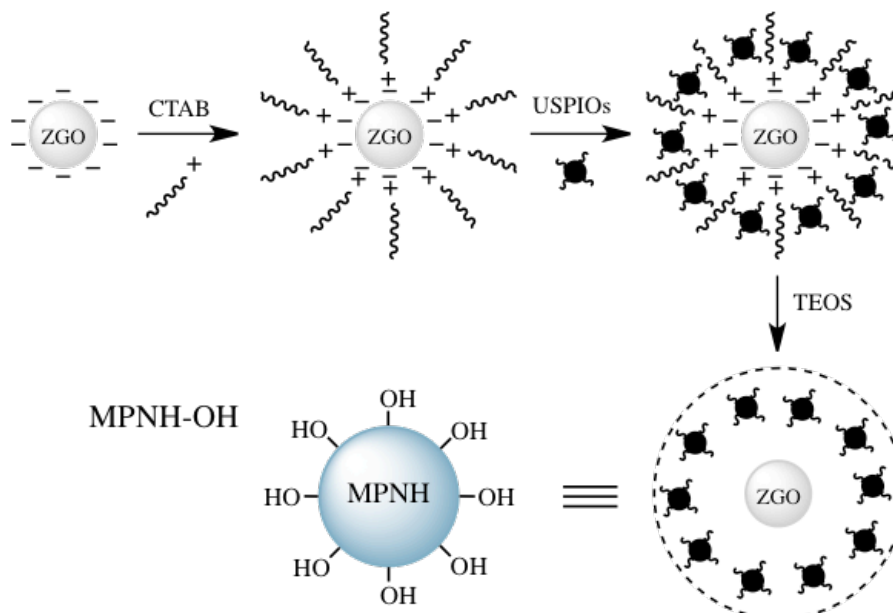


Figure 4.2. Représentation schématique de la synthèse des MPNH.

Ainsi quatre types de nanoparticules hybrides ont été synthétisés. Par la suite je les nommerai MPNH, pour "mesoporous nanohybrids". En faisant augmenter progressivement les quantités d'USPIO, nous avons obtenu des MPNH ayant des propriétés différentes. Leur constitution est rapportée dans le Tableau 4.1, ci-dessous.

	ZGO (% massique)	USPIO (% massique)
MPNH ₀ -OH	32,6	0
MPNH ₁ -OH	33,3	1,38
MPNH ₂ -OH	32,7	3,55
MPNH ₃ -OH	25,3	5,21

Tableau 4.1. Pourcentages massiques en ZGO et USPIO des MPNH synthétisés, déterminés par ICP-MS.

Les différentes compositions sont distinguées par un indice allant de 0 (les MPNH₀ ne comportant pas d'oxyde de fer) à 3 (MPNH₁, MPNH₂ et MPNH₃ ayant 1,38; 3,55 et 5,21 % d'oxyde de fer en masse). Les hybrides obtenus sont notés MPNH-OH par souci de précision concernant les groupements chimiques présents en surface. La silice mésoporeuse arbore des groupes Si-OH appelés silanols, d'où la notation adoptée.³³⁵ La fraction massique de ZGO est inférieure dans les MPNH₃, les hybrides synthétisés avec la plus grande quantité d'USPIO. Il est possible qu'un excès d'USPIO modifie la condensation de la silice autour des ZGO comme le suggère la MET (Figure 4.3).

La MET nous montre que les nanohybrides formés ont des diamètres voisins de 100 à 150 nm (Figure 4.3). On distingue un coeur contrasté de nanoparticules de ZGO et d'oxyde de fer tandis que la coquille plus claire et donc moins dense, est constituée de

³³⁵ C. A. P. Leite et al. Core-and-shell nature of Stöber silica particles. J. Braz. Chem. Soc. 2001, 12 (4), 519.

silice mésoporeuse. De plus, les variations morphologiques des particules ne sont pas restreintes aux tailles, mais concernent aussi leurs formes et leurs différences de composition.

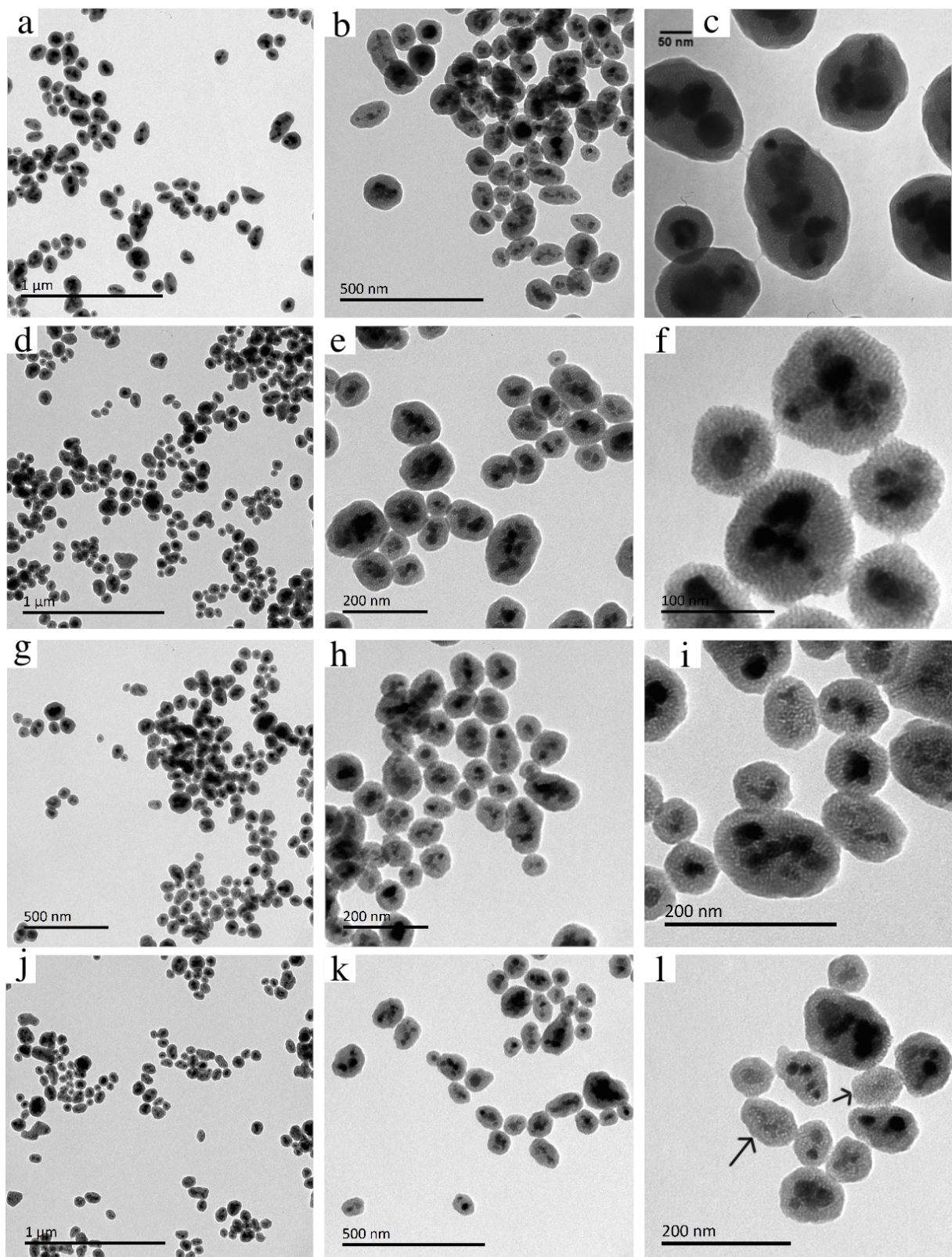


Figure 4.3. Images de MET des MPNH-OH. a-c) MPNH₀-OH. d-f) MPNH₁-OH. g-i) MPNH₂-OH. j-l) MPNH₃-OH. On peut observer des MPNH ne contenant pas de coeur sombre, ce qui semble indiquer une absence de ZGO (flèches noires, Figure 4.3.l).

En effet, certains nanohybrides, notamment parmi les MPNH₃, ne présentent vraisemblablement aucune particule de ZGO au sein de la silice (flèches noires, Figure 4.3.l), et il existe des variations importantes de la taille du coeur de nanoparticules plus denses (ZGO et USPIO) entre les hybrides que l'on peut observer. Bien qu'il eut été préférable d'avoir des nanoparticules toutes identiques, comme on peut l'observer parfois concernant les synthèses de nanocubes d'oxyde de fer, ou de nanobatonnets d'or, je n'ai pas cherché d'avantage à optimiser cette synthèse. Les images de MET montrent d'ailleurs que les ZGO (Figure 4.1.a) sont déjà de tailles et formes très disparates, et nous verrons plus loin (Partie VI) qu'il est possible d'obtenir des ZGO plus monodisperses avec des formes mieux contrôlées.

b) Propriétés hydrodynamiques

Il est intéressant de comparer les diamètres observés en MET avec les diamètres hydrodynamiques donnés dans le Tableau 4.2 ci-dessous. Concernant les mesures de diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS), il y a peu de différences entre chaque type de MPNH, et les indices de polydispersité sont tous inférieurs à 0,1. Lorsqu'on compare les résultats obtenus en MET et en DLS, on voit une différence non négligeable. Cet effet est attendu et a déjà été discuté dans de nombreuses publications.^{45,198} Le diamètre observé en MET est celui de la particule seule, un diamètre solide en quelque sorte. Une fois en solution, la particule va se mouvoir en déplaçant avec elle une sphère de solvatation, et c'est la moyenne de l'ensemble qui est mesurée par l'appareil. L'épaisseur de cette sphère dépend des interactions entre particules (sa stabilité colloïdale), des propriétés de surface de la particule (ses groupes de surface, sa charge, son hydrophilie ou hydrophobie, etc) et du solvant utilisé (polarité, force ionique, etc). Le lien entre la mesure réalisée par l'appareil et le résultat se fait selon un modèle de calcul utilisant de nombreuses approximations, ce qui peut aussi expliquer cette différence.

	Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel ζ (mV)
MPNH ₀ -OH	188	0,044	-18,1 ± 0,6
MPNH ₁ -OH	180	0,085	-20,8 ± 0,4
MPNH ₂ -OH	173	0,036	-18,5 ± 0,6
MPNH ₃ -OH	172	0,053	-18,2 ± 2,0

Tableau 4.2. Mesures de DLS des MPNH-OH : diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ .

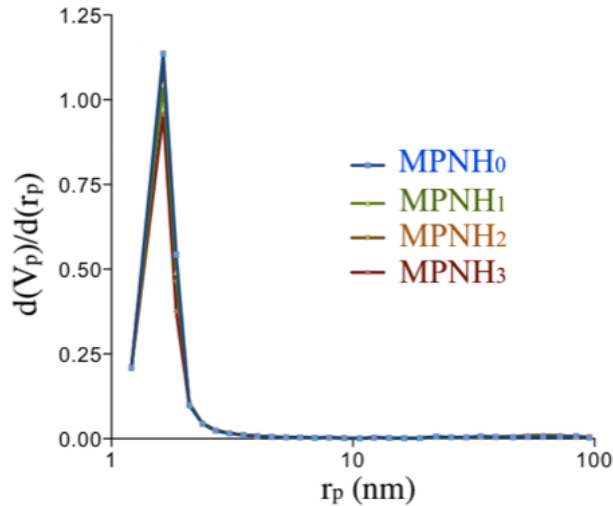
Les diamètres hydrodynamiques des MPNH diminuent progressivement avec l'augmentation du pourcentage de fer qu'ils contiennent. Tout comme pour l'évolution de la fraction massique en ZGO, il est possible de faire l'hypothèse que la présence des USPIO modifie la condensation de la silice autour des ZGO et fait varier le diamètre moyen des hybrides obtenus.

Les potentiels ζ obtenus (Tableau 4.2) sont en accord avec les données de la littérature concernant la silice mésoporeuse synthétisée par cette voie hydrothermale.³³⁶ Le point de charge nulle se situant autour de pH 3, il est normal que la charge de surface de ces particules soit négative dans le milieu de mesure (NaCl 20 mM, pH 7).

³³⁶ M. Komulski. The pH-dependent surface charging and points of zero charge. J. Colloids Interface Sci. 2011, 353, 1.

c) Porosité des MPNH

Nous avons évalué la porosité des MPNH par adsorption/désorption de N₂. Cette méthode permet de déterminer la surface spécifique ainsi que la distribution de la taille des pores (Graphique 4.1).



Graphique 4.1. Distribution de la taille des pores des MPNH.

Tous les MPNH-OH ont des propriétés de porosité similaires. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 4.3 : une surface spécifique proche de 500 m².g⁻¹ et des mésopores ayant un diamètre légèrement inférieur à 5 nm. Ces résultats sont en accord avec les systèmes similaires décrits dans la littérature scientifique⁷² ainsi qu'avec l'étude récemment publiée par le laboratoire démontrant la possibilité de charger des ZGO entourés de silice mésoporeuse avec de la doxorubicine.³³⁴

	Surface spécifique (m ² .g ⁻¹)	Diamètre des pores (nm)
MPNH ₀ -OH	538,0	4,90
MPNH ₁ -OH	516,6	4,81
MPNH ₂ -OH	524,1	4,68
MPNH ₃ -OH	487,9	4,78

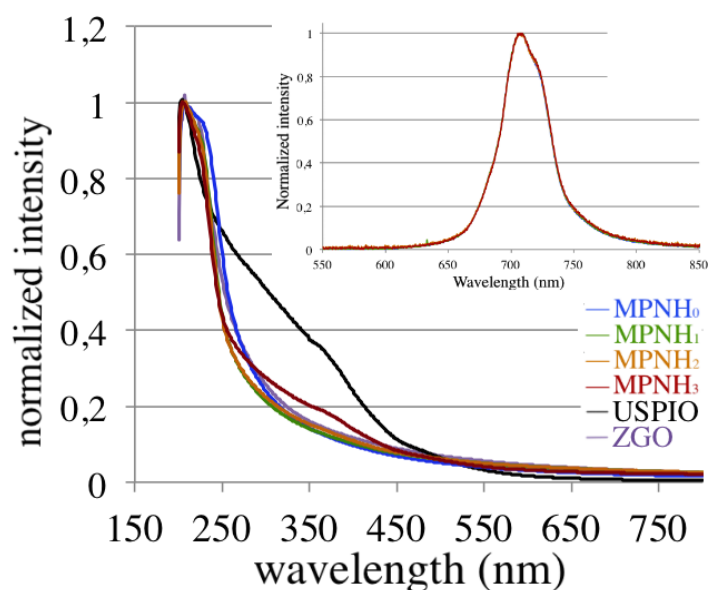
Tableau 4.3. Surfaces spécifiques et tailles de pores obtenues par la méthode BET.

On remarque tout de même une surface spécifique inférieure des MPNH₃-OH. L'hypothèse de l'influence des USPIO sur la formation de la couche de silice peut être évoquée une nouvelle fois.

3) Propriétés optiques et magnétiques des nanohybrides

a) Propriétés d'absorption et d'émission des MPNH

Le Graphique 4.2 montre qu'il n'y a presque pas de différence d'absorption entre les ZGO et les MPNH. Seule la courbe d'absorbance des MPNH₃-OH (courbe rouge) possède un épaulement autour de 350 nm, correspondant vraisemblablement à l'absorption des USPIO (courbe noire).

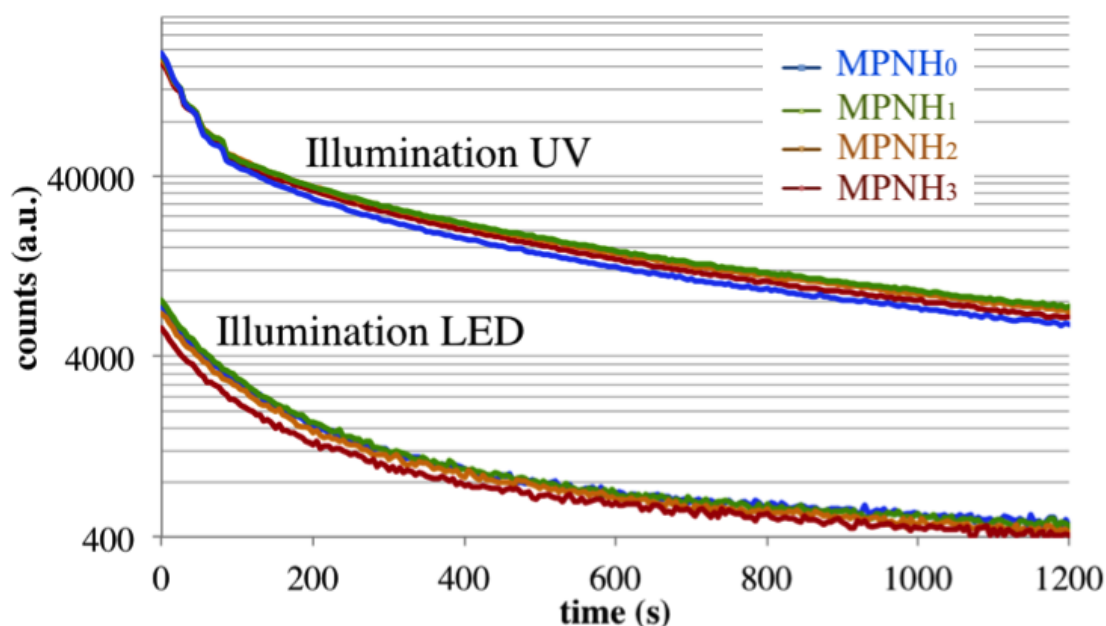


Graphique 4.2. Courbes d'absorptions normalisées des MPNH, ZGO et USPIO entre 200 et 800 nm. L'insert montre les spectres d'émissions normalisés des MPNH entre 550 et 850 nm.

L'insert du Graphique 4.2 montre que les quatre types de MPNH ont le même profil d'émission, qui est aussi celui du ZGO. Ainsi, la présence de silice tout comme celle de fer ne modifie pas le spectre d'émission des ZGO. Mais ces spectres normalisés ne quantifient pas l'intensité lumineuse de l'émission de chaque hybride après une même illumination.

b) Déclins de luminescence

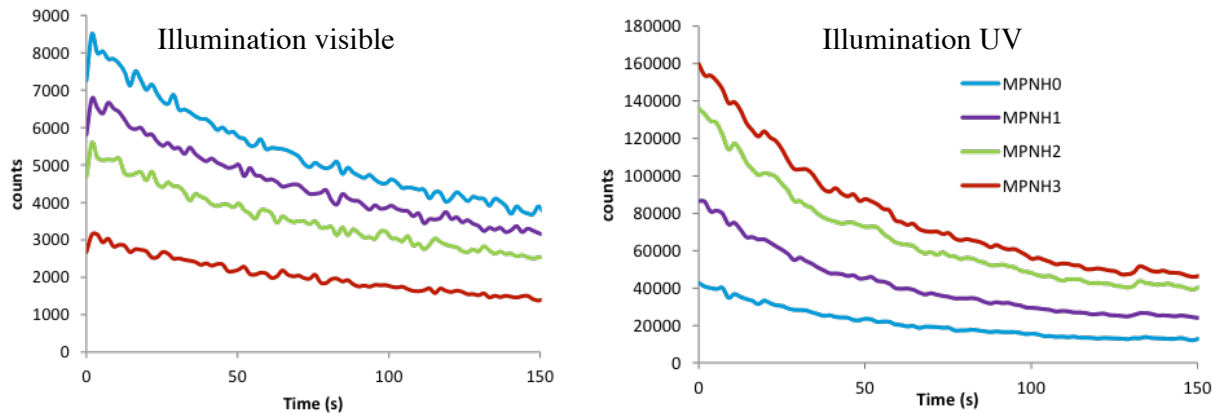
Le Graphique 4.3 montre les premières mesures de déclins de luminescence. Ceux-ci sont en faveur de l'absence d'influence de la silice et du fer sur la luminescence après illumination avec une DEL orange ou une lampe UV. Ces déclins sont enregistrés lorsque les MPNH sont resuspendus dans une solution de glucose 5 %.



Graphique 4.3. Déclins de luminescence des MPNH (10 mg.mL⁻¹) après 2 min d'illumination UV ou DEL.

La luminescence des MPNH est environ dix fois plus faible après illumination visible qu'après illumination UV. Cela a déjà été décrit pour les ZGO et est expliqué par un mécanisme de piégeage différent détaillé en introduction.

En revanche, dans un autre milieu tel que de la soude 5 mM, on observe des différences significatives de l'intensité lumineuse des quatre types d'hybrides (Graphique 4.4).



Graphique 4.4. Déclins de luminescence des MPNH-OH à 10 mg.mL⁻¹ dans NaOH 5mM.

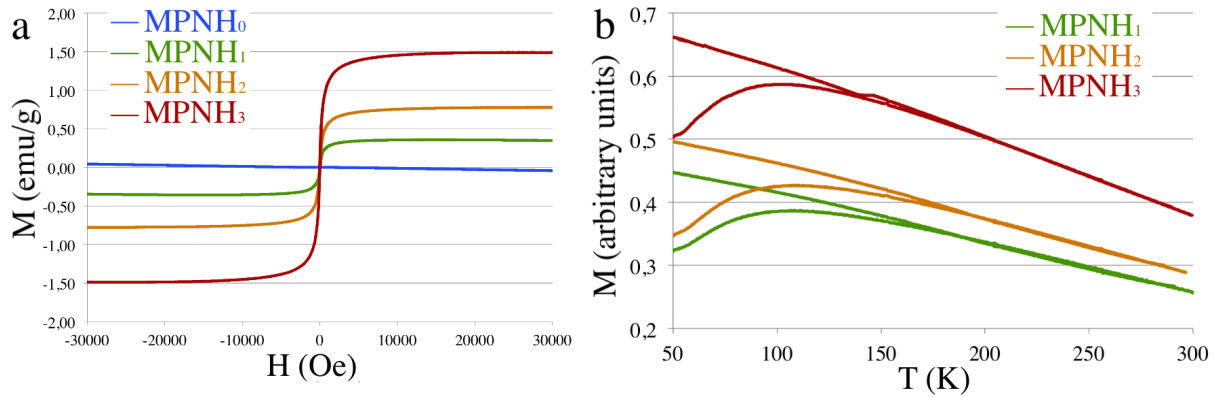
Après illumination visible (déclins de gauche, Graphique 4.4), plus il y a de fer, moins les MPNH sont luminescents, tandis qu'après illumination UV (déclins de droite, Graphique 4.5) l'inverse est observé. Les USPIO absorbent plutôt en dessous de 400 nm, comme on peut le voir dans le Graphique 4.2. Initialement, nous pensions que les USPIO auraient tendance à absorber une partie des UV illuminant les particules, avec comme conséquence de diminuer la quantité d'UV "disponibles" pour les ZGO et donc leur luminescence. Si cette hypothèse s'était avérée bonne, après illumination UV, les MPNH₃ auraient été les moins luminescents, d'autant moins que les compositions des MPNH (Tableau 1) indiquent que les MPNH₃ contiennent significativement moins de ZGO que les autres types. Or nous observons le contraire. La présence des USPIO semble augmenter la luminescence persistante après illumination UV.

De plus, on constate que l'effet de la présence d'USPIO n'est pas le même selon le type d'illumination. Celui-ci paraît même contraire à ce que l'on aurait pensé obtenir en considérant le spectre d'absorption des USPIO. Nous reviendrons plus en détails sur les facteurs influençant la luminescence en Partie VI de ce manuscrit.

c) Caractérisations magnétiques

L'étude des propriétés magnétiques des MPNH permet de vérifier que les USPIO conservent leurs propriétés superparamagnétiques au sein des hybrides. Le superparamagnétisme est un comportement de matériaux magnétiques apparaissant lorsque ces matériaux sont sous la forme de nanoparticules. Au delà d'une certaine température, appelée température de blocage, le champ magnétique peut s'inverser spontanément sous la seule influence de l'énergie thermique. Le temps entre deux renversements en l'absence de champ magnétique est appelé temps de relaxation de Néel. En l'absence de champ magnétique externe, l'aimantation d'USPIO apparaît nulle car leur temps de relaxation de Néel est inférieur au temps de mesure. En revanche, en présence d'un champ magnétique extérieur, ces nanoparticules possèdent une

aimantation non nulle, et leur susceptibilité magnétique (capacité à s'aimanter en présence d'un champ magnétique) est plus grande que celle de matériaux de même composition mais macroscopiques (matériaux alors appelés simplement "paramagnétiques").



Graphique 4.5. Propriétés magnétiques des MPNH. Courbes d'aimantation (a) et zero-field cooled/field cooled (b) des MPNH-OH.

Le Graphique 4.5.a montre les courbes d'aimantation des quatre hybrides. Les MPNH₀ ont logiquement une aimantation nulle, quelque soit le champ, car ils ne contiennent pas de particules magnétiques. Les courbes d'aimantation des MPNH₁, MPNH₂ et MPNH₃ nous montrent trois choses :

- ces trois types ont une aimantation non nulle en présence d'un champ magnétique extérieur, prouvant la présence d'USPIO,
- plus le pourcentage en USPIO est important, plus l'aimantation maximale est élevée,
- ils ont un comportement superparamagnétique à température ambiante, c'est à dire qu'ils possèdent une aimantation nulle en l'absence de champ extérieur (autrement on verrait un cycle d'hystérésis autour de 0 Oe,).

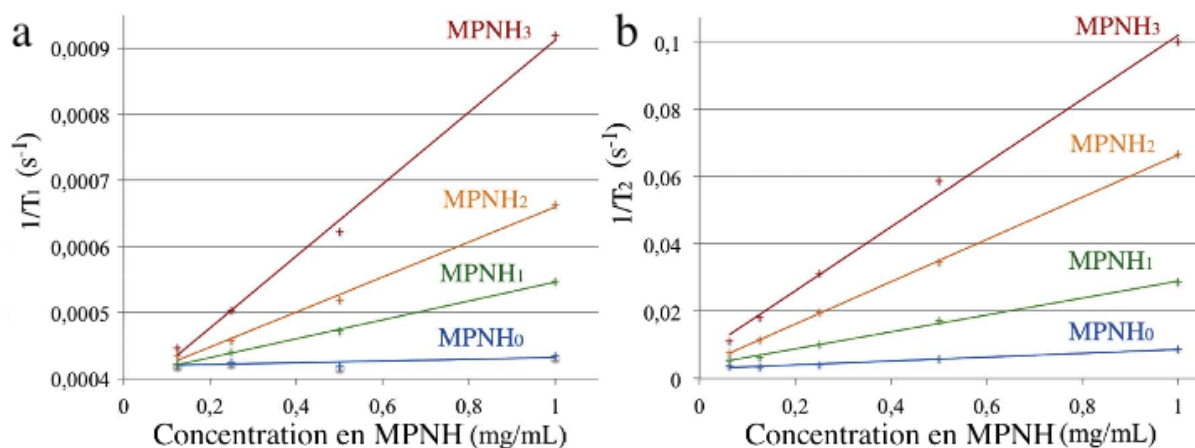
L'aimantation maximale, ou aimantation à saturation, des hybrides augmente logiquement avec la quantité d'USPIO qu'ils contiennent. Le caractère superparamagnétique des hybrides est souhaitable si l'on veut avoir des nanoparticules utilisables comme agents de contraste négatif en IRM.

Les courbes "zero-field cooled" et "field cooled" (qui n'ont pas d'intérêt pour les MPNH₀) montrent aussi qu'il n'y a pas de variation de la température de blocage (Graphique 4.5.b), suggérant que les interactions entre USPIO sont négligeables dans les hybrides.

Les mesures des taux de relaxation magnétique nucléaire longitudinaux et transverses, respectivement R_1 et R_2 , permettent de déterminer les relaxivités r_1 et r_2 des MPNH.

$$R_1 = \frac{1}{T_1} ; R_2 = \frac{1}{T_2} ; r_i = \frac{R_i - R_{i0}}{[Fe]} \quad (i = 1,2)$$

Les taux de relaxation R_1 et R_2 sont tracés dans le Graphique 4.6 en fonction des concentrations en MPNH-OH.



Graphique 4.6. Taux de relaxation R_1 (a) et R_2 (b) mesurés à 4,7 T et tracés en fonction de la concentration en MPNH.

Les taux de relaxation des MPNH sont proportionnels à leur concentration et sont liés au pourcentage de fer qu'ils contiennent. Les relaxivités sont ensuite calculées en normalisant le coefficient directeur des courbes de relaxation par la concentration en agent actif en IRM (ici le fer), et non par celle des MPNH. Les relaxivités obtenues sont donc presque identiques pour tous les MPNH (Tableau 4.4). De plus, celles-ci sont similaires à celles des USPIO seules,³³⁷ et indiquent que les MPNH sont de très bons agents de contraste négatif.²⁴³

	Aimantation à saturation (emu.g ⁻¹)	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	$\frac{r_2}{r_1}$
MPNH ₀ -OH	0	--	--	--
MPNH ₁ -OH	0,4	1,59	292	184
MPNH ₂ -OH	0,8	1,13	283	250
MPNH ₃ -OH	1,5	1,53	291	179
USPIO	45	1,4	295	211

Tableau 4.4. Aimantation à saturation et relaxivités des MPNH-OH et des USPIO.

De plus, les propriétés d'aimantation des MPNH permettent de les manipuler *in vitro* à l'aide d'aimants (Figure 4.4).

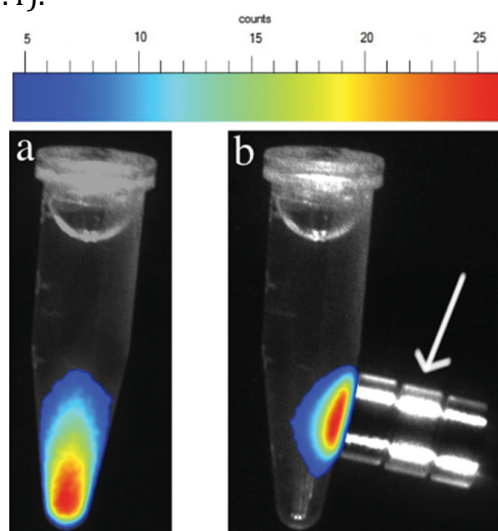


Figure 4.4. Attraction de MPNH₁-OH dans l'eau avec un aimant (1 count = $2,8 \cdot 10^6$ ph.s⁻¹.cm⁻².sr⁻¹).

³³⁷ Y. Lalatonne et al. Superparamagnetic bifunctional bisphosphonate nanoparticles: a potential contrast MRI agent for osteoporosis therapy and diagnostic. J. Osteoporosis. 2010, 747852.

Initialement, des MPNH₁-OH sont en suspension dans le bas de l'ependorf (Figure 4.4.a). Lorsqu'un aimant est posé à proximité de la solution, on constate un déplacement de la luminescence vers celui-ci (Figure 4.4.b). Cette propriété sera utilisée ultérieurement pour vectoriser des cellules marquées avec ces particules et pour tenter de modifier leur biodistribution *in vivo* (voir Partie V).

4) Comportement *in vivo* des nanohybrides

a) Fonctionnalisation des MPNH

L'intérêt principal de tels nanohybrides étant de servir de sondes d'imagerie optique et d'IRM, nous avons évalué leurs propriétés *in vivo*. Les MPNH-OH présentent un défaut important, celui de s'accumuler dans les poumons après injection par voie intraveineuse. Nous avons observé ce phénomène avec les MPNH mais il est également décrit dans la littérature pour d'autres nanoparticules de silice.³³⁸ De plus, les nanoparticules de silice non fonctionnalisées, arborant des fonctions silanols en surface, sont connues pour entraîner une rupture des membranes cellulaires³³⁹ et une hémolyse.³⁴⁰ Nous avons donc fonctionnalisé la surface des MPNH-OH afin d'obtenir des particules plus stables et ne présentant pas de silanols en surface. Les détails de la fonctionnalisation sont donnés dans la Figure 4.5. Les particules sont d'abord fonctionnalisées avec de l'APTES, afin d'obtenir des amines primaires en surface, puis une réaction avec de l'anhydride diglycolique permet d'obtenir des carboxyles conférant une bonne stabilité aux hybrides, vraisemblablement liée à une forte charge négative de surface.

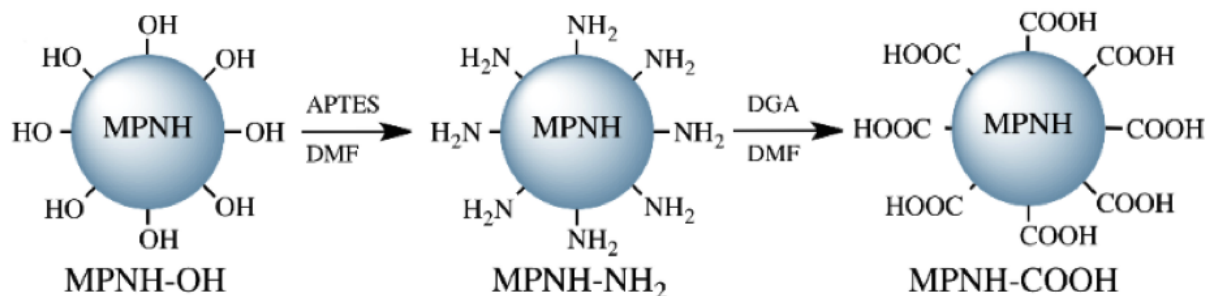


Figure 4.5. Fonctionnalisation des MPNH-OH en MPNH-COOH avant injection.

Les diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ des MPNH-COOH sont donnés dans le tableau 4.5, ci-dessous. Ceux-ci n'évoluent pas de la même manière que ceux des MPNH-OH. Il est probable que la fonctionnalisation ne soit pas aussi efficace pour tous les hybrides, mais cela peut aussi être la conséquence d'une dispersion légèrement différente de chaque type de MPNH. Les diamètres hydrodynamiques des MPNH-NH₂ ne sont pas indiqués car ces particules sont peu stables dans l'eau, la mesure doit être réalisée dans l'éthanol pour avoir une meilleure stabilité colloïdale. Stabilité toute relative car les diamètres hydrodynamiques des MPNH-NH₂ restent supérieurs à ceux des MPNH-OH ou -COOH, et on observe souvent un phénomène de floculation et de sédimentation des particules pendant la mesure.

³³⁸ S. P. Hudson et al. The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials*. 2008, 29, 4045.

³³⁹ T. Nash et al. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. *Nature*. 1966, 210, 259.

³⁴⁰ M. Diociaiuti et al. Morphological and functional alterations of human erythrocytes induced by SiO₂ particles: an electron microscopy and dielectric spectroscopy study. *Environ. Res.* 1999, 80, 197.

	Potentiel ζ (mV)		Diamètre hydrodynamique (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel ζ (mV)
MPNH ₀ -NH ₂	36,2 ± 1,9	MPNH ₀ -COOH	200	0,024	-44,7 ± 2,1
MPNH ₁ -NH ₂	38,3 ± 0,9	MPNH ₁ -COOH	185	0,046	-42,2 ± 2,1
MPNH ₂ -NH ₂	46,3 ± 2,4	MPNH ₂ -COOH	191	0,050	-39,2 ± 2,2
MPNH ₃ -NH ₂	35,7 ± 2,7	MPNH ₃ -COOH	186	0,052	-40,0 ± 2,6

Tableau 4.5. Mesures de DLS des MPNH-NH₂ et MPNH-COOH : diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ .

Pour les expériences *in vivo*, le choix du recouvrement de surface des nanohybrides a été réalisé afin d'optimiser leur capture par le système réticulo-endothélial (SRE, en partie composé du foie et de la rate), le but étant d'avoir une accumulation rapide dans ces organes pour mesurer l'influence de la présence des nanohybrides sur le contraste en IRM. De nombreuses études ont déjà décrit cette capture des NPLP négativement chargées par le SRE.^{38,198} La surface des nanoparticules injectées dans la circulation sanguine est exposée aux protéines sériques, qui s'y adsorbent. Celles-ci sont principalement des apolipoprotéines, des fractions du complément et des immunoglobulines, mais des centaines de protéines peuvent s'adsorber en surface des particules avec une distribution dépendant fortement de la taille et du recouvrement des particules.³⁴¹ Ce phénomène rapide, appelé opsonisation, aboutit à la capture des particules par le SRE.

b) Imagerie optique et IRM *in vivo*

Le recouvrement choisi entraîne une capture rapide des MPNH par le SRE après leur injection. Une image de luminescence persistante est alors enregistrée (Figure 4.6) avant que des coupes du foie et de la rate ne soient réalisées en IRM (Figure 4.7).

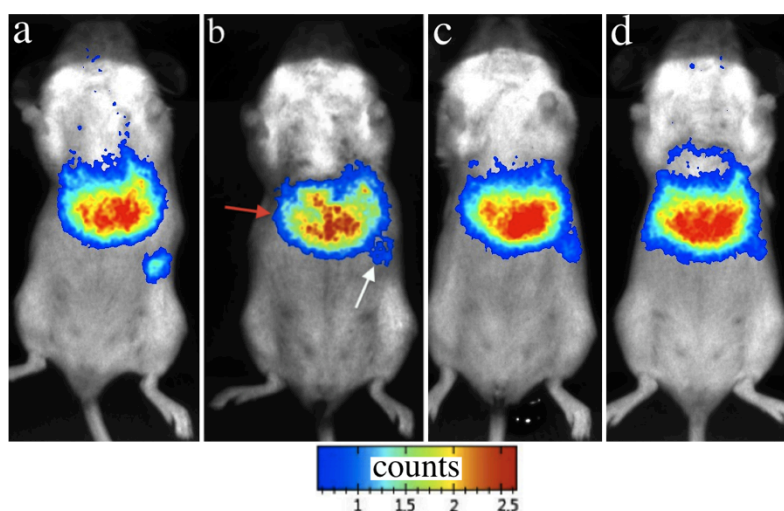


Figure 4.6. Biodistribution des MPNH₀-COOH (a), MPNH₁-COOH (b), MPNH₂-COOH (c), et MPNH₃-COOH (d), 10 min après injection déterminée par luminescence persistante (1 count = $8,79 \cdot 10^5 \text{ ph.s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$). (n = 4 pour chaque condition)

La Figure 4.6 montre la biodistribution de 2 mg de MPNH-COOH, 10 min après injection. On distingue clairement le foie et la rate (flèches rouge et blanche, Figure 4.6.b). Celle-ci n'apparaît pas aussi distinctement sur toutes les souris, ceci pouvant être dû au fait que l'accumulation des MPNH-COOH varie d'une souris à l'autre ou que la rate est

³⁴¹ C. D. Walkey et al. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 2139.

partiellement écartée par le foie. Une accumulation variable dans la rate peut être liée aux différences de tailles et de morphologies des MPNH. Une fois l'image optique obtenue, des coupes de foies et de rates sont réalisées en IRM.

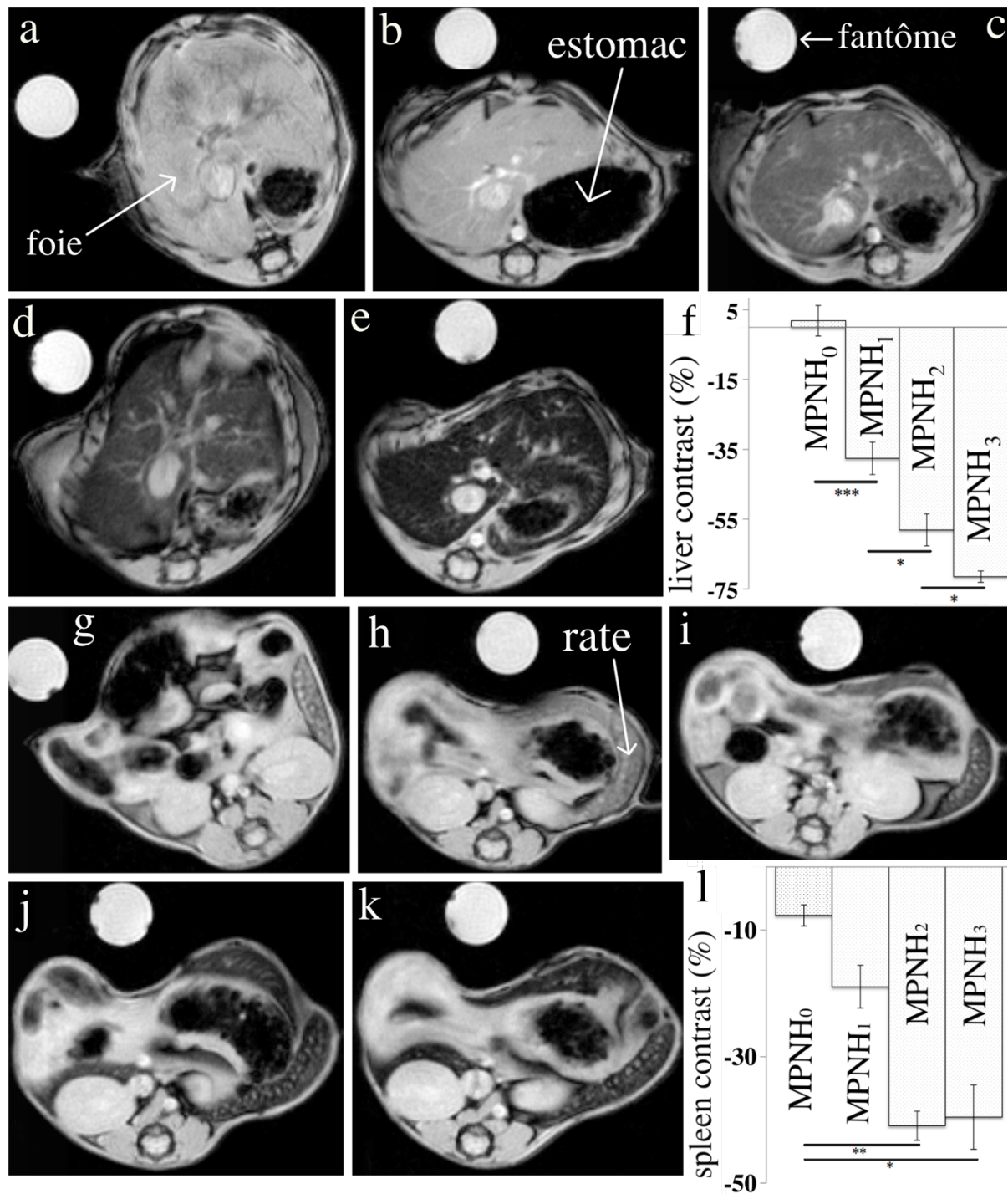


Figure 4.7. Suivi IRM *in vivo* des MPNH-COOH. a) Coupe de foie d'une souris avant injection des MPNH-COOH. b-e) Coupes IRM transverses de souris montrant le foie en séquence T₂* après injection de 2 mg de MPNH₀-, MPNH₁-, MPNH₂- et MPNH₃-COOH, respectivement. f) Evolution du contraste du foie pour les quatre types de MPNH-COOH en séquence T₂*. g) Coupe de rate d'une souris avant l'injection des MPNH-COOH. h-k) Coupes IRM transverses de souris montrant la rate en séquence T₂* après injection de 2 mg de MPNH₀-, MPNH₁-, MPNH₂- et MPNH₃-COOH, respectivement. l) Evolution du contraste de la rate pour les quatre types de MPNH-COOH en séquence T₂*. (n = 4 pour chaque condition). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test Anova suivi par une comparaison de Bonferroni, les barres d'erreur montrent les déviations standards. *,** et *** correspondent à p<0,05, p<0,01 et p<0,001, respectivement.

Des images de chaque souris avaient été enregistrées avant l'injection des MPNH-COOH. On peut voir les contrastes du foie et de la rate en séquence T_2^* avant et après injection de chaque type d'hybride dans la Figure 4.7. Il n'y a pas de variation du contraste du foie après injection des MPNH₀-COOH. Cela n'est pas surprenant étant donné que celles-ci ne contiennent pas d'USPIO, donc pas d'agent de contraste. L'évolution quantitative du contraste du foie est présentée dans la Figure 4.7.f. On voit qu'en comparaison du témoin il varie de -38% après injection de 2 mg de MPNH₁ à -72% après injection de MPNH₃. L'évolution du signal perçu en IRM est liée à la quantité d'USPIO injectée aux souris. En revanche, les vaisseaux sanguins hépatiques apparaissent toujours en hypersignal, ce qui indique une disparition des MPNH de la circulation sanguine.

Une chute du contraste est aussi observée dans la rate après injection des hybrides contenant du fer (MPNH_{1,2,3}). On peut voir la rate avant injection (Figure 4.7.g), après injection des MPNH₀ (Figure 4.7.h) ou des MPNH₁, MPNH₂ et MPNH₃ (Figures 4.13.h, i et j, respectivement). L'évolution du contraste de la rate (Figure 4.7.l) n'est pas aussi prononcée que pour le foie. D'une part, la diminution du contraste des rates de souris est moins importante que celle des foies. D'autre part, le contraste des rates des souris ayant reçu des MPNH₂ ou des MPNH₃ ne sont pas significativement différents. Plusieurs constats peuvent expliquer ce phénomène :

- la rate semble parcourue de vaisseaux sanguins difficiles à exclure des zones d'intérêt tracées pour mesurer le contraste, contrairement au foie qui présente de grandes zones sans vaisseau de taille importante,
- les rates témoins semblent être naturellement plus sombres que les foies témoins (Figure 4.7.a et g), et on peut faire l'hypothèse que le contraste obtenu après injection des MPNH₂ ou des MPNH₃ correspond à une saturation de la rate et à une chute maximale du contraste.

Ces résultats d'imagerie optique et par résonance magnétique prouvent la possibilité de combiner les deux modalités dans un seul nanohybride. Le suivi en temps réel est réalisé à l'aide de l'imagerie optique, tandis que la présence des MPNH dans les organes du SRE facilite leur observation en IRM pondérée en T_2 avec une haute résolution spatiale. L'imagerie optique *in vivo* n'est que semi-quantitative, nous avons donc mesuré la luminescence de chaque organe *ex vivo* afin de déterminer les éventuelles différences de biodistribution de chaque hybride.

c) Luminescence *ex vivo*

Après sacrifice des souris, les organes du SRE ainsi que le cœur, les reins et les poumons ont été prélevés afin d'en déterminer la luminescence. Celle de la carcasse a aussi été mesurée (Figure 4.8.a) et la luminescence de chaque organe a été normalisée par sa masse. La Figure 4.8.b nous donne la luminescence par unité de masse du tissu observé.

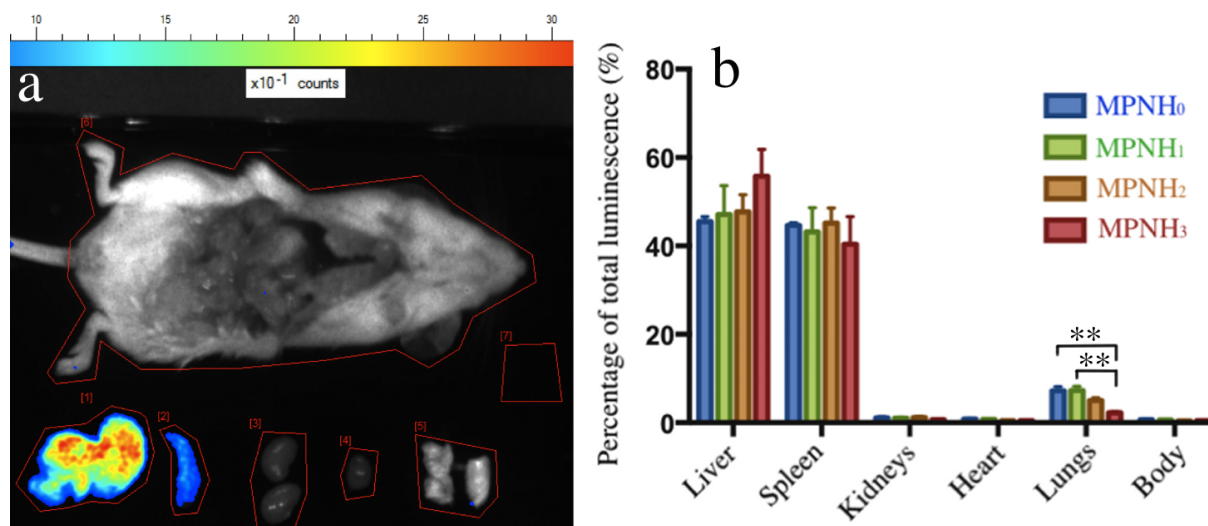


Figure 4.8. La biodistribution des MPNH-COOH *ex vivo* a été évaluée en illuminant les différents organes avec la DEL rouge, puis la luminescence de chaque organe a été divisée par le poids de l'organe en question et exprimée comme pourcentage de la luminescence totale. a) La carcasse et le foie, la rate, les reins, le coeur et les poumons d'une souris ayant reçu 2 mg de MPNH₃-COOH (de gauche à droite). b) Biodistribution normalisée des MPNH-COOH. (n = 4 pour chaque condition) L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test Anova suivi par une comparaison de Bonferroni, les barres d'erreur montrent les déviations standards. ** correspondent à $p < 0,01$.

L'image de luminescence persistante (Figure 4.8.a) montre que le foie et la rate contiennent la majorité des MPNH. Il n'y a pas de différence significative de concentration des hybrides dans le foie et la rate. En revanche, la rétention pulmonaire est inférieure pour les MPNH₂-COOH et MPNH₃-COOH. Bien qu'une taille inférieure de ces MPNH pourraient être une explication, les propriétés hydrodynamiques des MPNH-COOH ne permettent pas de conclure (Tableau 4.5).

5) Marquage cellulaire et toxicité

Un test de marquage et de vectorisation cellulaire a été réalisé en faisant incuber des MPNH₁-NH₂ sur des macrophages RAW 264.7. Après remise en suspension et illumination visible des cellules, un aimant est placé à proximité (Figure 4.9).

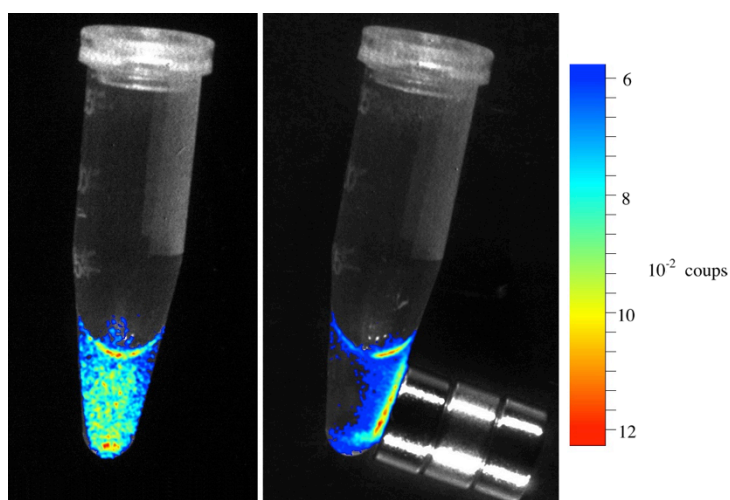
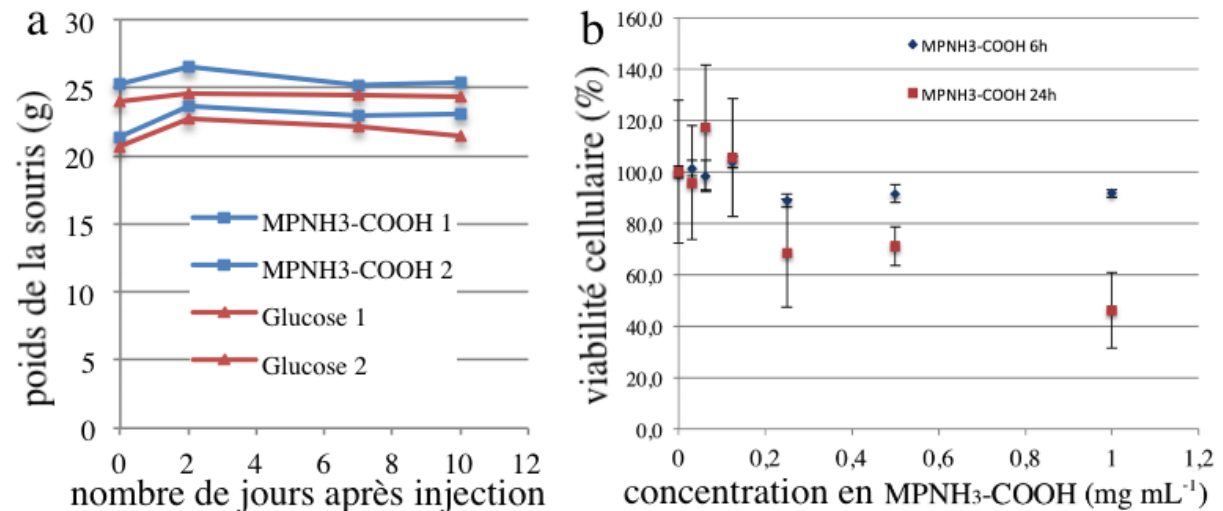


Figure 4.9. Expérience de vectorisation magnétique de cellules RAW marquées avec des MPNH₁-NH₂ (1 count = $2,8 \cdot 10^6$ ph.s⁻¹.cm⁻².sr⁻¹).

Le marquage avec des MPNH₁ est assez efficace pour attirer *in vitro* des macrophages à l'aide d'un aimant. Cela a été réalisé avec les hybrides contenant le moins d'USPIO en appliquant un aimant pendant 5 min. Ce résultat ouvre des perspectives pour la vectorisation cellulaire *in vivo*.

Des tests préliminaires de toxicité *in vivo* (Graphique 4.7.a) et *in vitro* (Graphique 4.7.b) des MPNH₃-COOH ont été réalisés sur les mêmes cellules.



Graphique 4.7. Evaluation préliminaire de la toxicité des MPNH₃-COOH. a) *In vivo* : deux souris reçoivent 2 mg de MPNH₃-COOH par injection intra-veineuse tandis que deux autres ne reçoivent que du glucose 5%. Le poids de chaque souris est mesuré de 0 à 10 jours. b) Macrophages RAW 264.7 incubés 6 ou 24 h avec différentes concentrations de MPNH₃-COOH. La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide du réactif MTT.

Les souris ayant reçu une injection intraveineuse de 2 mg de MPNH₃-COOH ont des courbes de poids tout à fait similaires aux souris traitées avec la solution d'injection sans nanoparticules (Graphique 4.7.a). Cette injection n'entraîne donc pas de trouble majeur de la santé des souris pendant au moins 10 jours. Le test MTT réalisé sur des macrophages murins RAW 264.7 (Graphique 4.7.b) montre qu'il y a peu de cytotoxicité après 6 h d'incubation, même à des concentrations élevées (92% de viabilité cellulaire à 1 mg.mL⁻¹, soit 0,294 mg.cm⁻²). En revanche, une incubation de 24 h entraîne une baisse significative de la viabilité cellulaire, notamment à de fortes concentrations (46% de viabilité cellulaire à 1 mg.mL⁻¹). Dans les deux cas, une concentration inférieure à 0,250 mg.mL⁻¹ ne montre pas de toxicité.

Ces particules seront utilisées ultérieurement dans le cadre d'une étude de marquage cellulaire. D'autres lignées cellulaires seront marquées et différents tests de viabilité cellulaire et de caractérisation du marquage seront alors effectués (Partie V, Marquage et suivi cellulaire).

6) Conclusion

Les nano-hybrides décrits ici sont les premières nanoparticules bimodales à associer NPLP et USPIO. Ces MPNH ont des propriétés de luminescence persistante et d'agent de contraste négatifs. Les USPIO garantissent la haute résolution spatiale que ne peut fournir la luminescence persistante, tandis que celle-ci permet de réaliser un suivi en

temps-réel avec une bonne sensibilité. Des nanoparticules bimodales optique/IRM ont déjà été obtenues en dopant les ZGO avec 4 % de Gd^{3+} .²⁰⁶ Cependant, les relaxivités r_2 étaient plus faibles que celles des MPNH, et les ZGO dopés ne peuvent ni être utilisés comme vecteurs de médicament et ni être attirés à l'aide d'un aimant. La silice mésoporeuse donne la possibilité d'encapsuler un produit à intérêt thérapeutique,³³⁴ et la susceptibilité à réagir à la présence d'un aimant ouvre des perspectives pour la vectorisation cellulaire *in vivo*.

7) Limites et perspectives

Quelques points ont été abordés rapidement dans ce chapitre sur la synthèse d'hybrides multimodaux et certains feront l'objet de développements dans le dernier chapitre de cette thèse :

- si tous les types de MPNH peuvent être suivis après illumination UV et injection intraveineuse, la diminution de la luminescence des MPNH après illumination visible, vraisemblablement due à la présence de proportions croissantes de fer, rend le suivi *in vivo* à long terme impossible pour les MPNH₃. Quelle est l'influence des USPIO sur la luminescence, à quoi cela peut-il être dû, et en quoi est-ce un facteur limitant de l'utilisation des MPNH *in vivo* ?
- l'hétérogénéité des MPNH peut elle être diminuée, et est-ce qu'un meilleur contrôle de la morphologie des ZGO permet de résoudre ce problème ?
- augmenter la luminescence des MPNH peut être intéressant, et il est nécessaire de s'intéresser à augmenter la luminescence des ZGO.
- les MPNH ont-ils une toxicité à long-terme *in vitro* et *in vivo* ?
- quel est le devenir des ces nanohybrides *in vivo* et combien de temps peut-on les suivre en imagerie optique ou en IRM ?

La problématique de la luminescence est intimement liée à celle de la toxicité. L'utilisation de nanoparticules plus luminescentes permettrait de diminuer les doses et donc de limiter une éventuelle toxicité. La dégradation des nanoparticules est aussi probablement liée de manière complexe à leur toxicité. L'utilisation de ces nanohybrides comme outil de marquage cellulaire est présenté dans la Partie V, et des pistes de réflexion concernant les problèmes de luminescence, la toxicité systémique et la dégradation sont présentées dans la Partie VI de ce manuscrit.

8) Section expérimentale

a) Synthèse des NPLP : l'oxyde de zinc et de gallium $ZnGa_2O_4:Cr^{3+}(0,25\%)$

De l'oxyde de gallium (8,98 mmol) est dissous dans 10 mL d'acide nitrique 35% pendant 12h à 150°C dans un réacteur en téflon afin de former du nitrate de gallium. Puis il est mélangé à 9,00 mmol de nitrate de zinc et $4,49 \cdot 10^{-2}$ mmol de nitrate de chrome préalablement dissous dans 10 mL d'eau mQ. Le pH du mélange est ajusté à 7,5 par ajout d'une solution d'ammoniac à 30% en masse. Le mélange obtenu est agité vigoureusement pendant 3h à température ambiante puis placé dans un réacteur en téflon à 120°C pendant 24 h. Le composé obtenu est lavé une fois à l'eau puis deux fois à

l'éthanol avant d'être séché à 60°C et sous pression réduite pendant 2 h. La poudre obtenue est calcinée pendant 5 h à 750°C. Le solide obtenu est broyé dans un mortier en présence d'hydroxide de sodium à 5,0 mM pendant 15 min avant d'être laissé 24 h sous agitation forte à température ambiante et à une concentration finale de 10 mg.mL⁻¹. Les nanoparticules ayant un diamètre hydrodynamique de moins de 80 nm sont sélectionnées par centrifugations successives.

b) Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Une solution de diméthylhydroxylamine ((CH₃)₂NH₂OH) à 2,8.10⁻¹ mol.L⁻¹ et de dodecyl sulfate de fer (Fe(DS)₂) à 2,7.10⁻² mol.L⁻¹ est préparée. Après 2 h d'agitation vigoureuse à 28,5°C, 2 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1,0 mol.L⁻¹ sont ajoutés, entraînant la formation des nanoparticules. Le précipité est récupéré en utilisant une séparation magnétique. Après dix lavages avec de l'eau à pH 7, les nanoparticules sont redispersées dans de l'eau distillée à pH 2. Les γFe₂O₃ obtenues à cette étape n'ayant aucun recouvrement de surface, celles-ci sont directement fonctionnalisées en mélangeant la solution de nanoparticules (6 mg.mL⁻¹) dans une solution aqueuse d'acide caféique (10 mg.mL⁻¹) à pH 10. Après 2 h d'agitation à température ambiante, les particules fonctionnalisées sont lavées cinq fois à pH 2. Les γFe₂O₃ recouvertes d'acide caféique obtenues sont placées dans l'eau à pH 7.

c) Synthèse des nanoparticules mésoporeuses bimodales

20 mg de ZGO sont mélangés à différentes quantités de γFe₂O₃ (0/0,5/1/2 mg) dans 20 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium à 5 mM. 80 mg de cétyle triméthyle ammonium bromide (CTAB) sont ajoutés avant que la solution soit placée 10 min dans un bain à ultrasons. Le mélange est ensuite placé à 45°C sous agitation magnétique, et deux ajouts de 600 μL d'une solution de tétraéthoxyorthosilicate (TEOS) à 10% en volume dans le méthanol sont réalisés à t₀ et après 90 min. 3 h après le premier ajout, la solution est placée 24 h à 120°C dans un réacteur en téflon. Les particules obtenues sont lavées maintes fois à l'eau et au méthanol, puis le surfactant (CTAB) utilisé pour aider à la formation de la structure de silice mésoporeuse est enlevé en réalisant 6 lavages d'au moins 6 h dans une solution de méthanol à 1% en masse en chlorure de sodium.

d) Fonctionnalisation des MPNH

Les MPNH recouverts de fonctions amino (notées MPNH_{0,1,2,3}-NH₂) sont obtenues en faisant réagir 10 mg de MPNH-OH avec 40 μL de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) dans 4 mL de DMF, pendant 5 h sous agitation et à température ambiante. L'APTES en excès est éliminé par trois étapes de centrifugation et redispersion dans le DMF.

Les MPNH recouverts de fonctions carboxylates (MPNH_{0,1,2,3}-COOH) sont obtenues en faisant réagir 10 mg de MPNH_{0,1,2,3}-NH₂ avec 5 mg d'anhydride diglycolique (DGA) dans 4 mL de DMF sous agitation pendant 12 h à température ambiante. Le DGA n'ayant pas réagi est éliminé par lavages dans le DMF.

e) Caractérisations optiques

Les spectres d'émission de luminescences ont été mesurés après 2 min d'illumination avec une DEL orange (λ_{exc} = 600 nm, 70 W, 5700 lm, BL-F70 Philips Lumiled, 34 W.Sr⁻¹, 22950 cd). La lumière émise est collectée par un monochromateur Acton SpectraPro couplé à un capteur CCD Princeton refroidi à -70°C.

Les déclins de luminescence ont été enregistrés après 2 min d'illumination par une lampe UV à vapeurs de mercure (254 nm, 6 W, 2,2 W.Sr⁻¹, 1500 cd) ou la DEL orange

précédemment décrite sur une suspension de MPNH-OH à $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans une solution aqueuse de glucose 5% ou de NaOH 5 mM. La lumière émise a été captée par un capteur GaAs (intensified charge-coupled device) (ICCD) compteur de photons (Optima, Biospace, Paris, France).

Les $\text{MPNH}_{0,1,2,3}\text{-OH}$ ont été caractérisés en microscopie électronique à transmission (JEOL JEM-100S) et en diffusion dynamique de la lumière (mesures de diamètres hydrodynamiques et de potentiels- ζ) à l'aide d'un Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, Southborough, MA) équipé d'un laser He-Ne de puissance 5 mW avec un angle de détection de 173° (rétrodiffusion non invasive).

f) Analyses élémentaires des MPNH

2 mg de chaque type de MPNH-OH sont dissous dans 5 mL d'acide nitrique concentré (70°C pendant 2h dans un tube fermé sur un bloc chauffant DigiPREP Jr SCP Science puis deux heures supplémentaires à 80°C dans un tube ouvert). Le volume de chaque échantillon est ajusté à 20 mL dans une solution aqueuse d'acide nitrique à 3%. Une dilution au cinquième de chaque échantillon est utilisée pour l'analyse de la teneur en fer et zinc par spectroscopie de masse par torche plasma (ICP-MS) (Thermo Electron). Une solution multiélément est utilisée pour optimiser les paramètres expérimentaux afin d'obtenir le signal maximum. Les valeurs du ratio d'oxyde ($^{156}\text{CeO}/^{140}\text{Ce}$) et du ratio ($^{138}\text{Ba}^{++}/^{138}\text{Ba}$) sont inférieures à 4%. L'acquisition des données est réalisée en mode "peak jump" avec trois acquisitions pour chaque échantillon (durée 20 s, 100 balayages par acquisition, 200 ms par balayage).

g) Caractérisation de la porosité de la silice

Les isothermes d'absorption/désorption de N_2 ont été obtenus sur un instrument d'adsorption de gaz BELSORP-max. La température cryogénique de 77 K était contrôlée par de l'azote liquide. Le procédé de dégazage initial des échantillons a été réalisé sous vide poussé (inférieur à 10^{-6} mbar) à 120°C pendant 15 h. L'échantillon dégazé ainsi que le tube ont été pesés précisément et transférés dans l'analyseur. La distribution de la taille des pores a été calculée à partir de la branche d'adsorption des isothermes d'absorption/désorption de N_2 selon la méthode Barret-Joyner-Halenda (BJH). La surface Brunauer-Emmett-Teller (BET) a été déterminée en utilisant les données entre 0,05 et 0,375 (juste avant d'observer condensation capillaire).

h) Caractérisations magnétiques

Un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM, Quantum Design, Versalab) a été utilisé pour les caractérisations magnétiques. Ce magnétomètre mesure l'aimantation en faisant varier le champ magnétique de -30000 à +30000 Oe avec une vitesse de $100\text{ Oe}\cdot\text{s}^{-1}$, ce cycle étant répété deux fois. Les mesures ont été réalisées à 300 K sur des échantillons sous forme de poudres. La courbe "zero field cooled" (ZFC) a été obtenue en refroidissant d'abord la poudre de 300 à 50 K en l'absence de champ magnétique. Puis un champ de 100 Oe est appliqué et la magnétisation est enregistrée alors que la température est progressivement augmentée. La courbe "field cooled" (FC) est mesurée en diminuant la température dans le même champ magnétique.

i) Mesure des relaxivités et IRM.

Des images de suspensions de $\text{MPNH}_{0,1,2,3}\text{-OH}$ à différentes concentrations dans du glucose 5 % ont été réalisées sur un scanner Bruker Bio-Spec 47/40 USR à 4,7 T en utilisant des séquences IRM à écho de spin rapides avec des temps d'écho (T_E) et de

répétition (T_R) variables. Les temps de relaxation T_1 et T_2 ont été déduits d'ajustements monoexponentiels du signal de résonance magnétique comme fonction de T_R et T_E , respectivement, à l'aide du logiciel ParaVision.

j) Etudes *in vivo*

Les études sur animaux ont été conduites en accord avec les recommandations françaises pour le bien-être animal et selon les procédures approuvées par le comité d'éthique de Paris Descartes pour la recherche animale (référence CEEA34.JS.142.12). Pour réaliser les études d'imagerie *in vivo*, des souris ($n = 4$) femelles BALB/c âgées de 5 semaines (Janvier, Le Genest St. Isle, France) ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane avant de recevoir des injections intraveineuses de 2 mg de MPNH_{0,1,2,3}-COOH redispersés dans 200 μ L d'une solution stérile de glucose 5%.

k) Imagerie optique

L'acquisition a été réalisée de la même manière que pour les déclinés de luminescence, avec une caméra Photon Imager de Biospace Lab. La suspension de 2 mg de MPNH_{0,1,2,3}-COOH a été illuminée 2 min à l'aide d'une lampe UV préalablement à l'injection dans la veine de la queue des souris. Les animaux ont ensuite été placés sur le dos dans la caméra où le signal a été enregistré.

l) Imagerie par résonance magnétique

L'IRM a été réalisée sur un spectromètre dédié à l'imagerie du petit animal (4,7 T Biospec 47/40 USR Bruker), utilisant une antenne en quadrature corps entier émettrice et réceptrice avec un diamètre intérieur de 35 mm. Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane et étaient placées sur le ventre pendant les acquisitions avec un détecteur de respiration pneumatique à proximité du diaphragme afin de synchroniser l'imagerie avec celle-ci. Un tube de 5 mm de diamètre rempli d'eau a été inséré parallèlement à la souris afin de servir de référence. Pour l'imagerie *in vivo*, une séquence T_2^* à écho de gradient a été utilisée avec les paramètres suivants : $T_R=300$ ms, $T_E=5$ ms, angle de basculement = 30° , matrice 256x256, tranches d'épaisseur 14,1 mm, BW=105 Hz, nombre de mesures=8, champ de vue=4x4 cm. Cette séquence a permis d'enregistrer des images transversales de l'abdomen avant et 15 min après injection des MPNH_{0,1,2,3}-COOH. Une image référence de chaque souris a été enregistrée avant injection, elle a permis de déterminer l'évolution du contraste du foie et de la rate due à la présence des MPNH. Pour les foies, la mesure de ces contrastes a été réalisée en dessinant deux régions d'intérêt (ROI) ne comprenant pas de vaisseau sanguin dans le parenchyme hépatique de chaque souris. Pour les rates, la surface totale a été sélectionnée.

m) Etudes *ex vivo*

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale 24 h après avoir reçu l'injection de nanoparticules. Le foie, la rate, les reins, le cœur, les poumons et la carcasse ont été pesés. Une acquisition optique pour mesurer la luminescence de chaque organe a été réalisée après illumination de 2 min avec la DEL orange. La semi-quantification de la distribution des nanoparticules dans les organes a été réalisée en utilisant le logiciel M3Vision de Biospace Lab.

n) Marquage et vectorisation cellulaire

Des cellules RAW 264.7 cultivées dans une flasque T25 sont exposées à du milieu de culture DMEM complétement avec 10 % de sérum de veau foetal contenant $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ de MPNH₁-NH₂ pendant 6 h. Après rinçage des puits avec du milieu de culture, les cellules sont décollées à l'aide de trypsine-EDTA. Celles-ci sont ensuite centrifugées à 240 g et resuspendues dans du milieu de culture dans un eppendorf. Elles sont ensuite illuminées avec une DEL rouge pendant 2 min et la luminescence persistante est enregistrée dans une caméra Optima (Biospace Lab.).

o) Tests de cytotoxicité au MTT

La lignée cellulaire ayant servi aux tests de cytotoxicité est celle de macrophages murins RAW 264.7, cultivée dans du DMEM complétement avec du sérum de veau foetal (10% en volume) et 1% de penicilline/streptomycine, dans une atmosphère à 5% en CO₂ et à 37°C. Pour un test MTT, des cellules sont déposées sur des plaques 96 puits (Falcon, Strasbourg, France) à une densité de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits dans du milieu complet pendant 24 h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu complet contenant des concentrations croissantes de nanoparticules et 6 ou 24 h plus tard celui-ci est enlevé et du milieu complet contenant $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) est ajouté pendant 2 h à 37°C. Le milieu est de nouveau enlevé et les cristaux de formazan sont dissous par ajout de DMSO. Enfin après 15 min les surnageants sont transférés dans une plaque propre pour éviter la perturbation du test par la présence de nanoparticules au fond des puits. L'absorbance lue à 562 nm en utilisant un lecteur de plaque EL340 (BioTek Instruments, USA) ou Infinite F2000 Pro (TECAN Instruments, Suisse) permet de déterminer la viabilité cellulaire dans chacune des conditions.

V. MARQUAGE ET SUIVI CELLULAIRE

1) <u>Introduction</u>	p. 142
a) Le marquage cellulaire	p. 142
i. Le marquage passif	p. 143
ii. Le marquage actif	p. 144
b) La toxicité	p. 145
i. Le MTT	p. 145
ii. Le WST-8	p. 146
iii. L'Alamar Blue	p. 147
iv. La cytométrie en flux	p. 147
v. Le bleu de trypan	p. 148
c) Le suivi cellulaire <i>in vivo</i>	p. 148
2) <u>Travaux préliminaires : marquage et toxicité des ZGO</u>	p. 149
a) Internalisation	p. 149
b) Toxicité	p. 152
i. Le problème de l'absorbance : influence sur le MTT	p. 153
ii. Interaction nanoparticules/MTT et WST-8	p. 157
iii. Alamar Blue	p. 162
iv. Cytométrie en flux	p. 166
v. Le test au bleu de trypan	p. 167
c) Suivi cellulaire <i>in vivo</i>	p. 167
3) <u>Marquage cellulaire et toxicité <i>in vitro</i> des MPNH</u>	p. 169
a) Toxicité	p. 169
i. Tests MTT	p. 170
ii. Tests Alamar Blue	p. 174
iii. Comment expliquer les différences MTT/AB	p. 177
iv. Tests de prolifération cellulaire	p. 178
b) Internalisation	p. 180
i. Microscopie électronique	p. 180
ii. Expérience de magnétophorèse	p. 184
iii. Expérience d'IRM	p. 185
iv. Mesure de luminescence	p. 186
c) Evaluation des propriétés cellulaires	p. 187
i. Capacité de migration	p. 187
ii. Capacité à former des ébauches vasculaires	p. 190
4) <u>Vectorisation magnétique <i>in vivo</i></u>	p. 193
5) <u>Conclusion</u>	p. 199
6) <u>Limites et perspectives de la vectorisation cellulaire avec les MPNH</u>	p. 200
7) <u>Section expérimentale</u>	p. 201

Cette deuxième partie de résultats s'intéresse à l'utilisation des MPNH précédemment décrits pour vectoriser des cellules *in vivo*. Une fois ces nano-outils multimodaux synthétisés et caractérisés, je me suis penché sur la possibilité de les utiliser pour marquer des cellules ayant un intérêt thérapeutique.

Tout d'abord, je vais discuter l'intérêt d'utiliser certaines cellules pour faire de la thérapie. Arriver à suivre voire vectoriser ces cellules *in vivo* est une étape importante dans la compréhension de leur action thérapeutique. Je présenterai ensuite des expériences préliminaires réalisées avec des ZGO avant de marquer des cellules d'intérêt avec des MPNH.

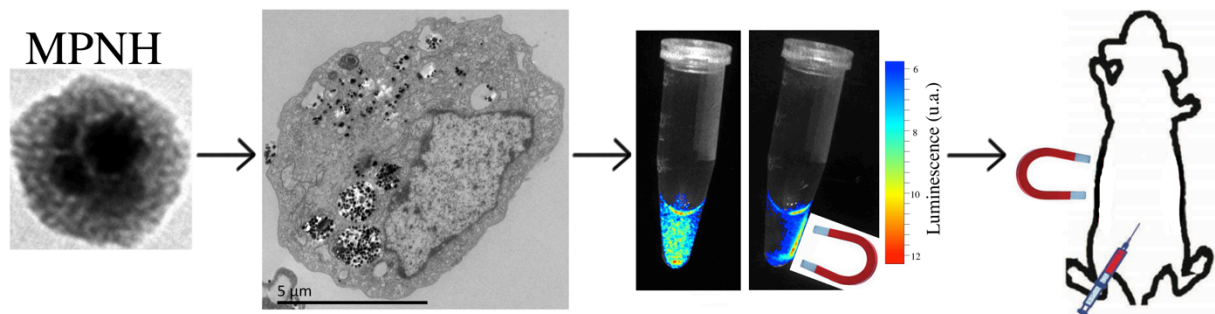


Figure 5.1. Représentation schématique de la démarche abordée dans cette partie. Du marquage cellulaire à la vectorisation *in vivo*.

1) Introduction

L'utilisation de cellules comme outil thérapeutique représente aujourd'hui une approche prometteuse. L'application clinique la plus courante est la transplantation de moelle osseuse chez des patients qui ont un lymphome, une leucémie, une aplasie médullaire ou chez les enfants nés avec une immunodéficiência innée (parfois appelés enfants-bulles). Les applications potentielles sont nombreuses^{342,343} et on peut citer des travaux ouvrant des perspectives dans des domaines variés :

- les accidents vasculaires cérébraux³⁴⁴ ou les infarctus du myocarde,³⁴⁵
- les maladies génétiques,³⁴⁶
- en rhumatologie pour traiter des dysplasies squelettiques,³⁴⁷ ou des dommages cartilagineux,³⁴⁸
- le traitement du diabète,³⁴⁹
- en hépatologie comme traitement de l'insuffisance hépatique,³⁵⁰
- en neurologie pour favoriser la régénération neuronale chez des patients atteints de la maladie de Parkinson³⁵¹ ou pour diminuer la démyélinisation observée chez des patients atteints de sclérose en plaques.³⁵²

Les perspectives de thérapies cellulaires à partir de cellules provenant du malade sont aussi ambitieuses que le remplacement de certaines allogreffes, évitant ainsi les complications des transplantations que sont le risque de rejet, le traitement par immunosuppresseurs et le risque inhérent au don d'organe.^{353,354}

Cependant, pour se diriger vers l'utilisation de telles techniques, aussi bien en recherche préclinique qu'en clinique, il est important de comprendre le devenir de ces cellules une fois transplantées *in vivo*. Pour cela, il est nécessaire de mettre au point des protocoles de marquages reproductibles et efficaces, peu toxiques et permettant un suivi facile des cellules à moyen ou long terme *in vivo*.

a) Le marquage cellulaire

On peut diviser les techniques de marquage en deux catégories principales : la modification génétique des cellules d'intérêt et les marqueurs exogènes. Le marquage

³⁴² D. S. Krause et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001, 105, 369.

³⁴³ M. F. Pittenger et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, 284, 143.

³⁴⁴ O. Y. Bang et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol*. 2005, 57, 874.

³⁴⁵ K. C. Wollert et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004, 364 (9429), 141.

³⁴⁶ R. A. Sandhaus. Gene therapy meets stem cells. *N. Engl. J. Med*. 2012, 366, 567.

³⁴⁷ E. M. Horwitz et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001, 97 (5), 1227.

³⁴⁸ P. K. Gupta et al. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res. Ther*. 2012, 3, 25.

³⁴⁹ M. A. Hussain & N. D. Theise. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet*. 2004, 364, 203.

³⁵⁰ E. Lagasse et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med*. 2000, 6, 1229.

³⁵¹ J.-H. Kim et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002, 418, 50.

³⁵² A. Uccelli et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol*. 2011, 10 (7), 649.

³⁵³ P. Macchiarini et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008, 372, 2023.

³⁵⁴ P. Bianco & P. Gheron Robey. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001, 414, 118.

génétique consiste à insérer un gène codant pour une protéine fluorescente ou une enzyme bioluminescente. On utilise généralement la GFP (une protéine fluorescente verte) ou la luciférase (une enzyme facile à localiser par chimiluminescence *in vivo* en injectant son substrat, la luciférine).³⁵⁵ L'avantage principal est qu'une fois que le marquage génétique est effectué efficacement, l'expression des protéines d'intérêt est transmise de manière stable au fil des divisions cellulaires.³⁵⁶ Cependant, le suivi de cellules marquées génétiquement ne peut se faire qu'en optique. Elles permettent difficilement d'envisager des applications au-delà du petit animal, d'autant plus qu'elles peuvent perturber l'expression du génome des cellules transfectées et entraîner des changements dans leurs fonctions et leurs propriétés.³⁵⁷

Les marqueurs exogènes sont principalement des nanoparticules utilisées en imagerie biomédicale.³⁵⁸ Il existe deux catégories de marquage cellulaire : le marquage passif et le marquage actif.³⁵⁹

i. Le marquage passif

Une incubation prolongée des cellules avec les nanoparticules en suspension dans le milieu permet leur internalisation passive. L'efficacité de cette méthode semble dépendre du recouvrement de surface mais aussi du type de cellules que l'on veut marquer. En effet, seules les cellules capables d'endocytose, de pinocytose ou de phagocytose peuvent être marquées passivement.³⁶⁰ La phagocytose est une voie d'internalisation qui ne concerne que certaines cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les monocytes et les neutrophiles.³⁶¹ C'est un mécanisme qui dépend de la particule en contact avec la cellule et des protéines qui sont adsorbées à sa surface. D'autres mécanismes d'internalisation existent, et sont présents chez toutes les cellules de mammifères, bien que toutes n'aient pas la même capacité d'internalisation. Ces autres voies d'internalisation sont regroupées sous le terme de pinocytose (Figure 5.2).

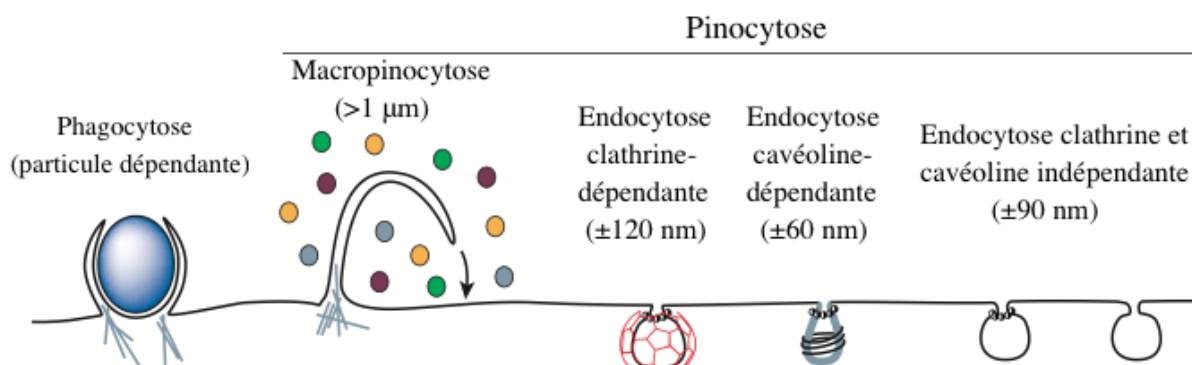


Figure 5.2. Représentation schématique des différentes voies d'internalisation cellulaire, celles-ci diffèrent par les tailles des vésicules d'endocytose, la nature du substrat internalisé et le mécanisme de formation des vésicules. (Adapté de 361)

³⁵⁵ M. Chalfie et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994, 263, 802.

³⁵⁶ G. Guasch & C. Blanpain. Les cellules souches épidermiques organisent leur niche. *Med. Sci.* 2004, 20, 265.

³⁵⁷ H.-S. Liu et al. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 260, 712.

³⁵⁸ C. Liang et al. Stem cell labelling and tracking with nanoparticles. *Part. Part. Syst. Charact.* 2013, 30, 1006.

³⁵⁹ V. Dousset et al. How to trace stem cells for MRI evaluation? *J. of the Neurological Sciences*. 2008, 265, 122.

³⁶⁰ B. Doche de Laquintane et al. Iron particle labeling of haematopoietic progenitors cells: an *in vitro* study. *Biosci. Rep.* 2002, 22, 549.

³⁶¹ S. D. Conner & S. L. Schmid. Regulated portals of entry into the cells. *Nature*. 2003, 422, 37.

On distingue la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante, l'endocytose cavéoline dépendante et l'endocytose clathrine et cavéoline indépendante. Ces mécanismes permettent d'internaliser des objets faisant jusqu'à 1 μm , 120 nm, 60 nm et 90 nm, respectivement.³⁶¹ La macropinocytose est un phénomène très peu sélectif contrairement aux endocytoses clathrine ou cavéoline dépendantes qui sont récepteurs dépendantes.

ii. Le marquage actif

Il existe plusieurs techniques pour provoquer l'internalisation de nanoparticules par des cellules :

- les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées avec un peptide de pénétration cellulaire tel que la Pénétratine (troisième hélice de l'homéodomaine du facteur de transcription *Antennapedia*),³⁶² le Transportan (un hybride constitué d'une section du neuropeptide galanine et du venin de guêpe mastoparan reliés par une lysine)³⁶³ ou encore le peptide constitué des résidus 48 à 60 de la protéine HIV-1 Tat (transactivateur de la transcription qui possède un domaine de transduction protéique lui permettant de traverser les membranes cellulaires).³⁶⁴ Si cette stratégie est adoptée, il est nécessaire de s'assurer que le peptide utilisé n'entraîne pas de toxicité cellulaire. Des agents de contraste à base d'oxyde de fer ont ainsi été retrouvés dans le noyau de cellules CD34+.³⁶⁵ Mais la présence de nanoparticules dans le noyau peut aussi augmenter leur toxicité cellulaire en interagissant directement avec le patrimoine génétique de la cellule. Des cargos biomimétiques, telles que des microvésicules cellulaires chargées d'agents thérapeutiques se sont récemment avérés efficaces pour marquer des cellules.^{366,367} On peut imaginer que des cellules n'ayant pas la capacité de phagocytose et une faible activité de macropinocytose puissent être marquées via cette technique. Les nanoparticules sont alors préalablement incubées avec des cellules par internalisation passive avant d'être stressées mécaniquement ou par manque de nutriments afin de libérer ces vésicules remplies de nanoparticules. Enfin, les cellules à marquer sont incubées avec ces vésicules, dont les protéines de surface (qui dépendent du type cellulaire les ayant produites) vont faciliter leur internalisation.

- des techniques de perméabilisation temporaire de la membrane telles que l'électroporation permettent une accumulation cytoplasmique rapide des marqueurs.³⁶⁸

La méthode d'internalisation utilisée dans mon travail est celle d'incubation des nanoparticules avec les cellules. Les principaux facteurs influençant fortement l'internalisation des particules sont leur taille, leur charge surfacique, les fonctions chimiques de surface et la lignée cellulaire utilisée.^{361,369,370}

³⁶² A. Prochiantz. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr. Op. Neurobiology*. 1996, 6, 629.

³⁶³ M. Pooga et al. Cell penetration by transportan. *FASEB*. 1998, 12, 67.

³⁶⁴ J. J. Turner et al. RNA targeting with peptides conjugates of oligonucleotides, SiRNA and PNA. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2007, 38, 1.

³⁶⁵ M. Lewin et al. TAT peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow *in vivo* tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 410.

³⁶⁶ N. Luciani et al. The role of cell-released microvesicles in the intercellular transfer of magnetic nanoparticles in the monocyte/macrophage system. *Biomaterials*. 2010, 31, 7061.

³⁶⁷ A. K. Andriola Silva et al. Cellular transfer of magnetic nanoparticles via cell microvesicles: impact on cell tracking by magnetic resonance imaging. *Pharm. Res.* 2012, 29, 1392.

³⁶⁸ P. Walczak et al. Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn. Reson. Med.* 2005, 54, 769.

³⁶⁹ D. L. J. Thorek & A. Tsourkas. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*. 2008, 29, 3583.

b) La toxicité

Un point primordial concernant l'utilisation d'agents de contraste pour marquer et suivre des cellules *in vivo* est que l'agent utilisé soit inoffensif pour la cellule et ne perturbe pas ses propriétés intrinsèques (le métabolisme, l'intégrité de la membrane, la viabilité)³⁵⁹ ainsi que pour l'organe ciblé et l'organisme entier. Pour cette raison les nanoparticules d'oxyde de fer semblent être la solution la plus prometteuse pour une éventuelle application en thérapie cellulaire chez l'homme.³⁷¹ En effet, elles sont utilisées comme produit de contraste chez l'homme, notamment chez des patients atteints de sclérose en plaques³⁷² ou pour observer l'infiltration de macrophages dans des zones altérées de la barrière hématoencéphalique.³⁷³ La toxicité peut être dépendante de très nombreux facteurs : la composition et la dégradation, le recouvrement ou encore la forme des nanoparticules. Ceci a notamment été démontré en utilisant des USPIO de différentes formes (billes, batonnets ou sphères) à la même concentration.³⁷⁴

Il existe de nombreux tests permettant d'évaluer la toxicité de nanoparticules. Parmi les tests que nous avons utilisés, nous pouvons distinguer les tests au cours desquels un réactif est transformé par les cellules viables (dont les noms sont MTT, WST-8 ou Alamar Blue) et les tests basés sur le marquage des cellules viables ou mortes à l'aide d'une substance colorée ou fluorescente (cytométrie en flux ou bleu de trypan).

Deux tests basés sur le marquage de cellules mortes ont été utilisés. Il s'agit de tests de cytométrie en flux et de marquage au bleu de trypan. Ceux-ci utilisent la fixation et la pénétration de substances à la surface et dans la cellule pour déterminer la viabilité.

i. Le MTT

Le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) est certainement un des plus connus. Pour ce test, des plaques 96 puits sont d'abordensemencées avec 10^3 à 10^5 cellules. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant différentes concentrations en nanoparticules. A la fin du temps d'incubation, les puits sont ainsi vidés et peuvent être éventuellement lavés, avec le risque de décoller certaines cellules. Puis du milieu contenant du MTT est ajouté pendant quelques heures.

Il est souvent dit que le MTT est réduit par la succinate déshydrogénase,^{375,376,377} une enzyme mitochondriale, mais ce n'est pas le cas.³⁷⁵ La mitochondrie est d'ailleurs plutôt

³⁷⁰ K. Kettler et al. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014, 33 (3), 481.

³⁷¹ E. Bull et al. Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 2014, 9, 1641.

³⁷² V. Dousset et al. MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultrasmall-particle iron oxide and compared with gadolinium. *Am. J. Neuroradiol.* 2006, 27, 1000.

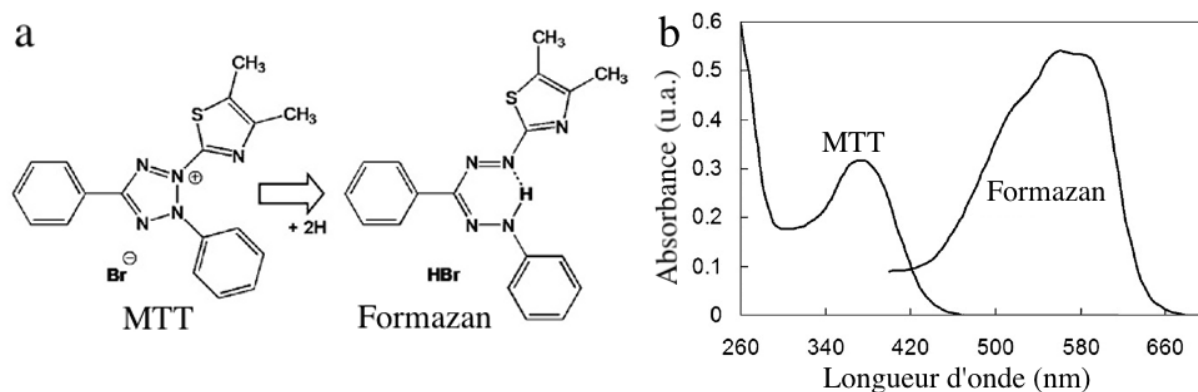
³⁷³ K. G. Petry et al. MRI of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics.* 2007, 4, 434.

³⁷⁴ M. Mahmoudi et al. A new approach for the *in vitro* identification of the toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010, 75 (1), 300.

³⁷⁵ M. V. Berridge et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica.* 1996, 4, 14.

³⁷⁶ P. Wang et al. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *Plos One.* 2010, 5 (4), e10202.

considérée comme un organite cellulaire aux propriétés oxydantes.³⁷⁸ De nombreuses substances intra-cellulaires (acide dihydrolipoïque ou ascorbique, tocophérols, cystéine, glutathion, ubiquinone) semblent pouvoir réduire le MTT,^{379,380} mais le principal responsable de cette transformation est vraisemblablement la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Le NADH est formé lors de l'oxydation d'une molécule de glucose en CO₂ et H₂O. Il joue ensuite le rôle de coenzyme d'oxydoréduction au sein du complexe I de la chaîne respiratoire.³⁸¹ Il est improbable de considérer que ce test donne une idée fiable de l'activité mitochondriale.³⁸⁰ Le MTT semble être principalement réduit dans le cytoplasme par le NADH notamment associé au réticulum endoplasmique, mais aussi à des endosomes ou lysosomes, ou encore à la membrane plasmique, et dans une moindre mesure par le NADH phosphate (ou NADPH) présent dans le cytoplasme.^{375,380} Le MTT, une fois réduit, se transforme en formazan qui précipite pour donner des cristaux violets. Ces cristaux doivent être redissous (par exemple dans du DMSO) afin de les quantifier en mesurant l'absorbance (ou densité optique) de la solution autour de 550-600 nm (Figure 5.3). Un calcul simple permet ensuite de déterminer la viabilité cellulaire à partir de la valeur d'absorbance.



ii. Le WST-8

Des modifications chimiques du sel de tétrazolium MTT ont pu rendre le formazan correspondant soluble dans l'eau. Ces dérivés du MTT sont appelés WST, pour "water-soluble tetrazolium". Mais ces modifications chimiques consistent en un ajout de groupes chargés négativement, ce qui les empêche de traverser les membranes cellulaires.³⁷⁹ Il est donc nécessaire d'ajouter au milieu un médiateur, qui va être réduit à l'intérieur de la cellule, notamment par le NADH,³⁸² puis réduire le WST en surface des cellules. Parmi les WST développés, j'ai utilisé le (2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium de sodium (WST-8, Figure 5.4). La seule différence de protocole entre le MTT et ce test est qu'il n'y a pas besoin de changer

³⁷⁷ S. Aroui et al. Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. *Chem. Biol. Interact.* 2016, 244, 195.

³⁷⁸ E. Cadenas & K. J. A. Davies. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free. Radic. Biol. Med.* 2000, 29, 222.

³⁷⁹ M. V. Berridge et al. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005, 11, 127.

³⁸⁰ J. C. Stockert et al. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012, 114, 795.

³⁸¹ P. R. Rich. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem. Soc. Trans.* 2003, 31, 1095.

³⁸² R. Hisada & T. Yagi. 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate. *J. Biochem.* 1977, 82, 1469.

le milieu après incubation avec les nanoparticules. Il suffit d'ajouter un volume déterminé afin d'obtenir une solution à la bonne concentration en WST-8 dans chaque puits. L'absorbance est ensuite lue à travers les puits entre 450 et 500 nm.

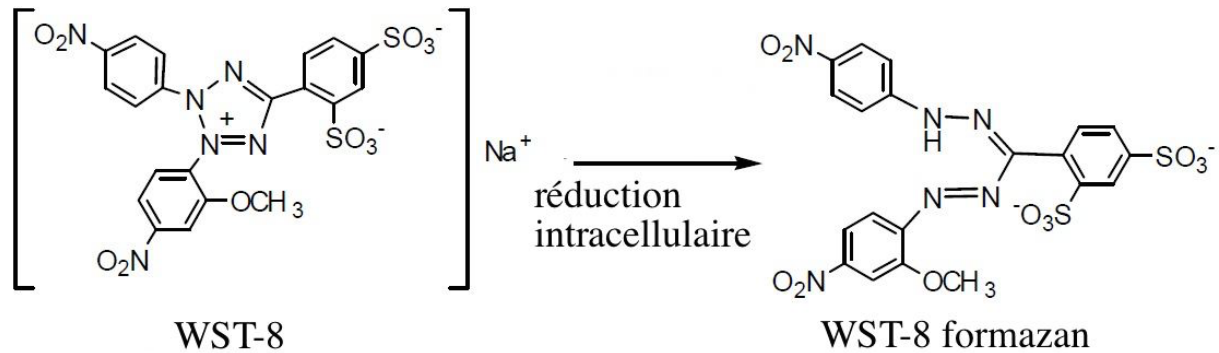


Figure 5.4. Structures chimiques du WST-8 et du formazan correspondant.

iii. L'Alamar Blue

Un autre test permet de s'affranchir de cette l'étape de dissolution du formazan : l'Alamar Blue (AB). Ce test est assez proche du test WST-8 car il consiste à déposer du réactif dans les puits contenant les cellules ayant incubé avec les nanoparticules. Cependant, le réactif de l'AB, la résazurine, n'est pas transformé en résoufurine par les mêmes substances intra-cellulaires que le WST-8 ou le MTT. La résazurine est transformée par des diaphorases : des réductases qui utilisent le NADH et le NADPH comme cofacteurs. Cette réduction (Figure 5.5.a) s'accompagne d'un changement de couleur de la solution (Figure 5.5.b). L'évaluation de la viabilité s'effectue ensuite par mesure de fluorescence ($\lambda_{exc} = 530 \text{ nm} / \lambda_{ém} = 590 \text{ nm}$).

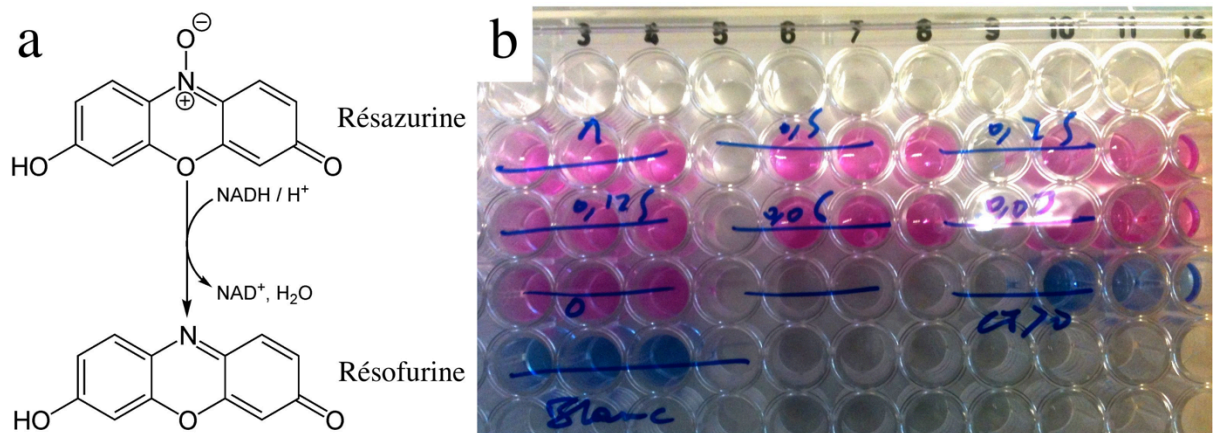


Figure 5.5. Caractéristiques du test AB. a) Structure de la résazurine et de la résoufurine. b) La résazurine initialement bleue, est transformée en résoufurine rose par les cellules viables. Les puits contenant des cellules ont ainsi une couleur rose après 2 h d'incubation tandis que les puits ne contenant pas de cellules ou contenant des cellules traitées avec du DMSO restent bleus, car la résazurine n'y est pas transformée.

iv. La cytométrie en flux

Le MTT est un test dont le résultat est lié à la production de certaines substances intracellulaires tandis que la cytométrie de flux utilise des marqueurs de l'apoptose. Le réactif utilisé en cytométrie contient deux substances fluorescentes :

- l'annexine V-FITC se lie à la phosphatidylsérine, un phospholipide des membranes plasmiques exposé au milieu extracellulaire lors du phénomène d'apoptose,

- l'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN, il s'y lie lorsque les membranes des cellules deviennent poreuses lors du phénomène de nécrose.

Après une incubation classique des cellules avec les nanoparticules, les cellules sont décollées avec de la trypsine-EDTA et après ajout de milieu complété, elles sont mélangées avec une solution contenant de l'annexine-V-FITC et de l'iodure de propidium. Puis une lecture en fluorescence est réalisée à l'aide d'un cytomètre.

v. Le bleu de trypan

Le bleu de trypan est un colorant qui s'utilise de manière similaire à l'annexin-V ou à l'iodure de propidium. Le test de toxicité au bleu de trypan est identique à celui réalisé avec un cytomètre. Après traitement avec de la trypsine, les cellules sont mélangées à une solution de bleu de trypan dans le PBS et les cellules doivent être comptées au microscope ou à l'aide d'un appareil qui différencie les cellules bleues des cellules non colorées. Le bleu de trypan donne une indication sur l'intégrité de la membrane cellulaire. Il pénètre uniquement les cellules dont la membrane est altérée.³⁸³ Il peut être utilisé pour marquer des cellules après une incubation de durée définie ou pour réaliser un test de prolifération cellulaire. Dans ce dernier cas, des puits sontensemencés avec peu de cellules, celles-ci sont marquées avec des nanoparticules, puis comptées à intervalles réguliers au microscope. Le nombre de cellules présentes dans des puits ayant reçu des nanoparticules est comparé à celui de trois puits témoins. Le bleu de trypan sert alors à distinguer les cellules viables des cellules mortes.

c) Le suivi cellulaire *in vivo*

Les principales nanoparticules utilisées pour suivre les cellules *in vivo* sont les particules magnétiques, et quelques particules photoluminescentes telles que les QD et les UCNP.³⁵⁸ Des nanoplateformes multimodales ont aussi été décrites pour le marquage de cellules pluripotentes telles que des cellules souches.^{325,326} Celles-ci sont issues d'embryons ou de prélèvements réalisés chez l'adulte (moelle osseuse, tissus adipeux ou sang de cordon ombilical). Les nanoparticules multimodales sont principalement des nanoparticules magnétiques fluorescentes,^{384,385,386} des CNT fonctionnalisés^{387,388} ou encore des nanoparticules luminescentes et magnétiques basées sur des UCNP.³⁸⁹ Mais le suivi cellulaire *in vivo* à l'aide de nanoparticules multimodales reste peu décrit, surtout lorsque l'injection des cellules se fait de manière non localisée.

Les nanoparticules représentent véritablement des outils intéressants pour suivre des cellules d'intérêt *in vivo*, et elles permettent de répondre à de nombreux problèmes

³⁸³ W. Strober. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015, 111, A3.

³⁸⁴ J. M. Hill et al. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation.* 2003, 108, 1009.

³⁸⁵ L. Wang et al. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(DL-lactic acid-co- α,β -malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials.* 2010, 31, 3502.

³⁸⁶ O. Detante 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 Cell Transl. Med.* 2012, 1, 333.

³⁸⁷ H. Gul et al. Magnetic carbon nanotube labelling for haematopoietic stem/progenitor cell tracking. *Nanotechnology.* 2010, 21, 155101.

³⁸⁸ C. Wang et al. Protamine functionalized single-walled carbon nanotubes for stem cell labeling and *in vivo* Raman/magnetic resonance/photoacoustic triple-modal imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22, 2363.

³⁸⁹ L. Cheng et al. Multifunctional upconversion nanoparticles for dual-modal imaging-guided stem cell therapy under remote magnetic control. *Adv. Funct. Mater.* 2013, 23, 272

rencontrés par les fluorophores organiques. Cependant, les particules fluorescentes autres que celles à upconversion peuvent rencontrer des limites de sensibilité dues à l'autofluorescence des tissus. Il est donc avantageux de travailler avec des nanoparticules dont les longueurs d'onde d'utilisation sont situées dans les fenêtres de transparence des tissus. Les nanoparticules à luminescence persistante développées au laboratoire ont ainsi des propriétés intéressantes. Un autre avantage majeur des nanoparticules luminescentes est aussi leur compatibilité avec les techniques de microscopies optiques, permettant leur détection en histologie. Cette utilisation *ex vivo* est d'une grande utilité lors de travaux de recherches précliniques. Mais les limites sont une dilution des particules lors des divisions cellulaires successives, leur phagocytose par des macrophages après leur relargage par exocytose ou la mort des cellules marquées, qu'elle soit provoquée ou non par la toxicité des nanoparticules.³⁹⁰

2) Travaux préliminaires : marquage et toxicité des ZGO

Les premières tentatives de marquage cellulaire n'ont pas été réalisées avec des MPNH. Initialement, j'ai travaillé sur le marquage de cellules avec des ZGO fonctionnalisées. Le but était d'évaluer l'efficacité du marquage, de vérifier que les nanoparticules étaient internalisées, ainsi que d'évaluer la viabilité cellulaire suite au marquage.

a) Internalisation

Les particules de ZGO arborent des groupes hydroxyles en surface (ZGO-OH), et leur charge est faible à pH neutre. Ces particules peuvent être fonctionnalisées à l'aide d'APTES (ZGO-NH₂, Figures 4.5 et 5.7) et possèdent alors une charge positive importante leur permettant d'être internalisées par des macrophages, contrairement aux ZGO-OH. Initialement, cette internalisation était évaluée par luminescence des cellules après incubation avec les nanoparticules (Figure 5.6). La luminescence pouvait, en réalité, être due au fait que les nanoparticules adhèrent à la surface des cellules et qu'elles soient toujours présentes même après les lavages réalisés pour les enlever.

³⁹⁰ J. V. Frangioni & R. J. Hajjar. *In vivo* tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation*. 2004, 110, 3378.

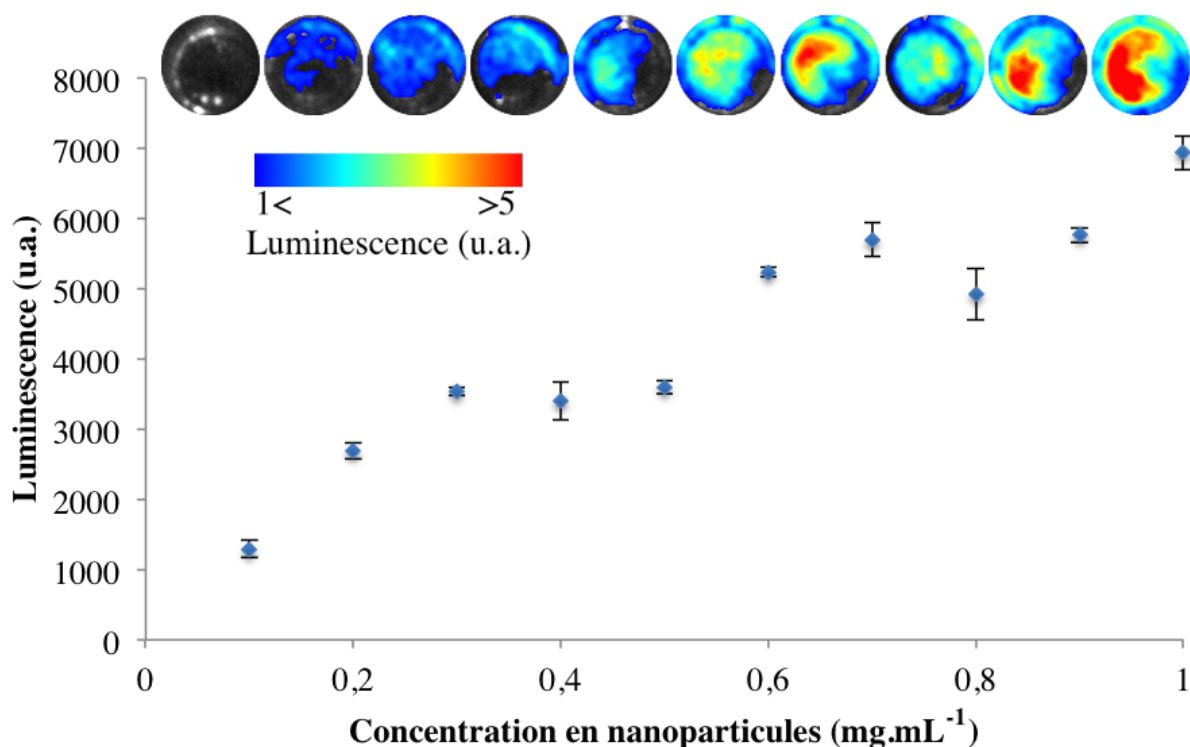


Figure 5.6. Luminescence de puits contenant des cellules RAW ayant incubé 6 h avec des concentrations croissantes de nanoparticules ZGO-NH₂.

Nous avons donc décidé de réaliser une expérience de microscopie confocale pour démontrer que les ZGO-NH₂ étaient bien internalisées par les cellules. Mais les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des ZGO ne correspondaient pas aux filtres du microscope. Nous avons donc greffé de la fluorescéine en surface des ZGO-NH₂ avant de marquer les cellules. Deux voies de synthèse ont été envisagées : en incorporant de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) au milieu réactionnel lors de la condensation d'aminosilane (voie (a), Figure 5.7) ou en le rajoutant après avoir réalisé cette étape de fonctionnalisation (voie (b), Figure 5.7).

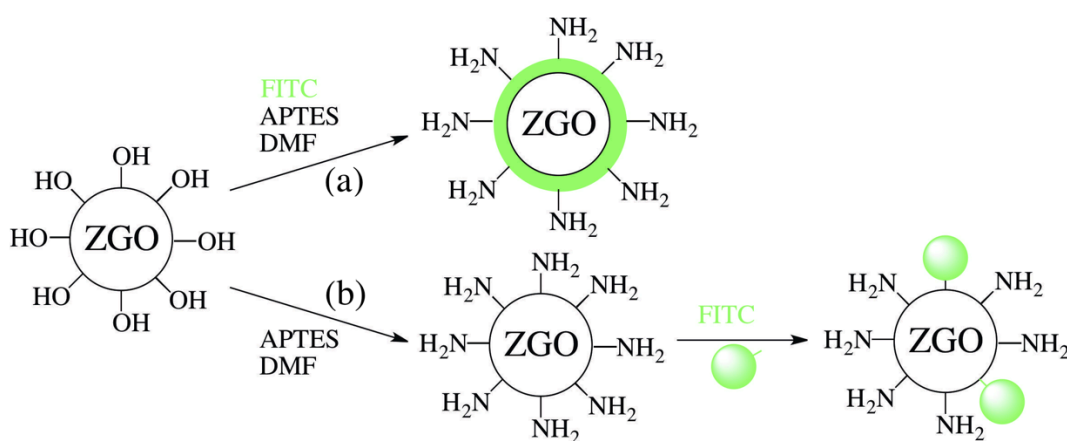


Figure 5.7. Fonctionnalisation de NPLP pour la microscopie confocale.

La première voie de fonctionnalisation rend les images inexploitable en microscopie confocale tant il reste de fluorescéine dans le milieu (Figures 5.8.e et f). En revanche, les images de cellules incubées avec les nanoparticules ZGO-NH₂ fonctionnalisées avec de la FITC (Figure 5.7.b) sont exploitables (Figure 5.8.h et i).

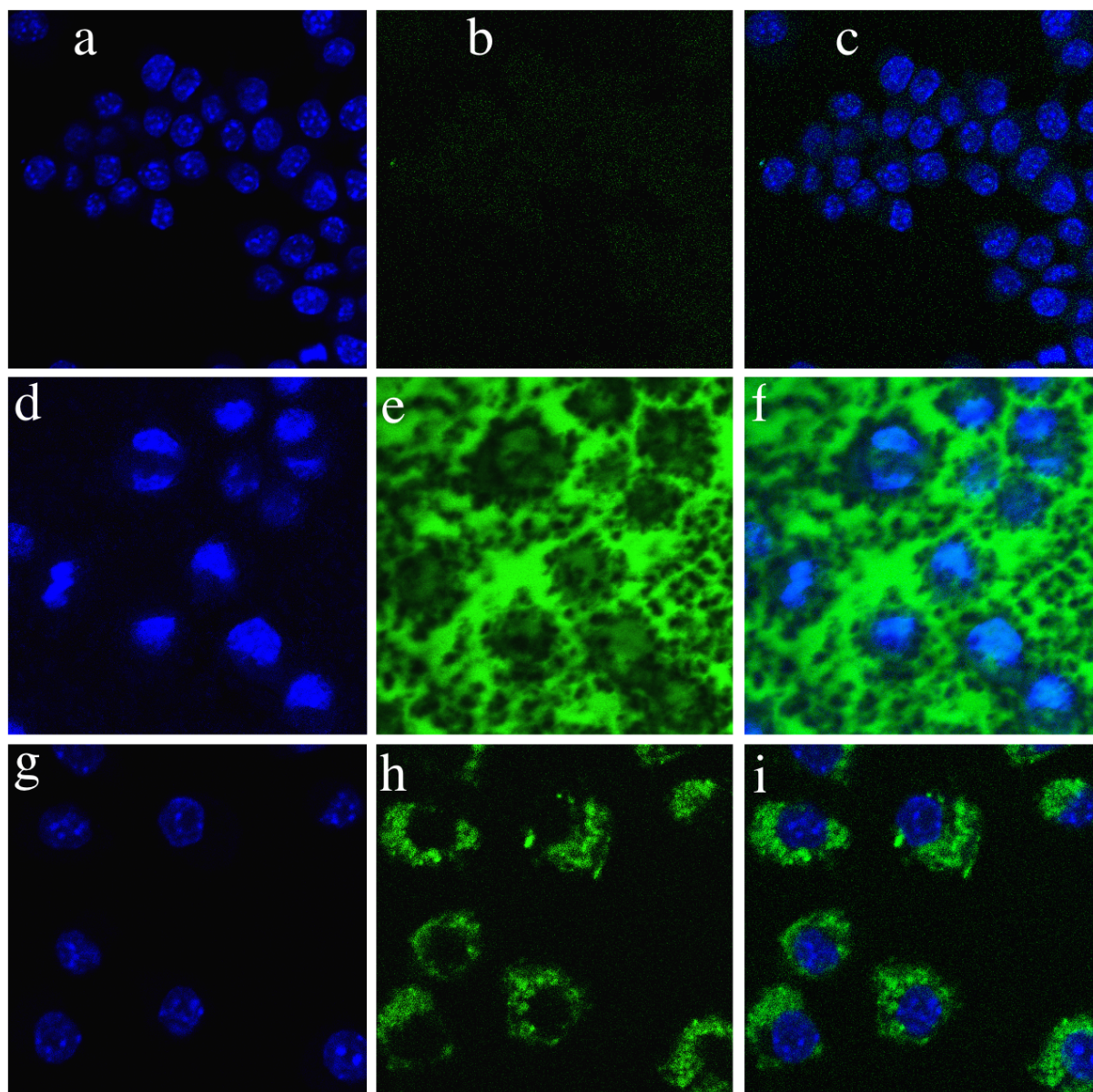


Figure 5.8. Images de microscopie confocale montrant la présence de nanoparticules ZGO marquées avec de la fluorescéine. a-c) Témoin sans fluorescéine. d-f) Marquage avec les ZGO fonctionnalisées avec de la fluorescéine en une (d-f) ou deux (g-i) étapes. Images de fluorescence en observant le TOPRO-3 ($\lambda_{exc}=633$ nm / $\lambda_{em}=656$ nm) (a, d, g) ou la fluorescéine ($\lambda_{exc}=488$ nm / $\lambda_{em}=520$ nm) (b, e, h) et superpositions correspondantes (c, f, i).

Les Figures 5.8.g, h et i montrent bien que la fluorescéine est présente autour des noyaux marqués avec du TOPRO-3, visibles en bleu. L'absence de fluorescence à plus grande distance des noyaux est en faveur d'une internalisation des ZGO marquées avec la fluorescéine par les macrophages. Cependant, nous ne pouvons pas être sûrs que la fluorescéine soit toujours liée de manière covalente aux ZGO-NH₂. Dans ce cas, il est possible que la fluorescéine soit internalisée sans que les particules le soient. De plus, l'ajout de fluorescéine en surface ou dans la couche externe des nanoparticules modifie leur état de surface, et il est difficile de savoir en quoi cette modification perturbe leur internalisation. Nous avons donc décidé de réaliser des expériences de microscopie électronique de macrophages incubés avec des ZGO-NH₂ (Figure 5.9).

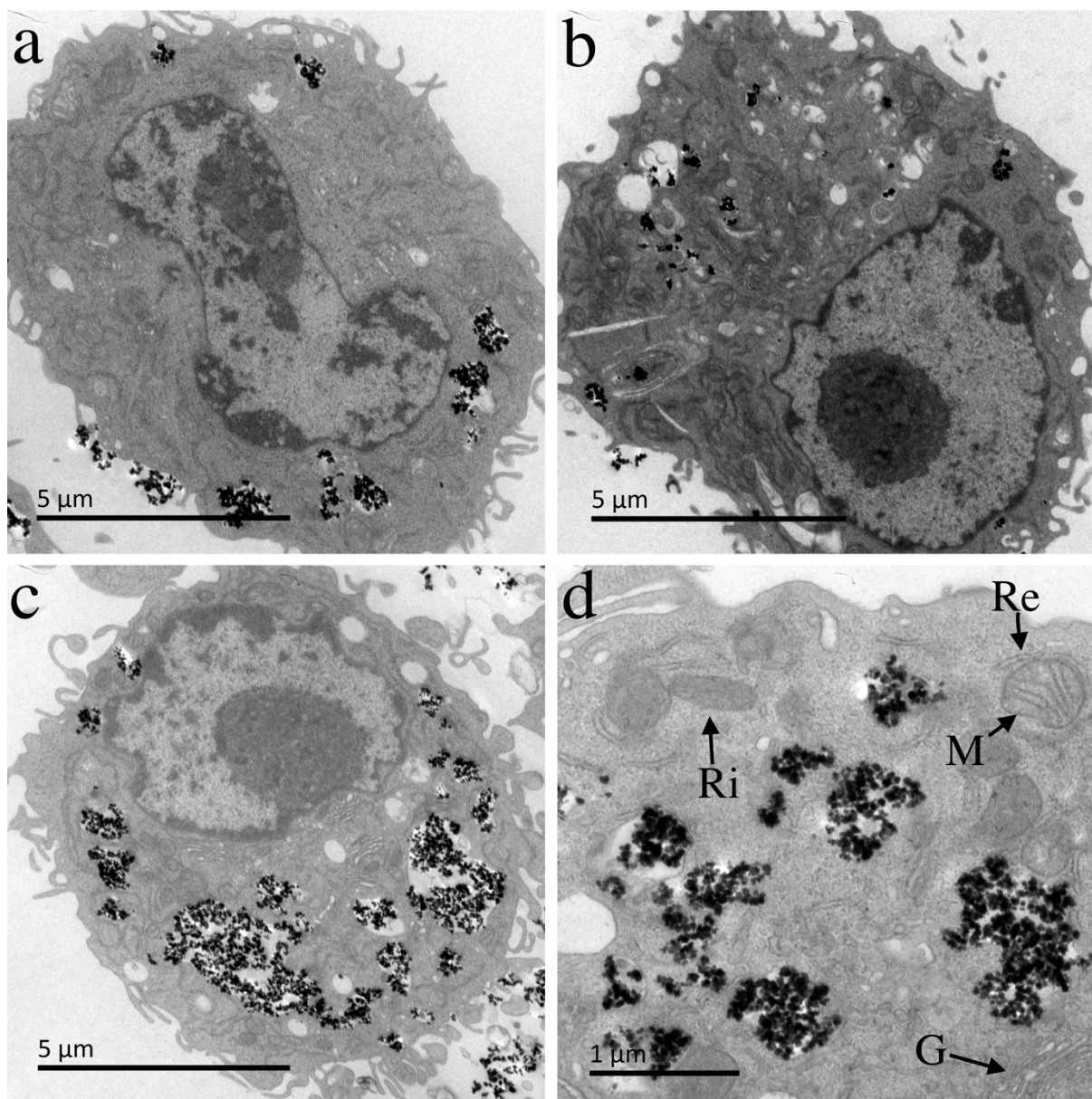


Figure 5.9. Images de MET de macrophages RAW incubés 6 h avec 0,1 (a,b) ou 1,0 (c,d) mg.mL⁻¹ de ZGO-NH₂. d) Agrandissement du cytoplasme de macrophages avec des nanoparticules. On peut observer différents organites intracellulaires tels que le ribosome (Ri), le réticulum endoplasmique (Re), la mitochondrie (M) ou l'appareil de Golgi (G).

Ces images nous ont permis de prouver qu'une incubation des macrophages avec les ZGO-NH₂ permet effectivement leur internalisation. Les ZGO sont regroupées dans de grandes vésicules d'endocytose. De plus, on observe un effet dose attendu : les macrophages ayant incubé 6 h avec 1 mg.mL⁻¹ de ZGO-NH₂ ont internalisé bien plus de nanoparticules que ceux ayant incubé avec 0,1 mg.mL⁻¹.

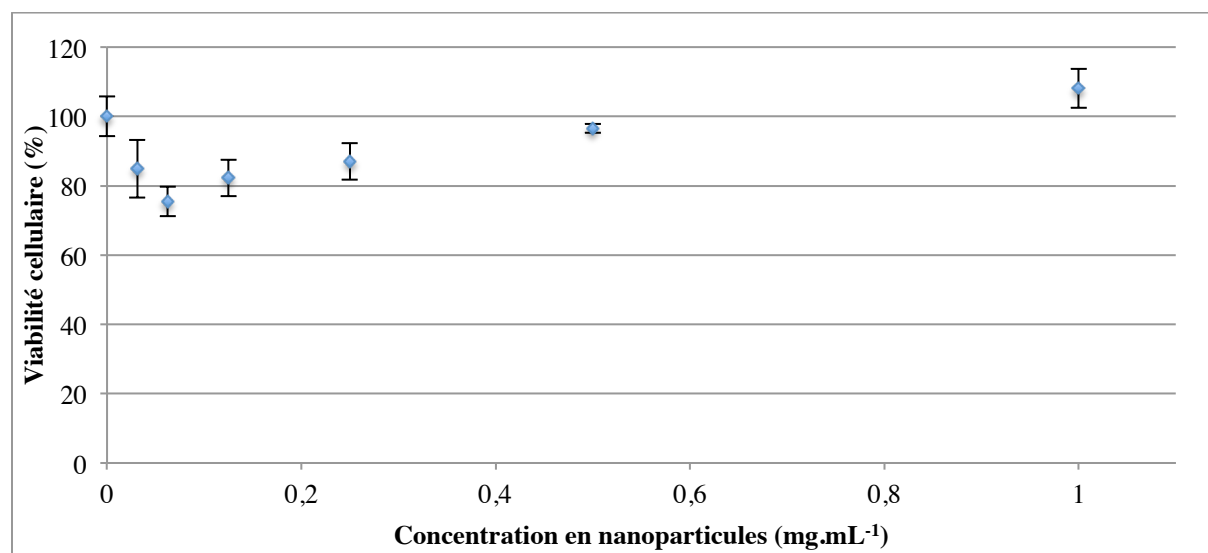
b) Toxicité

Les biais potentiels de toxicité dus aux nanoparticules sont nombreux. Par exemple, les nanoparticules ne sont pas toujours stables en solution. Leur sédimentation sur les cellules peut créer une couche opaque qui va modifier la lecture de l'absorbance et mimer une plus grande viabilité. Il est aussi probable que certaines nanoparticules

interagissent chimiquement avec le réactif et modifient la proportion transformée par les substances intracellulaires. Je vais présenter ici les résultats de tests de toxicité obtenus avec des ZGO-NH₂ et les discuter en essayant dans certains cas de modéliser l'interaction des nanoparticules avec les tests.

i. Le problème de l'absorbance : influence sur le MTT

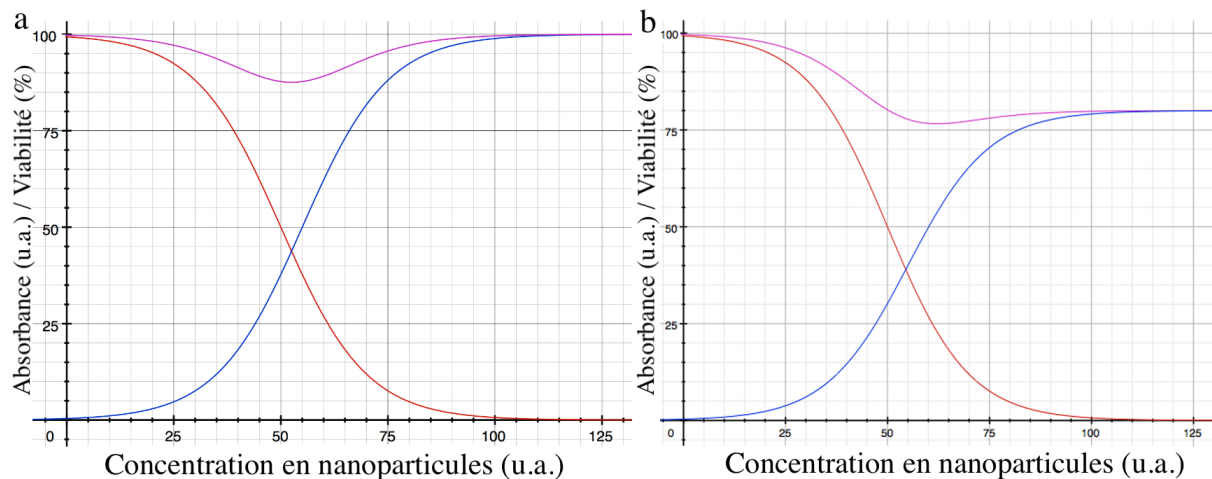
La quantité de formazan formée est évaluée en mesurant son absorbance à 562 nm. Cette mesure est généralement effectuée dans le puits contenant les cellules, donc les nanoparticules internalisées. Ces nanoparticules peuvent aussi sédimenter et adhérer aux cellules ou à la gélatine parfois ajoutée au fond des puits. Ainsi, il est probable que l'absorbance de ces nanoparticules engendre un biais non négligeable. Dans le cas de tests utilisant le WST-8 ou la résazurine (AB), pour lesquels le produit obtenu après transformation par la cellule est soluble, il n'y a pas besoin d'effectuer un changement de milieu supplémentaire et les nanoparticules non internalisées sont aussi présentes. Ces derniers tests risquent d'être encore plus biaisés que dans le cas du MTT, pour lequel un changement de milieu est nécessaire afin de dissoudre les cristaux de formazan. Les premiers tests de toxicité ont été réalisés sur des macrophages (lignées immortalisées RAW 264.7, 6 h d'incubation avec des nanoparticules ZGO-NH₂) et ont donné le résultat suivant (Graphique 5.1).



Graphique 5.1. Tests MTT réalisés sur des cellules RAW 264.7 après 6 h d'incubation avec des ZGO-NH₂ (n = 2).

Le Graphique 5.1 montre le résultat obtenu en moyennant deux tests MTT. Tous les tests de toxicité sont réalisés en mesurant la viabilité dans trois puits pour chaque condition. On constate une courbe en U assez plate. Le Graphique 5.2, ci-dessous, propose une modélisation de la perturbation du MTT par les NPLP en superposant une courbe de toxicité de type sigmoïde (en rouge), avec une courbe théorique représentant l'absorbance des nanoparticules (en bleu). La somme de ces deux courbes est tracée en magenta et représente donc le résultat théorique, dû à la superposition de l'absorbance du formazan et à celles des nanoparticules, obtenu en mesurant l'absorbance au travers du puits contenant ces deux substances en plus des cellules. Ces courbes n'ont pas pour vocation de démontrer un effet, mais me semblent intéressantes pour observer comment deux phénomènes qui se superposent peuvent donner des résultats ressemblant parfois à ceux que j'ai obtenus en faisant mes tests de toxicité. J'ai distingué

ici deux cas, permettant d'obtenir la courbe observée dans le Graphique 5.1 : une courbe en U aplatie (courbe magenta, Graphique 5.2.a). Le second cas modélise un autre résultat obtenu en modifiant l'absorbance des NPLP : on peut visualiser une courbe ressemblant à une sigmoïde allant de 100 à 80 % de viabilité cellulaire (courbe magenta, Graphique 5.2.b). Cependant, les courbes d'absorbance sont très hypothétiques car elles ne ressemblent pas à ce qui est observé habituellement si la loi de Beer-Lambert est respectée. Cette loi stipule qu'à d'assez faibles concentrations, l'absorbance est proportionnelle à la concentration en agent absorbant. A de plus fortes concentrations, ce lien de proportionnalité disparaît et l'absorbance finit par atteindre un maximum.

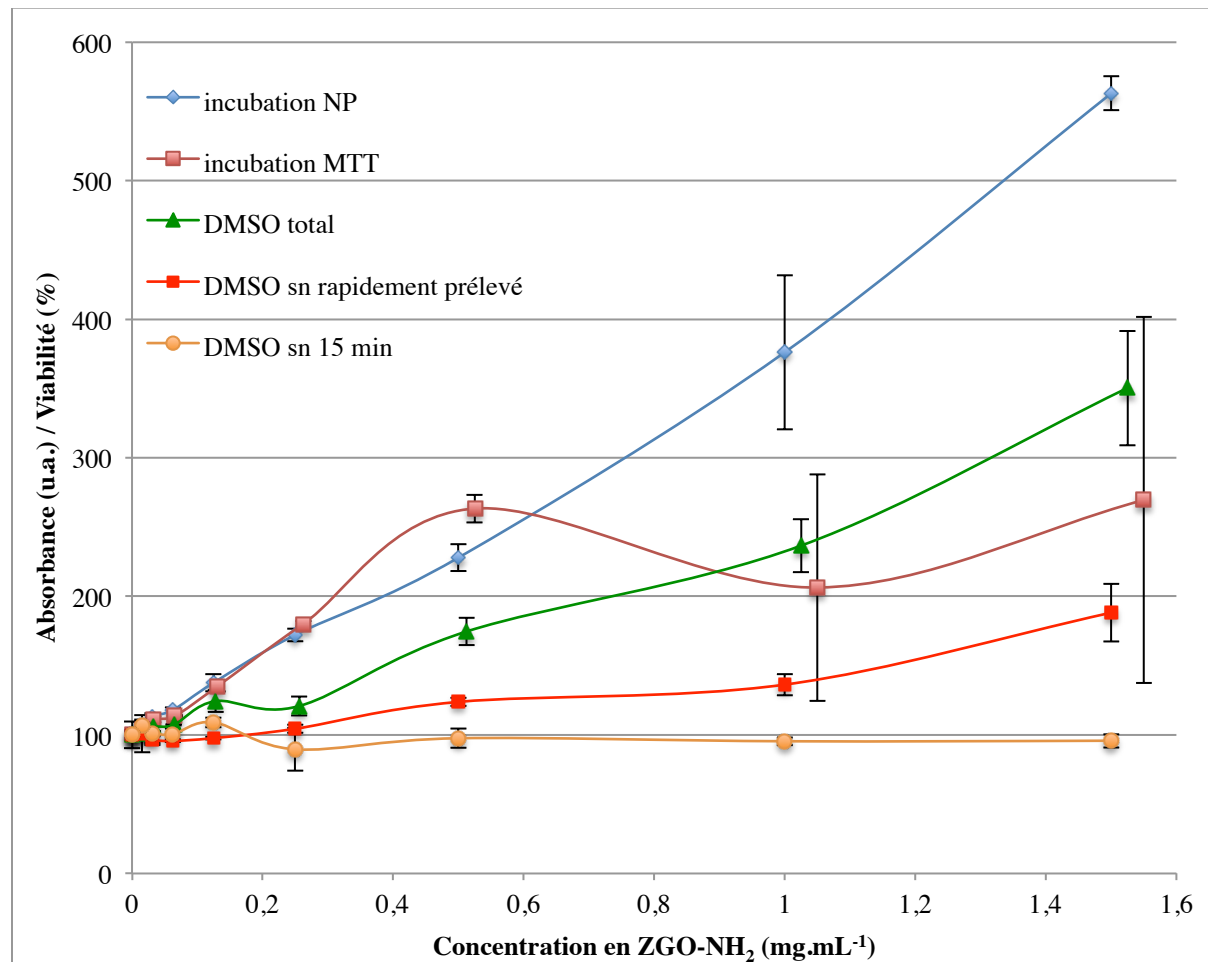


Graphique 5.2. Modélisation de la perturbation du test MTT par la présence des nanoparticules. La toxicité hypothétique est tracée en rouge. Le signal issu de la présence des nanoparticules (absorbance plus une éventuelle perturbation indéterminée) est tracé en bleu. La somme des deux courbes, tracée en magenta, montre le signal auquel ce type de test peut aboutir.

Rappelons que, pour le MTT, le formazan est insoluble dans l'eau, et il faut enlever le milieu après incubation du MTT et rajouter un tampon permettant de solubiliser le formazan dans du DMSO avant de lire l'absorbance au travers des puits. Dans le cas du WST-8 et de l'AB, on peut lire directement l'absorbance au travers des puits. Cependant, il est possible de prélever une fraction du surnageant et de le transférer dans une plaque propre pour lire l'absorbance.

Pour savoir si l'absorbance des nanoparticules respecte la loi de Beer-Lambert, il est nécessaire de réaliser une gamme de concentrations en nanoparticules et d'en mesurer l'absorbance. Cela permet aussi de voir si leur absorbance perturbe le test. Mais il est, d'une part, possible que d'autres biais perturbent ce test et, d'autre part, il est peu probable que l'absorbance due aux nanoparticules aux plus fortes concentrations corresponde exactement à celle obtenue dans un puits où les cellules ne reçoivent pas de nanoparticules. Afin de répondre à cette question, j'ai mis en place un test pour quantifier l'influence de la présence des nanoparticules sur l'absorbance d'une plaque 96 puits. J'ai réalisé ce test sans cellule, en ne déposant que des solutions de ZGO-NH₂ dans les puits. Initialement, lorsqu'on lit l'absorbance à 562 nm de ces puits remplis avec du milieu de culture cellulaire contenant différentes concentrations en nanoparticules, on observe un lien linéaire entre la concentration en ZGO et l'absorbance (losanges bleus "Incubation NP", Graphique 5.3). Puis, après le retournement de la plaque et l'ajout du milieu contenant 0,5 mg.mL⁻¹ de MTT, on voit que la présence des nanoparticules restantes perturbe toujours l'absorbance des puits qui les contiennent (carrés roses "Incubation MTT", Graphique 5.3). Un nouveau

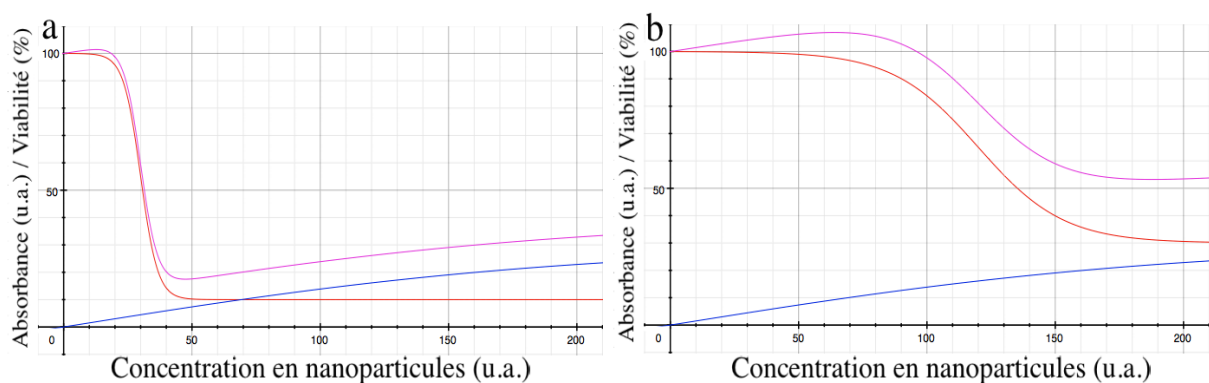
retournement de plaque et l'ajout de DMSO ne change pas grand chose (triangles verts "DMSO total", Graphique 5.3), à moins de prélever la moitié du surnageant 15 min après ajout du DMSO et de le déposer dans des puits propres pour lire l'absorbance (cercles beiges "DMSO sn 15min", Graphique 5.3). Il est nécessaire d'attendre une dizaine de minutes, sans quoi des nanoparticules en suspension seront aussi prélevées, perturbant toujours le test (carrés rouges "DMSO sn rapidement prélevé", Graphique 5.3).



Graphique 5.3. Evolution de l'absorbance dans des plaques 96 puits en condition de test MTT mais en l'absence de cellule afin de mesurer le biais dû à l'absorbance des nanoparticules. Les abscisses de chaque point ont été volontairement décalées de quelques dixièmes d'unité pour des raisons de lisibilité.

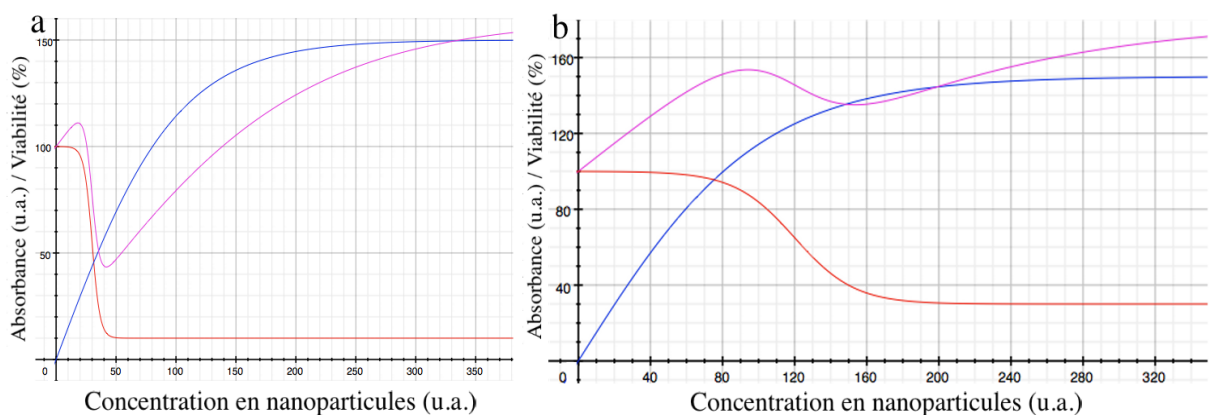
On voit que les nanoparticules de ZGO dans du milieu de culture ont une absorbance linéaire jusqu'aux concentrations les plus élevées (1,5 mg.mL⁻¹, ou plus précisément 440 µg.cm⁻²). Cette linéarité disparaît après les retournements de plaques, qui modifient la quantité de nanoparticules présentes dans chaque puits. On voit aussi que certaines barres d'erreurs sont importantes, elles peuvent être expliquées par le fait que dans certains puits contenant beaucoup de nanoparticules, on voit apparaître un agglomérat au fond du puits. Les valeurs d'absorbance qui y sont mesurées varient alors fortement. Après retournement de la plaque et ajout du réactif MTT, l'absorbance est la même que 2 heures après incubation avec le MTT (résultat non tracé). Cela est rassurant quant à une éventuelle transformation du MTT par les nanoparticules (voir paragraphe suivant : ii. Interactions nanoparticules/MTT et WST-8). Il n'y avait pas de cellule dans ce test, mais l'absorbance due aux nanoparticules doit être comparée à l'absorbance due au formazan libéré par les cellules présentes pendant les tests de toxicité. L'absorbance des nanoparticules peut éventuellement être problématique, on peut distinguer plusieurs

situations dépendant de deux paramètres : l'absorbance des nanoparticules et la quantité de cellules présentes dans chaque puits et leur capacité à transformer le réactif. En effet, si l'absorbance due aux nanoparticules est faible et que la densité de cellules utilisée est élevée, ou qu'elles transforment efficacement le réactif, il est probable que l'absorbance des nanoparticules perturbe peu le test (Graphique 5.4). De plus, on voit l'influence du caractère plus ou moins toxique des nanoparticules sur le résultat d'un tel test. Lorsque les nanoparticules sont très toxiques, on observe la chute de viabilité aux faibles concentrations en nanoparticules, avant qu'elle ne semble réaugmenter (Graphique 5.4.a). Si l'on suppose que les nanoparticules sont peu toxiques, l'absorbance due aux nanoparticules est déjà plus importante lorsque la viabilité baisse, masquant ainsi partiellement leur toxicité (Graphique 5.4.b). Dans ce dernier cas, il est probable qu'une légère augmentation de la viabilité au delà de 100 % soit observée pour de faibles concentrations en nanoparticules.



Graphique 5.4. Influence de l'absorbance de nanoparticules sur un test de toxicité dans le cas où l'absorbance des nanoparticules (courbes bleues) est négligeable devant celle du réactif transformé (MTT, WST-8, AB) par les cellules (courbes rouges). On peut modéliser ce phénomène lorsque les nanoparticules sont très toxiques (a) ou peu toxiques (b). La courbe magenta, représentant le signal théorique mesuré, est obtenue en additionnant les courbes bleue et rouge.

Si l'absorbance due aux nanoparticules est non négligeable devant celle due au réactif transformé, le test sera très fortement perturbé par ce phénomène, (Graphique 5.5). Si les nanoparticules sont très toxiques, la courbe obtenue aura une allure assez surprenante (Graphique 5.5.a). Si elles sont peu toxiques, la courbe obtenue laisse croire que plus il y a de nanoparticules, plus la viabilité augmente (Graphique 5.5.b).

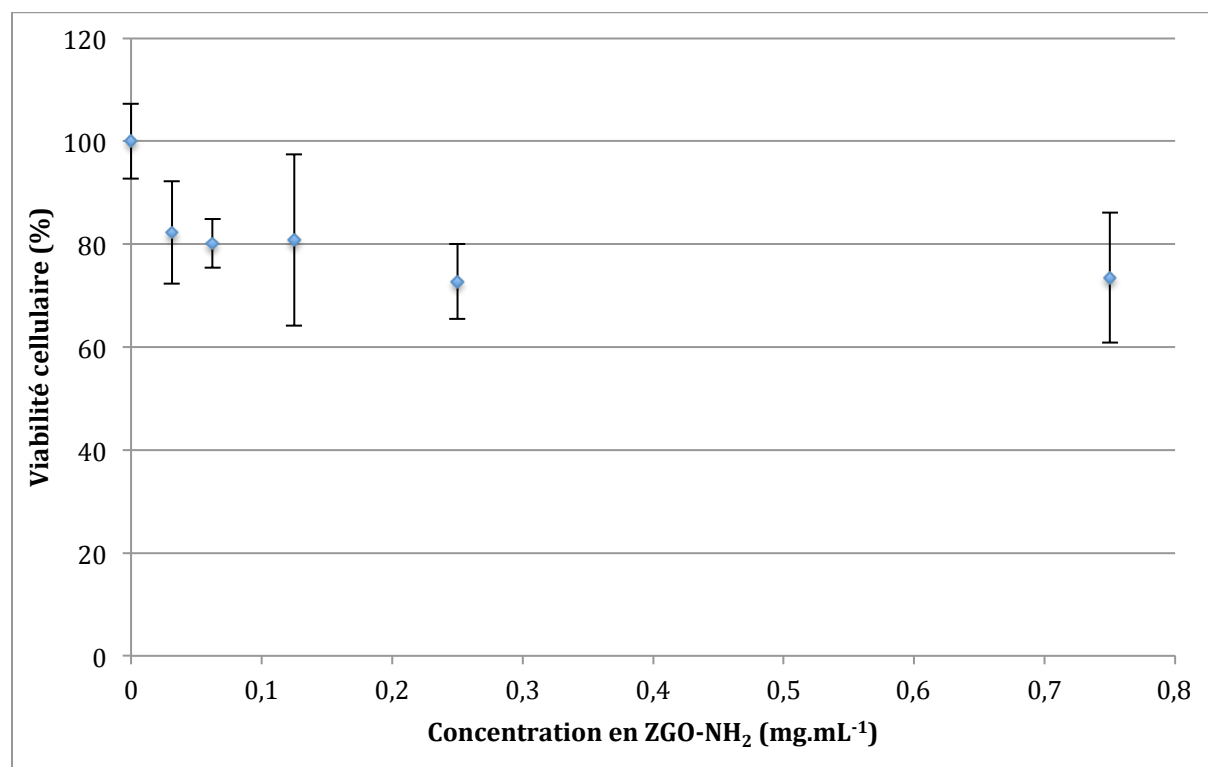


Graphique 5.5. Influence de l'absorbance de nanoparticules sur un test de toxicité dans le cas où l'absorbance des nanoparticules (courbes bleues) est importante devant celle du réactif transformé (MTT, WST-8, AB) par les cellules (courbes rouges). On peut modéliser ce phénomène lorsque les nanoparticules sont très toxiques (a) ou peu toxiques (b). La courbe magenta, représentant le signal théorique mesuré, est obtenue en additionnant les courbes bleue et rouge.

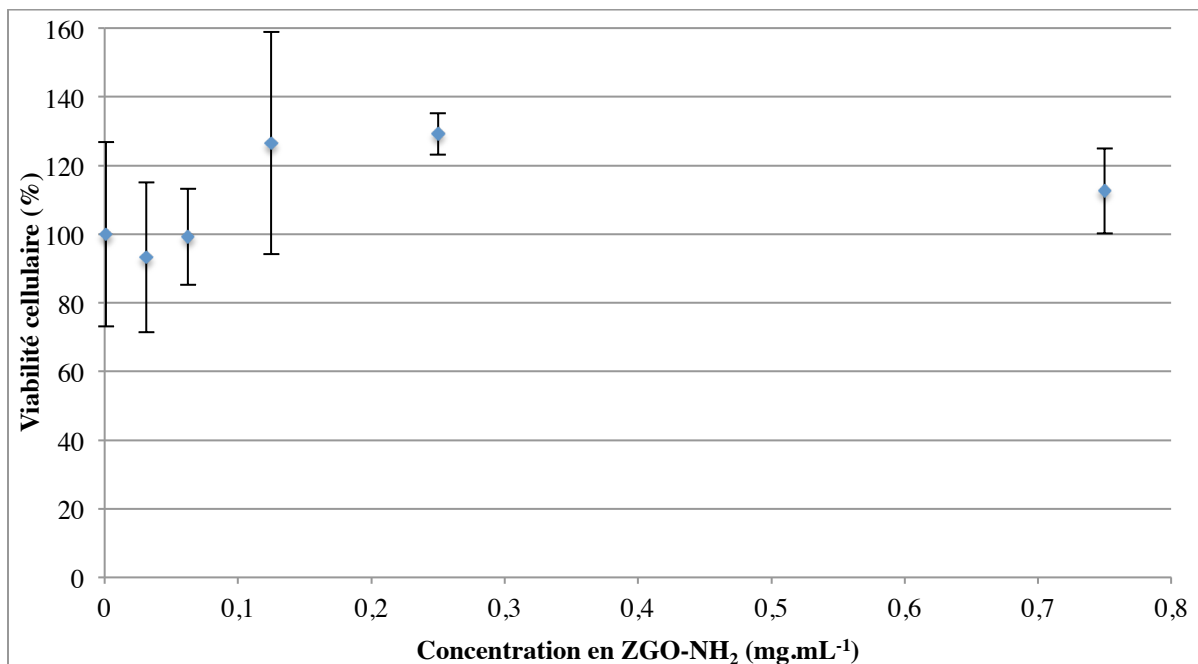
Mais le problème d'un tel effet est que les tests les plus fortement perturbés (Graphique 5.5) ne seront pas acceptés car évidemment biaisés, tandis que les tests peu perturbés (Graphique 5.4) seront peut-être acceptés sans discussion, car les barres d'erreurs feront éventuellement accepter les étranges fluctuations observées. Pourtant, dans le cas où les particules sont peu toxiques, on observe un écart non négligeable (10 à 20 % de viabilité) entre le résultat obtenu et la réelle courbe de toxicité (courbes magenta et rouge, respectivement, Graphique 5.4.b). De plus, je n'ai représenté que quelques cas hypothétiques, et il est probable que beaucoup de situations intermédiaires puissent être rencontrées, démontrant la nécessité de commencer par s'affranchir du biais dû à l'absorbance des nanoparticules, ce qui peut être réalisé assez simplement comme démontré par le Graphique 5.3. Généralement, la mesure d'absorbance est réalisée dans la plaque qui contient les cellules et donc au travers du tapis de cellules ayant internalisé les nanoparticules. Dans le cas du MTT, les cristaux de formazan qui se forment au fond des puits doivent être redissous, contrairement au WST-8, pour lequel il suffit de lire l'absorbance directement dans les puits. Dans les deux cas, attendre 15 minutes, prélever environ la moitié du surnageant, le transférer dans un puits propre et lire l'absorbance dans ce puits permet de supprimer une grande partie voire la totalité du biais dû à l'absorbance des nanoparticules présentes.

ii. Interactions nanoparticules/MTT et WST-8

Ci-dessous sont présentés les résultats des tests de toxicité utilisant le MTT ou le WST-8, une fois le protocole modifié pour s'affranchir du biais dû à l'absorbance des ZGO-NH₂. Ces tests ont pu être réalisés sur des macrophages, comme les premiers tests présentés ci-dessus, mais aussi sur des cellules pluripotentes telles que des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou des progéniteurs endothéliaux circulants tardifs (PEC) ou "endothelium colony forming cells" (ECFC).

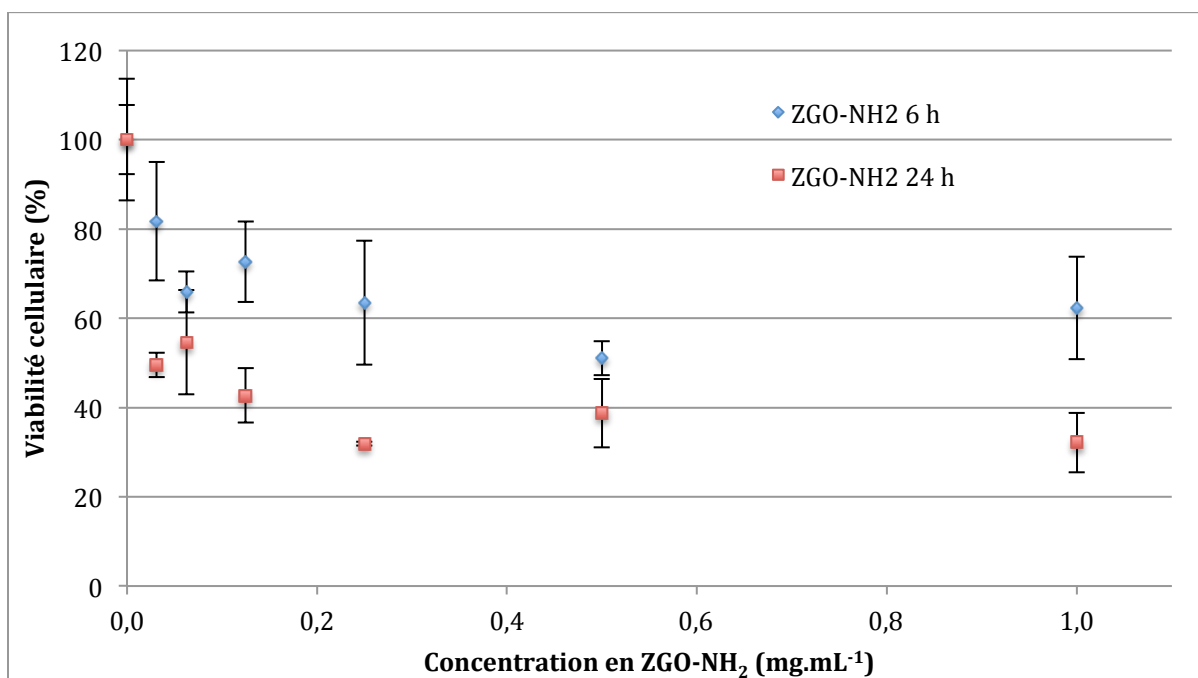


Graphique 5.6. Tests MTT réalisés sur des cellules RAW 264.7 ayant incubé 6 h avec des ZGO-NH₂ (n = 2).

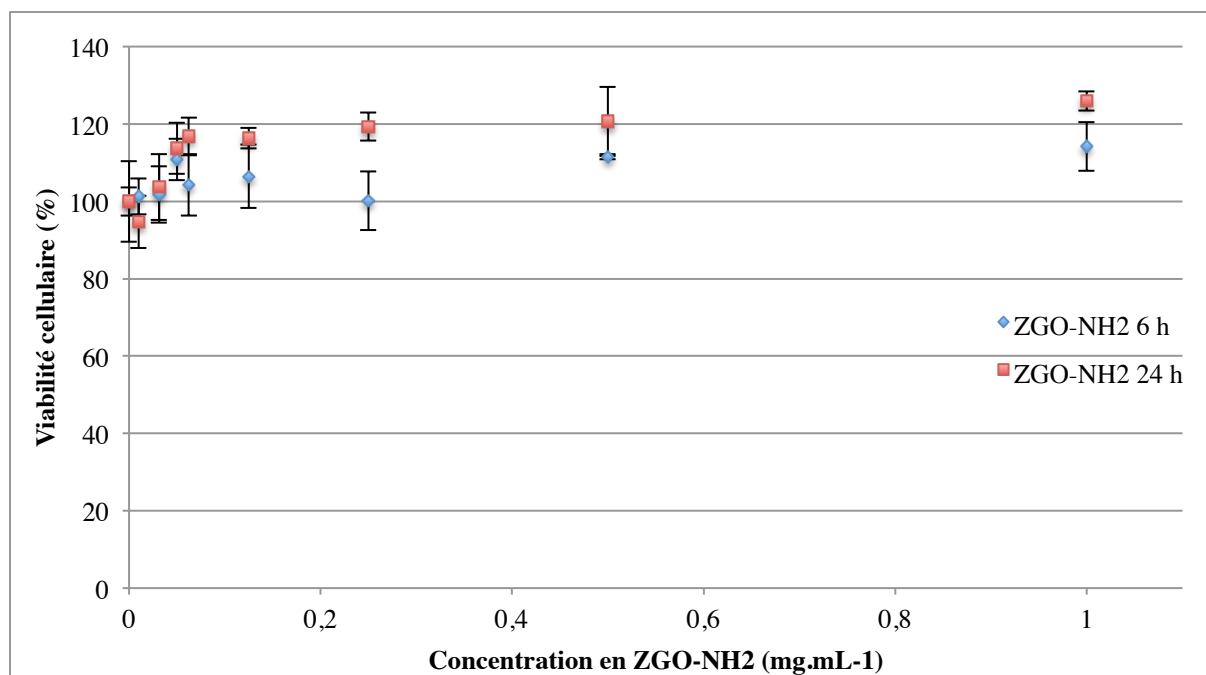


Graphique 5.7. Test WST-8 réalisé sur des cellules RAW 264.7 ayant incubé 6 h avec des ZGO-NH₂.

On voit que les tests MTT et WST-8 ne donnent pas du tout le même résultat pour évaluer la toxicité de nanoparticules ZGO-NH₂ sur des macrophages. Le test MTT montre une toxicité peu importante (Graphique 5.6) tandis que le test WST-8 donne une viabilité cellulaire supérieure à 100 % aux plus fortes concentrations en ZGO-NH₂ (Graphique 5.7). Le résultat donné par le test WST-8 donne l'impression qu'il subsiste un problème dont la conséquence semble proche de celle de la présence de nanoparticules dans le puits au moment de la lecture de l'absorbance. Ces deux tests ont été aussi réalisés sur des ECFC (Graphiques 5.8 et 5.9) et donnent des résultats assez similaires à ceux observés sur les macrophages.



Graphique 5.8. Tests MTT réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des ZGO-NH₂ (n = 2).



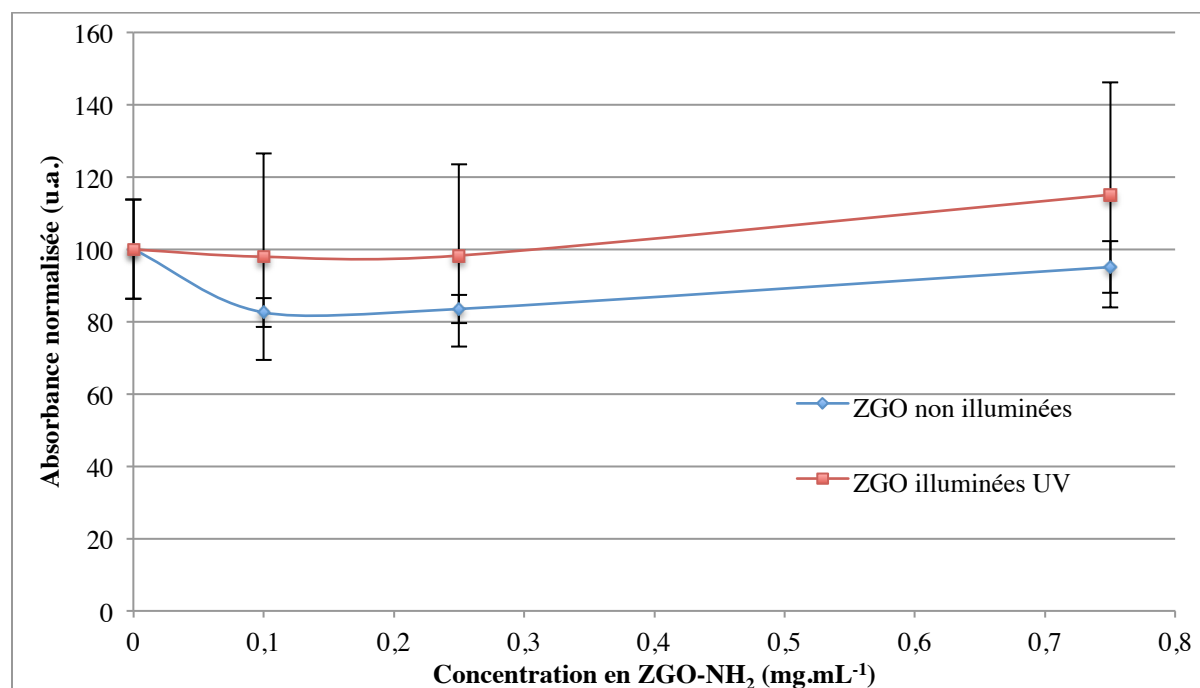
Graphique 5.9. Tests WST-8 réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des ZGO-NH₂ (n = 2 et 1, respectivement).

Les tests MTT réalisés sur les ECFC (Graphique 5.8) montrent aussi une toxicité assez importante, et une toxicité plus importante après 24 h qu'après 6 h d'incubation. Les tests WST-8 montrent une viabilité augmentée, avec peu de différence entre les deux durées d'incubation. Des résultats identiques ont été obtenus avec des CSM (Graphiques 8.1 et 8.2, Annexe 1). Les nanoparticules n'étant plus présentes lors de la lecture de l'absorbance, je me suis demandé si elles ne pouvaient pas biaiser le test avant la lecture, c'est à dire en interagissant avec le réactif. Etant donné que ces nanoparticules ont des propriétés de luminescence persistante, elles sont le lieu de transferts d'électrons, et pourraient ainsi transmettre des électrons à des substances en contact avec la surface. Les substances utilisées pour les tests de toxicité sont réduites par des espèces intracellulaires et pourraient éventuellement être transformées au contact de nanoparticules, ce qui aboutirait à une "fausse" viabilité. Les nanoparticules de ZGO ont d'ailleurs déjà été utilisées pour réaliser de la dégradation photocatalytique de molécules organiques telles que le benzène.³⁹¹ Ce phénomène reste très hypothétique, et il est nécessaire de souligner que, dans la publication citée, le matériau utilisé a des propriétés de porosité que n'a certainement pas celui que nous utilisons, car les synthèses employées sont différentes. Les porosités rapportées dans cette publication vont de 43 à 201 m².g⁻¹, tandis que celle des ZGO que nous utilisons est de 28 m².g⁻¹.³³⁴

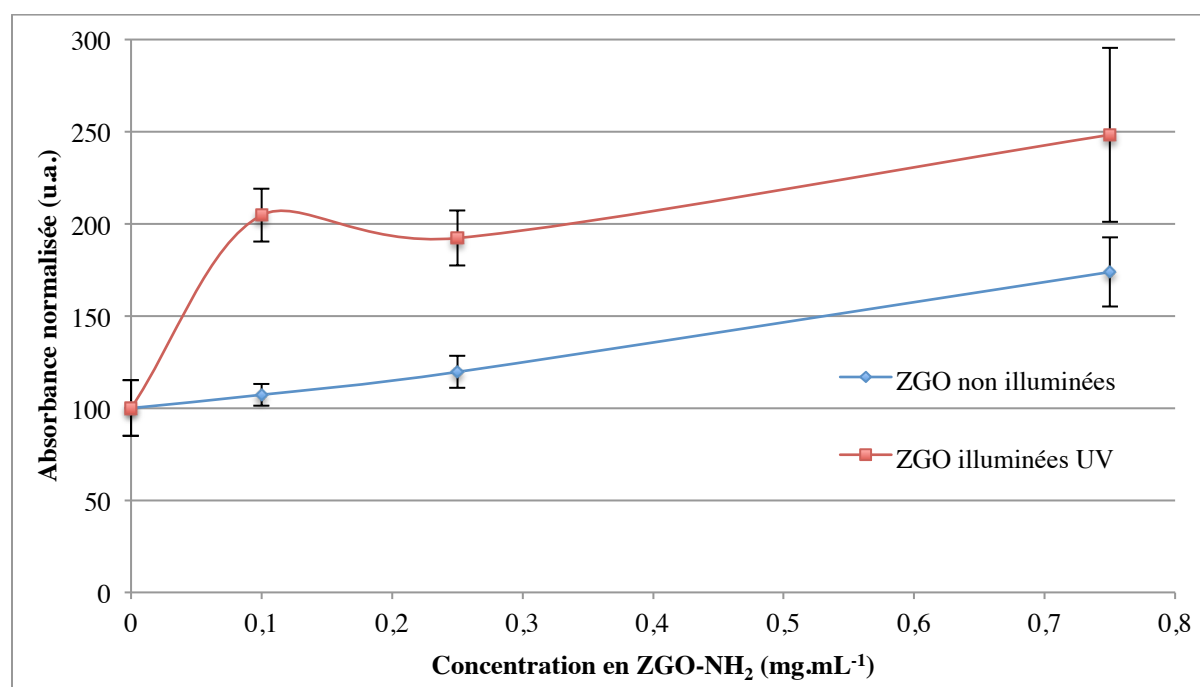
Pour mettre en évidence un éventuel biais dû au contact entre nanoparticules et réactifs, j'ai réalisé une incubation similaire à celle citée précédemment mais dont le but était d'observer l'absorbance de solutions de MTT et WST-8 après avoir enlevé les nanoparticules. De plus, afin de mettre en évidence un éventuel lien avec les propriétés de dégradation photocatalytique, j'ai réalisé des incubations avec des nanoparticules auparavant stockées 24 h dans le noir ou illuminées 2 min avec une lampe à UV. Au bout de 2 h d'incubation des ZGO-NH₂ avec le réactif et après prélèvement du surnageant pour s'affranchir du biais dû à l'absorbance des nanoparticules, on voit que les

³⁹¹ X. Zhang et al. Photocatalytic decomposition of benzene by porous nanocrystalline ZnGa₂O₄ with a high surface area. Environ. Sci. Technol. 2009, 43, 5947.

incubations avec le MTT et le WST-8 ont donné des résultats différents (Graphiques 5.10 et 5.11, respectivement).



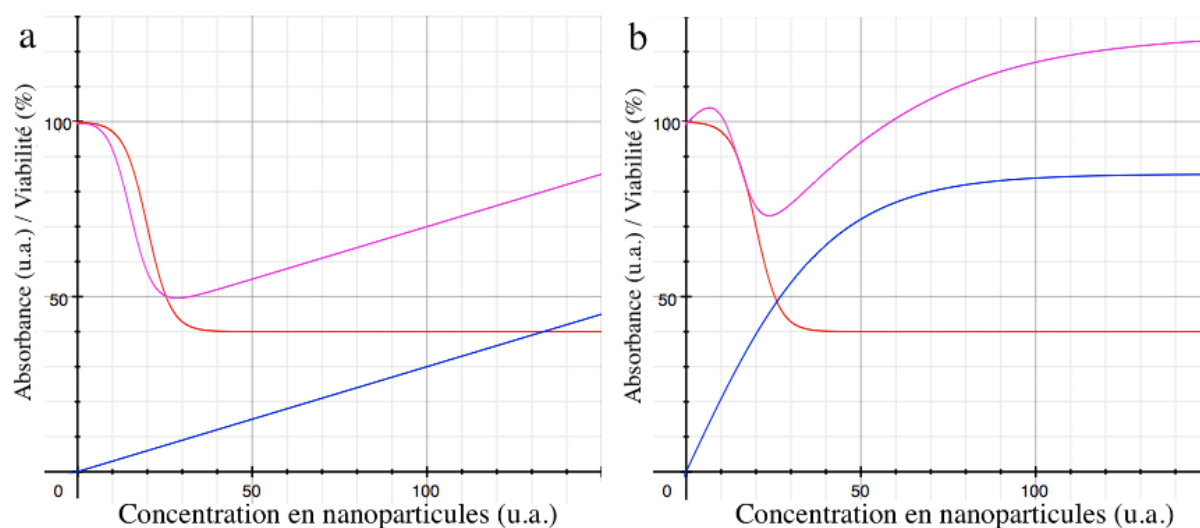
Graphique 5.10. Absorbance de solutions de MTT ayant incubé 2 h avec des nanoparticules ZGO-NH₂ illuminées 2 min en UV (carrés rouges) ou conservées à l'abri de la lumière 24 h (losanges bleus) avant l'incubation.



Graphique 5.11. Absorbance de solutions de WST-8 ayant incubé 2 h avec des nanoparticules ZGO-NH₂ illuminées 2 min en UV (carrés rouges) ou conservées à l'abri de la lumière 24 h (losanges bleus) avant l'incubation.

L'incubation des ZGO-NH₂ avec le MTT ne montre pas d'effet significatif d'interaction nanoparticules/MTT, que ce soit avec celles ayant été illuminées en UV ou celles conservées dans le noir avant incubation (Graphique 5.10). En revanche les nanoparticules semblent interagir avec le WST-8, et l'illumination UV préalable à

l'incubation semble augmenter cet effet. Je n'ai pas réalisé d'expérience permettant d'affirmer que cette interaction donne lieu à la même transformation que celle se produisant lors de l'interaction du WST-8 avec les réductases intracellulaires. Cependant, la transformation du WST-8 donne lieu à une augmentation de l'absorbance semblable à celle qui a lieu lors des tests cellulaires. Si on additionne une courbe de toxicité similaire à celle obtenue par les derniers tests MTT (Graphiques 5.6 et 5.8) avec la courbe obtenue en incubant les ZGO-NH₂ non illuminées avec le WST-8 (losanges bleus, Graphique 5.11), on obtient les modélisations suivantes (Graphique 5.12).



Graphique 5.12. Influence de la présence de nanoparticules ayant été placées dans le noir (a) ou illuminées avec des UV (b) sur un test de toxicité WST-8. Le signal issu de la transformation du WST-8 par les cellules est tracé en rouge tandis que celui dû à l'interaction entre nanoparticules et réactif est tracé en bleu. La courbe magenta, représentant le signal théorique mesuré, est obtenue en additionnant les courbes bleu et rouge.

Les graphiques de tests WST-8 montrent des valeurs proches de 100 % de viabilité pour les concentrations les plus faibles en nanoparticules (Graphique 5.7 pour les cellules RAW, et 5.9 pour les ECFC), puis des viabilités supérieures à 100 % dès que les concentrations en nanoparticules atteignent 0,125 et 0,05 mg.mL⁻¹ pour les RAW et les ECFC, respectivement. On voit que les résultats expérimentaux sont plus proches de la modélisation obtenue en additionnant la viabilité mesurée en MTT avec l'effet des ZGO-NH₂ illuminées en UV (Graphique 5.12.b) qu'avec celui des ZGO-NH₂ non illuminées (Graphique 5.12.a). Je ne m'attendais pas à ce résultat, voire plutôt à l'inverse car les nanoparticules que j'utilise pour ce test de toxicité ne sont pas exposées à une illumination énergétique aussi intense que celle de la lampe UV. Cependant, leur stockage sur une paillasse exposée au soleil, leur manipulation sous une hotte éclairée par des tubes fluorescents et le dépôt de ces nanoparticules sur les plaques dans un poste de sécurité microbiologique, éclairé lui aussi par ce genre de tubes luminescents, peuvent aboutir à une activation relativement importante de leur luminescence persistante. En effet, ces lampes contiennent un gaz de mercure qui, une fois parcouru par un courant électrique, émet des UV et de la lumière visible qui vont éclairer des poudres fluorescentes déposées sur la surface intérieure des tubes. Ces poudres contiennent notamment des terres rares telles que l'euprécium (II) et (III) et le terbium (III) qui vont émettre dans le bleu, le rouge et le vert, respectivement, donnant une impression de lumière blanche. Outre le fait que le ZGO peut être excité dans les UV et le rouge, il est aussi possible de l'exciter entre 400 et 450 nm (⁴A₂ -> ⁴T₁ du chrome (III)). Or, les spectres des lampes fluorescents possèdent deux bandes d'émission dues au mercure à 405,4 et 436,6 nm, pouvant exciter efficacement le matériau (Figure 5.10).



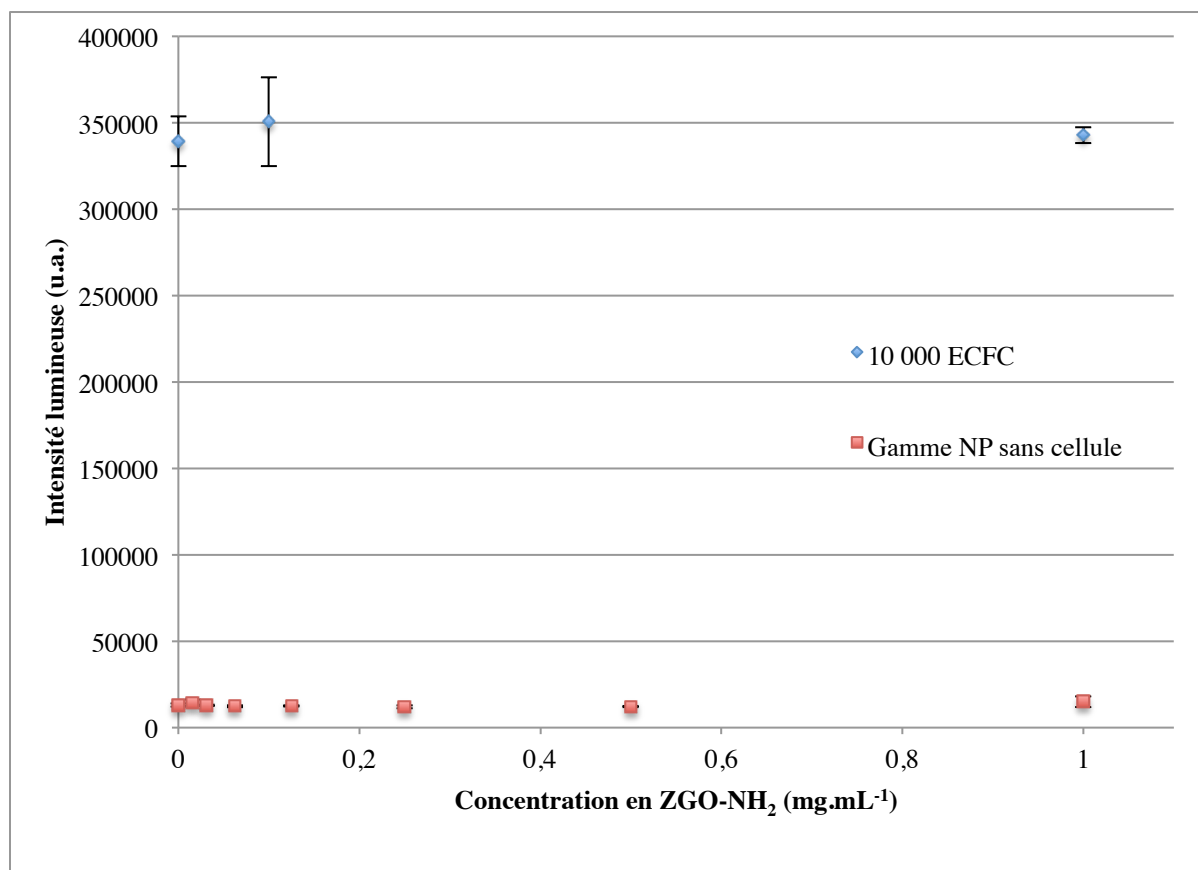
Figure 5.10. Spectre d'émission d'une lampe Narva-Tronic 20 W, dite "fluocompacte". (Crédit Xofc Wikipédia)

Comme précisé en introduction, le WST-8 ne pénètre pas dans les cellules. Il est utilisé avec un médiateur qui est réduit à l'intérieur de la cellule et qui va à son tour réduire le WST-8 en formazan. Initialement, le médiateur employé était le 5-méthylphénazinium méthyl sulfate (PMS), puis il a été modifié en 1-méthoxy-5-méthylphénazinium méthyl sulfate (1-méthoxyPMS).³⁸² Ce dernier est préféré au PMS parce qu'il n'est pas photosensible, contrairement au PMS, et qu'il réagit plus vite avec le NADH puis le WST-8. L'utilisation du 1-méthoxyPMS évite donc la sensibilité photochimique du médiateur et n'explique donc pas l'interaction entre ZGO-NH₂ et WST-8, bien que l'illumination préalable des ZGO ait un effet significatif. Il est possible que les ZGO-NH₂ interagissent directement avec le WST-8, ou bien qu'il se produise un échange d'électron entre le 1-méthoxyPMS et la surface des ZGO-NH₂. Cependant, je n'ai pas réalisé d'expérience permettant de valider de telles hypothèses.

Le WST-8 semble difficilement utilisable avec ces nanoparticules, ou peut-être faudrait-il les placer à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours avant de les déposer sur les cellules. Un autre moyen de désactiver complètement leur luminescence est de les chauffer jusqu'à 300 °C, ce qui est réalisable sur des poudres et non sur des nanoparticules en solution. En revanche, le MTT ne semble pas perturbé par interaction entre le réactif et les nanoparticules et la simple lecture de l'absorbance dans une plaque propre 15 min après redispersion du formazan est apparemment suffisante pour que ce test soit efficace. Des biais supplémentaires pouvant subsister, il est nécessaire de trouver au moins un autre test de toxicité permettant de confirmer les résultats des tests MTT.

iii. Alamar Blue

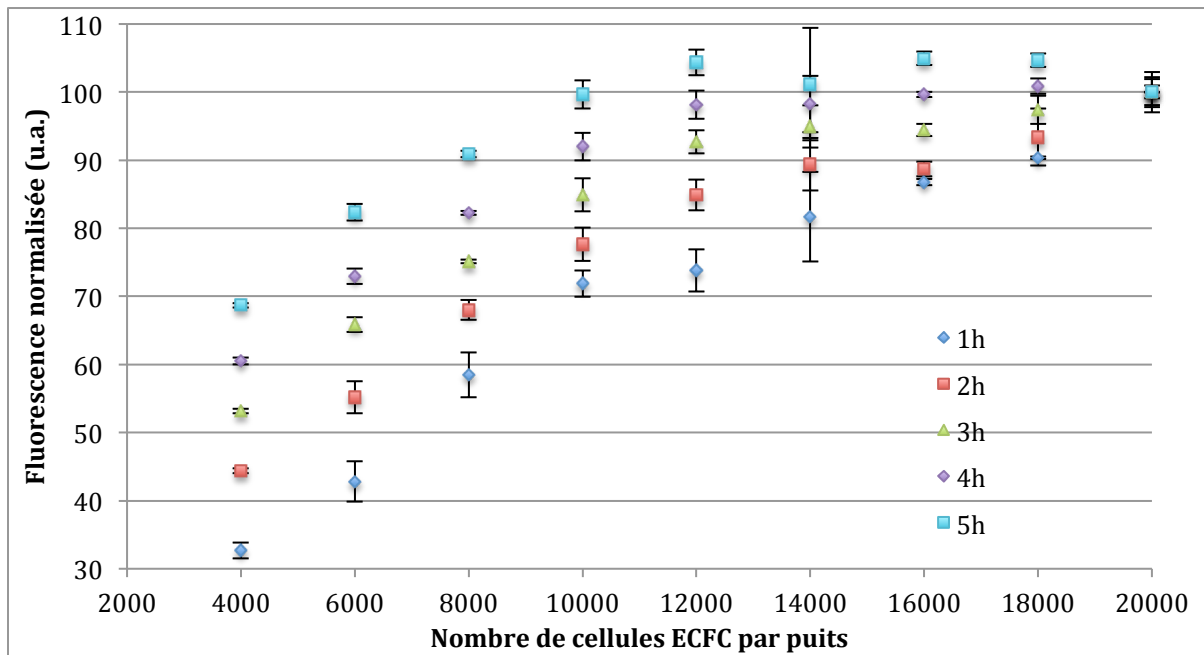
Le test AB est similaire aux tests MTT et WST-8 mais le substrat utilisé (résazurine) n'est pas métabolisé de la même manière par la cellule. Cela permet de sonder différemment la viabilité des cellules marquées avec les nanoparticules. La mesure finale de ce test peut être réalisée en fluorescence ou en absorbance. Cela peut éviter le biais précédemment évoqué à condition que les nanoparticules ne perturbent pas la mesure de fluorescence. Cela est facile à vérifier en comparant la fluorescence d'une gamme de nanoparticules avec ou sans cellules (Graphique 5.13).



Graphique 5.13. Intensité lumineuse mesurée par fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{ém}} = 590 \text{ nm}$) de solutions d'AB déposées dans des puits contenant des quantités croissantes de ZGO-NH₂ avec ou sans 10⁴ ECFC déposées la veille.

On voit que le signal de fluorescence mesuré pour des solutions contenant différentes concentrations de ZGO-NH₂ n'évolue pas avec la concentration et reste égal à celui de la solution sans nanoparticules (carrés rouges, Graphique 5.13). De plus, le signal de fluorescence dû à la résorufine, donc issu de la transformation de la résazurine par 10⁴ ECFC en 6 h, est beaucoup plus important que celui des puits de la gamme de nanoparticules (losanges bleus, Graphique 5.13). Ce rapport supérieur à 25 entre les deux valeurs de fluorescence permet d'affirmer que les nanoparticules ne perturbent pas les tests AB après 6 h d'incubation.

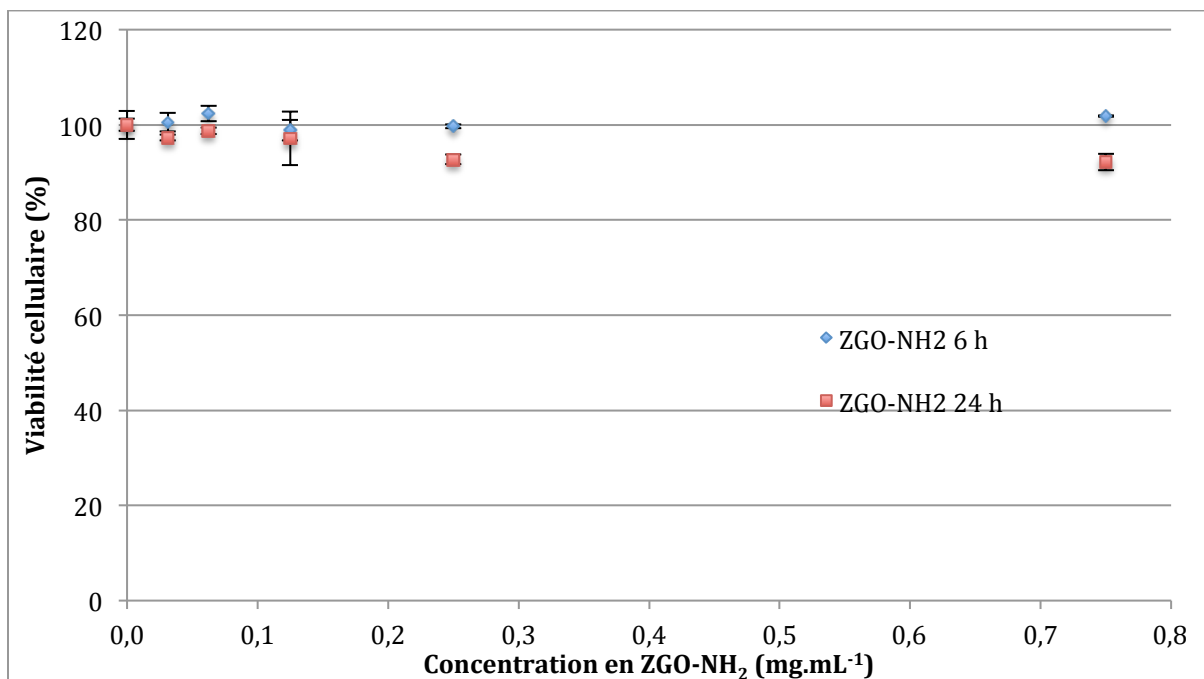
Mais avant de réaliser des tests en utilisant l'AB, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage en faisant incuber une gamme de cellules avec de l'AB et de mesurer l'absorbance à différents temps. Cela permet de déterminer les conditions dans lesquelles la fluorescence due à la résorufine est bien proportionnelle à la viabilité cellulaire. Les courbes d'étalonnage ont été réalisées uniquement en faisant incuber différentes quantités d'ECFC (de 4.10³ à 2.10⁴) avec de l'AB. La fluorescence est mesurée toutes les heures pendant 5 h (Graphique 5.14).



Graphique 5.14. Détermination des conditions de linéarité du test AB pour les ECFC. La fluorescence de chaque condition est mesurée toutes les heures pendant 5 h.

Dès la première heure, les puits contenant les plus grandes quantités de cellules sortent de la zone de linéarité. En revanche, les puits contenant entre $4 \cdot 10^3$ et 10^4 cellules sont dans la gamme de linéarité jusqu'à 5 h après le début de l'incubation de l'AB. Il est donc nécessaire d'ensemencer les plaques avec une quantité inférieure à 10^4 cellules par puits et de mesurer la fluorescence de l'AB dans les premières heures qui suivent le début de l'incubation.

Les tests d'AB réalisés dans de bonnes conditions sur des ECFC ont donné les résultats suivants (Graphique 5.15).



Graphique 5.15. Tests AB réalisés sur 10^4 ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des ZGO-NH₂. La mesure de la fluorescence a été réalisée 4 h après dépôt du réactif AB dans les puits.

D'après ces tests, les nanoparticules ZGO-NH₂ ne semblent pas toxiques après 6 h d'incubation, et peu toxiques après 24 h. Des résultats similaires ont été obtenus pour des CSM (Graphique 8.3, Annexe I).

Les tests AB semblent être de bons tests pour évaluer la toxicité des nanoparticules, car celles-ci ne semblent pas les perturber, que ce soit par luminescence ou par interaction avec le réactif. Les résultats sont en faveur d'une très faible toxicité et donc en désaccord avec les résultats des tests MTT. Les réactifs de ces tests sondent différentes substances intracellulaires, il est possible qu'ils donnent des résultats différents. En 2004, Hamid et al ont montré comment une substance utilisée à une dose non toxique, peut induire une différence importante de résultat entre un test MTT et un test AB.³⁹² Cette substance, le dicoumarol, est un anticoagulant dérivé de la coumarine. C'est aussi un inhibiteur des diaphorases qui oxydent le NADH et le NADPH et transforment l'AB. Leur inhibition va empêcher l'AB d'être transformé, tandis que les niveaux intracellulaires de NADH et NADPH vont augmenter, et transformer le MTT en formazan. En utilisant des tests morphologiques et un test évaluant la viabilité membranaire (acétométhoxy-calcéine), ces chercheurs ont montré que les tests AB et MTT pouvaient indiquer une toxicité assez importante ou une viabilité significativement supérieure à 100 %, respectivement, en l'absence de cytotoxicité réelle (Figure 5.11). Dans le cas présent, il n'est pas impossible qu'une interaction entre les nanoparticules et une substance intracellulaire mène à l'obtention de résultats différents pour ces deux tests. Pour cette raison, nous avons décidé de nous tourner vers des tests n'utilisant pas de réactifs devant être transformés par les cellules.

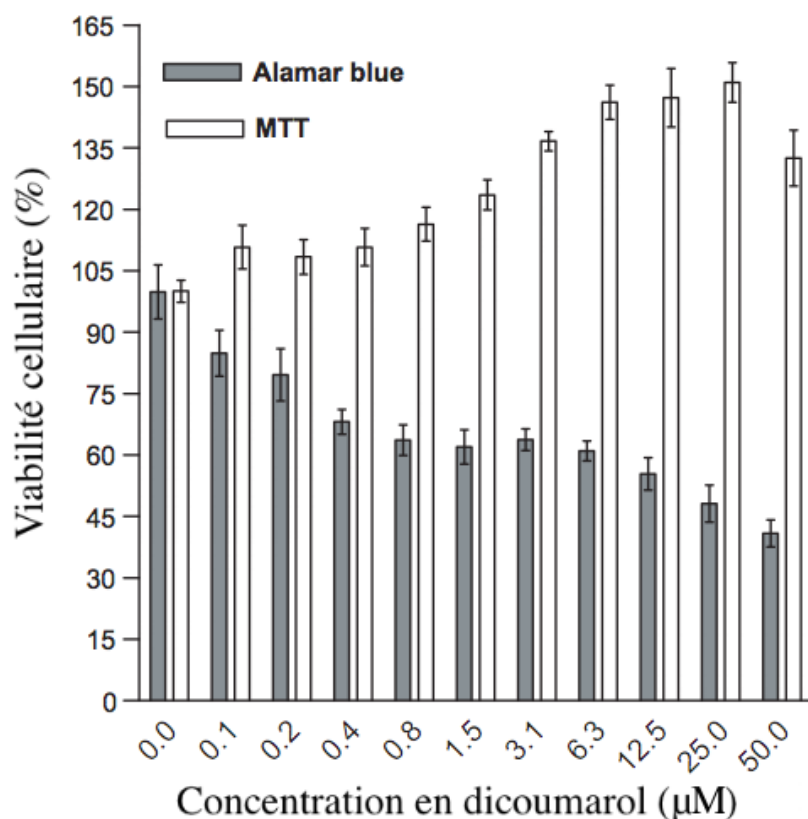
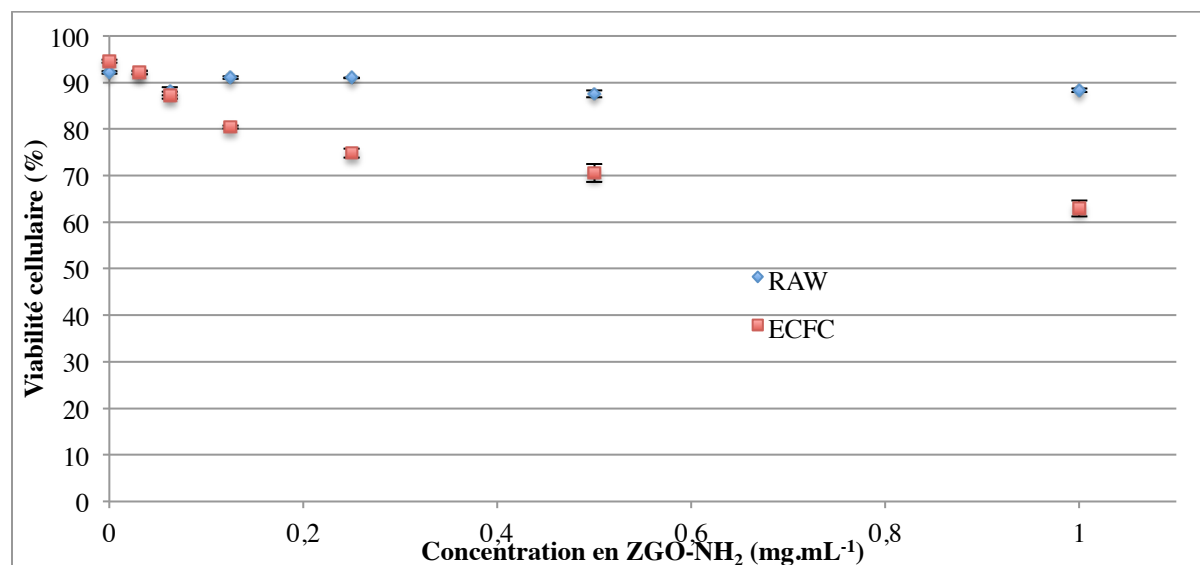


Figure 5.11. Effet dose réponse du dicoumarol sur les résultats de tests MTT et AB après 24 h d'incubation. (Adapté de 392)

³⁹² R. Hamid et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high-through-put screening. Toxicol. In Vitro. 2004, 18 (5), 703.

iv. Cytométrie en flux

Les premiers tests de toxicité utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire après exposition aux nanoparticules et n'utilisant pas de réactif transformé par les cellules sont des tests de cytométrie (Graphique 5.16).



Graphique 5.16. Tests de toxicité par cytométrie en flux sur des cellules RAW 264.7 ou des ECFC après 6 h d'incubation avec des nanoparticules ZGO-NH₂.

Ils montrent une viabilité égale à 100 % pour les macrophages, contrairement au test MTT, tandis que le résultat donné pour les ECFC montre une toxicité moindre que celle obtenue avec le MTT. Pourtant, ce test ne semble pas perturbé par la présence de nanoparticules. En effet, une solution contenant des nanoparticules seules ne permet pas d'obtenir le moindre signal, et la fluorescence des nanoparticules est tellement faible comparée à celle des fluorophores organiques utilisés par ce test (annexine V-FITC et iodure de propidium), qu'il est peu probable qu'il s'agisse d'une telle perturbation.

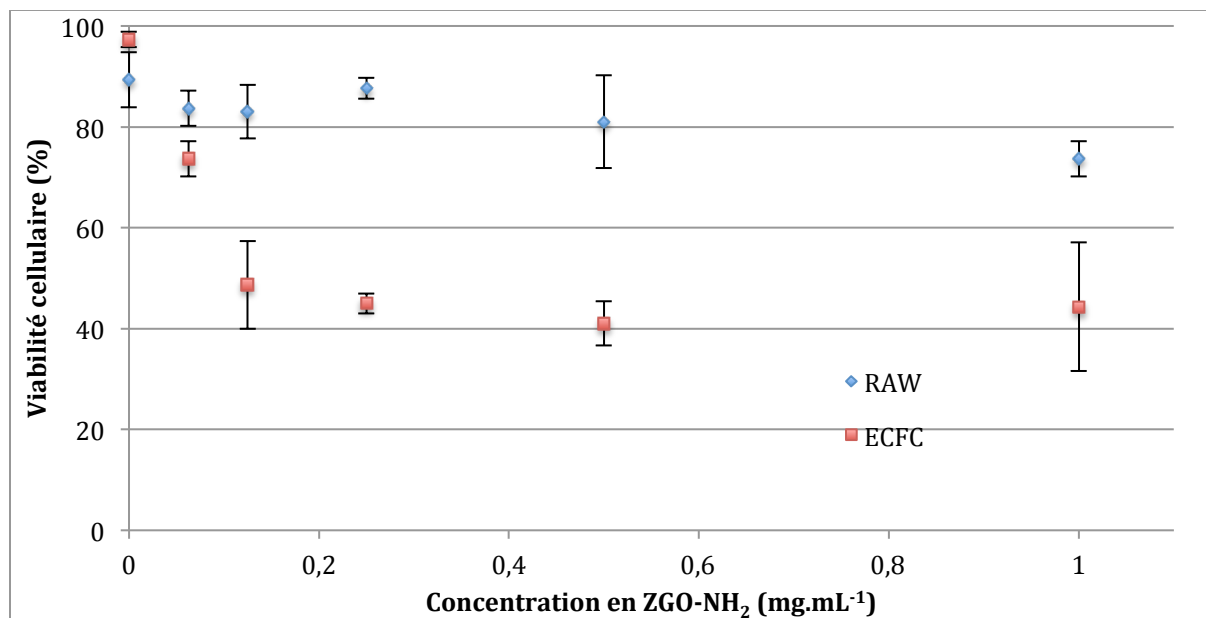
La cytométrie présente tout de même deux inconvénients qui sont la nécessité de décoller les cellules et la durée de réalisation. Le produit utilisé pour décoller les cellules, un mélange de trypsine et d'EDTA, n'est pas inoffensif pour les cellules et peut diminuer la viabilité cellulaire. De plus, il peut s'écouler quelques heures entre le passage en cytométrie des cellules n'ayant pas reçu de nanoparticules et les dernières ayant reçu des nanoparticules. En effet, le temps de décoller les cellules de chaque condition (effectuée en triplicat), de les mélanger au mélange annexine-V-FITC iodure de propidium, d'effectuer trois mesures pour chaque échantillon et de rincer l'appareil entre chaque échantillon, les dernières cellules à être décollées et passées dans le cytomètre ont incubé plus de temps que les premières. Or, le temps d'incubation initialement choisi étant de 6 h, un allongement de l'incubation de quelques heures n'est pas négligeable.

Pour expliquer la différence observée avec les tests précédents, on peut imaginer qu'une cellule qui a internalisé des nanoparticules ait un milieu intracellulaire modifié. Cela peut se traduire par une baisse de viabilité lors d'un test MTT, sans pour autant que les cellules soient en début d'apoptose. Elles sembleraient alors viables en cytométrie. Ces deux types de tests donnent peut-être les mêmes résultats au bout d'une durée d'incubation plus longue et les différences observées pourraient être dues à une

cinétique de la toxicité des nanoparticules : leur internalisation commence par perturber le milieu intracellulaire sans provoquer l'apoptose, puis, après un certain temps, la cellule ayant trop souffert rentre en apoptose. Cela pourrait expliquer que la cytométrie ne montre pas de toxicité pour la lignée de macrophages immortalisés, qui sont des cellules assez résistantes faites pour phagocyter des corps étrangers, tandis que les ECFC, plus fragiles, montrent rapidement une baisse de la viabilité en cytométrie. Malheureusement, cette hypothèse a été formulée a posteriori et je n'ai pas entrepris d'expériences permettant de la vérifier.

v. Le test au bleu de trypan

Un second test de toxicité permettant de s'affranchir de réactif subissant une transformation chimique au sein de la cellule a été réalisé avec Laetitia Pidial à l'HEGP à l'aide d'un appareil comptant le pourcentage de cellules viables en les marquant avec du bleu de trypan. Le protocole de ce type de test est similaire à celui de la cytométrie sauf que les cellules mortes sont visualisées par marquage avec du bleu de trypan (Graphique 5.17).



Graphique 5.17. Tests de viabilité au bleu de trypan réalisés sur des cellules RAW (losanges bleus) ou des ECFC (carrés rouges) ayant incubé 6 h avec des ZGO-NH₂.

Ce test donne un résultat très proche de celui obtenu avec le MTT, avec une toxicité assez importante des ZGO-NH₂ pour les ECFC dès les premières concentrations et une toxicité inférieure pour les RAW que pour les ECFC.

Les limites de ce genre de test sont les mêmes que celles du Viacount : une durée importante de mise en oeuvre et une exposition des cellules à la trypsine ainsi qu'à l'EDTA.

c) Suivi cellulaire *in vivo*

Différentes quantités de cellules ECFC, préalablement marquées avec 0,25 mg.mL⁻¹ de ZGO-NH₂ pendant 18 h, ont été injectées à des souris nudes afin de démontrer la possibilité de les observer *in vivo* après illumination visible dans la première fenêtre de

transparence des tissus. Trois types d'injections ont été réalisés : en sous-cutané (SC ventrale), en intramusculaire (dans les muscles de la cuisse) du côté de la caméra (IM ventrale) et du côté opposé à la caméra (IM dorsale). Des quantités croissantes de cellules (de 10^3 à $6,4 \cdot 10^4$) ont été injectées afin de déterminer la quantité minimale détectable dans ces conditions de marquage. La luminescence de chaque zone d'injection est enregistrée après une illumination visible de la souris pendant 2 min et peut être comparée au bruit de fond (Figure 5.12 et Graphique 5.18).

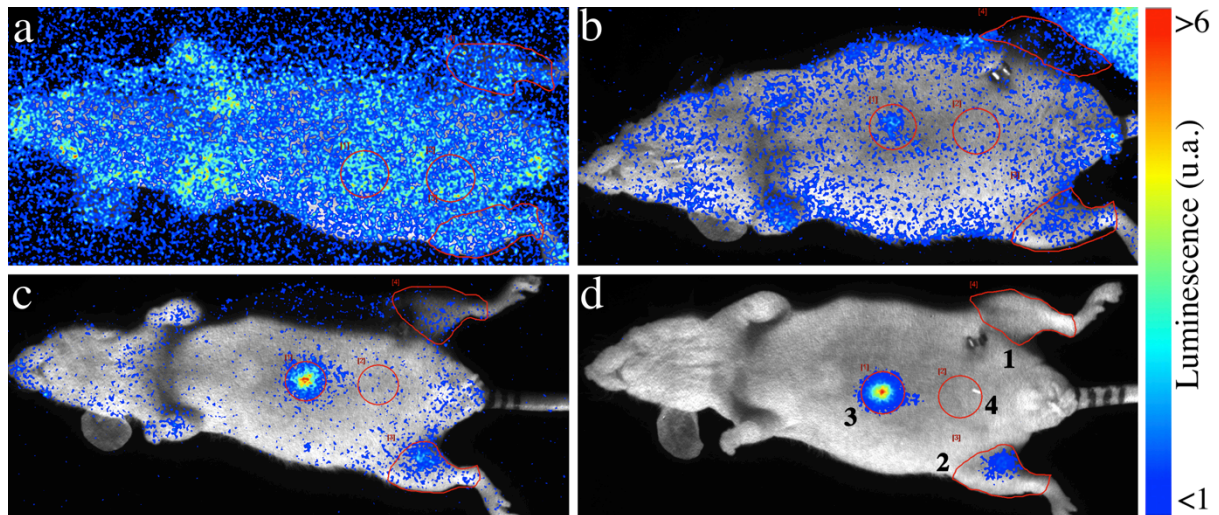
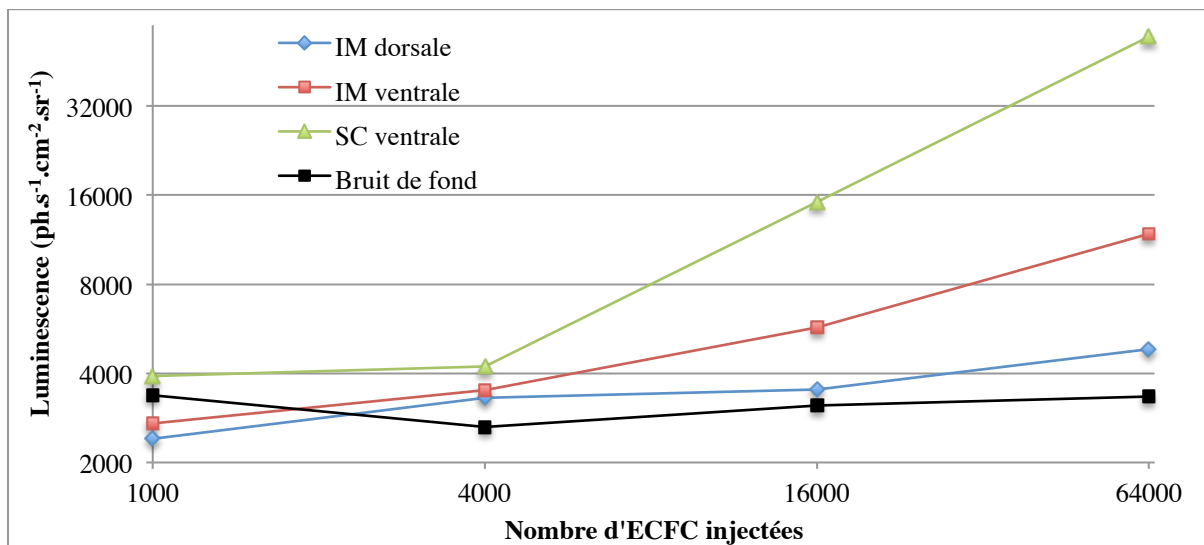


Figure 5.12. Images de luminescences de souris Nude auxquelles ont été injectées 10^3 (a), $4 \cdot 10^3$ (b), $1,6 \cdot 10^4$ (c) ou $6,4 \cdot 10^4$ (d) ECFC en différents endroits. Les zones d'intérêt sont numérotées comme suit : 1) IM dorsale, 2) IM ventrale, 3) SC ventrale, 4) bruit de fond.

On commence à distinguer un point d'injection à partir de $4 \cdot 10^3$ ECFC injectées, mais cela ne concerne que l'injection sous-cutanée (Figure 5.12.b). A partir de $1,6 \cdot 10^4$ ECFC injectées, on distingue aussi une injection en intra-musculaire du côté à la caméra (Figure 5.12.c). En revanche, $6,4 \cdot 10^4$ ECFC injectées en intra-musculaire du côté opposé à la caméra ne suffisent pas pour distinguer un signal plus important que le bruit de fond (Figure 5.12.d). Ces résultats sont schématisés sur un graphique montrant la valeur de luminescence émise par la zone d'intérêt en fonction du nombre de cellules y ayant été injecté (Graphique 5.18).



Graphique 5.18. Luminescence de zones d'intérêt de souris nude ayant reçu différentes quantités d'ECFC marquées avec des ZGO-NH₂ après illumination avec une DEL orange pendant 2 min.

Dans des conditions optimales (injection sous cutanée du bon côté de la souris), on arrive à observer 4.10^3 cellules marquées. Cette quantité minimale observable est intermédiaire entre les quantités minimales observables rapportées dans des travaux sur des cellules marquées avec des QD et des UCNP. Les quantités minimales visibles de cellules marquées avec des QD après injections sous-cutanées sont proches de 5.10^4 .^{218,221} Les marquages avec des UCNP permettent d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 10 cellules!^{225,325} Mais pour des applications requérant une injection intraveineuse ou dans le péritoine, on se doute qu'un nombre plus important de cellules sera nécessaire. Par exemple, un suivi cellulaire après injection par voie intraveineuse nécessite de l'ordre de 5.10^5 cellules marquées avec des UCNP.²²⁵

Les travaux présentés jusqu'ici ont été réalisés afin de comprendre quelles pouvaient être les difficultés rencontrées lors de l'utilisation de nanoparticules luminescentes pour marquer et suivre des cellules d'intérêt. Ci-dessous, la suite logique de ce travail est présentée, l'efficacité et la toxicité du marquage avec des MPNH est étudiée afin de déterminer une concentration de travail pour évaluer l'impact du marquage sur les propriétés des cellules marquées.

3) Marquage cellulaire et toxicité *in vitro* des MPNH

Dans l'étude des propriétés et la description des MPNH (Partie IV), nous avons décrit leur comportement *in vivo* ainsi qu'un marquage de macrophages permettant de les attirer avec un aimant *in vitro* (Figure 4.15). Mais cette preuve de concept est préliminaire. Rien ne nous donne d'informations sur le fait que la lumière attirée par l'aimant provient bien de MPNH₁ internalisés par des cellules ou que celles-ci soient encore viables. De plus, les cellules utilisées, des macrophages, ne sont pas les cellules que nous souhaitons pouvoir marquer et suivre *in vivo*. Nous souhaitons utiliser des lignées cellulaires qui possèdent la propriété de stimuler la vasculogénèse de tissus ischémiés ou de favoriser la réparation d'endothéliums vasculaires lésés. Les ECFC^{393,394} et les CSM^{395,396} ont déjà été étudiées en thérapie cellulaire et ont de telles caractéristiques. Les paragraphes suivants s'intéressent donc à la possibilité de marquer et suivre des ECFC et des CSM avec une viabilité cellulaire supérieure à 90 % après marquage avec les MPNH.

a) Toxicité

Il a été choisi de commencer par évaluer la toxicité par test MTT sur des ECFC et des CSM en utilisant un seul type d'hybride : les MPNH₃. Ceux-ci ont été retenus car nous souhaitons réaliser de la vectorisation magnétique de cellules marquées et les MPNH₃ sont les MPNH qui contiennent la plus grande fraction massique d'USPIO, donc les plus susceptibles à un champ magnétique. Deux facteurs ont été explorés lors des premiers

³⁹³ J. P. Kirton & Q. Xu. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc. Res.* 2010, 79, 193.

³⁹⁴ G. Sarlon et al. Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J. Thromb. Haemost.* 2012, 10, 38.

³⁹⁵ I. Pountos et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury.* 2007, 38 (S4), S23.

³⁹⁶ J. M. Karp & G. S. L. Teo. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009, 4 (3), 206.

tests de toxicité : la durée d'incubation (6 et 24 h) et le recouvrement des MPNH₃. Nous avons utilisés les recouvrements décrits en Partie IV : -OH (non fonctionnalisés), -NH₂ et -COOH (Figure 5.13).

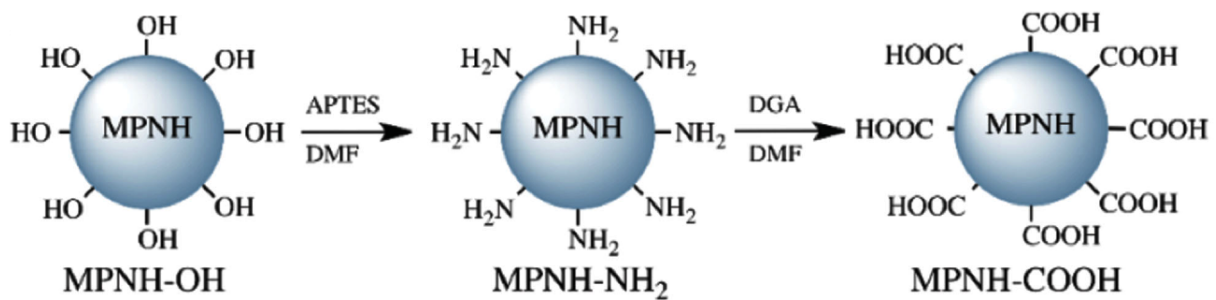


Figure 5.13. Différents états de surface des nanohybrides utilisés pour marquer les cellules.

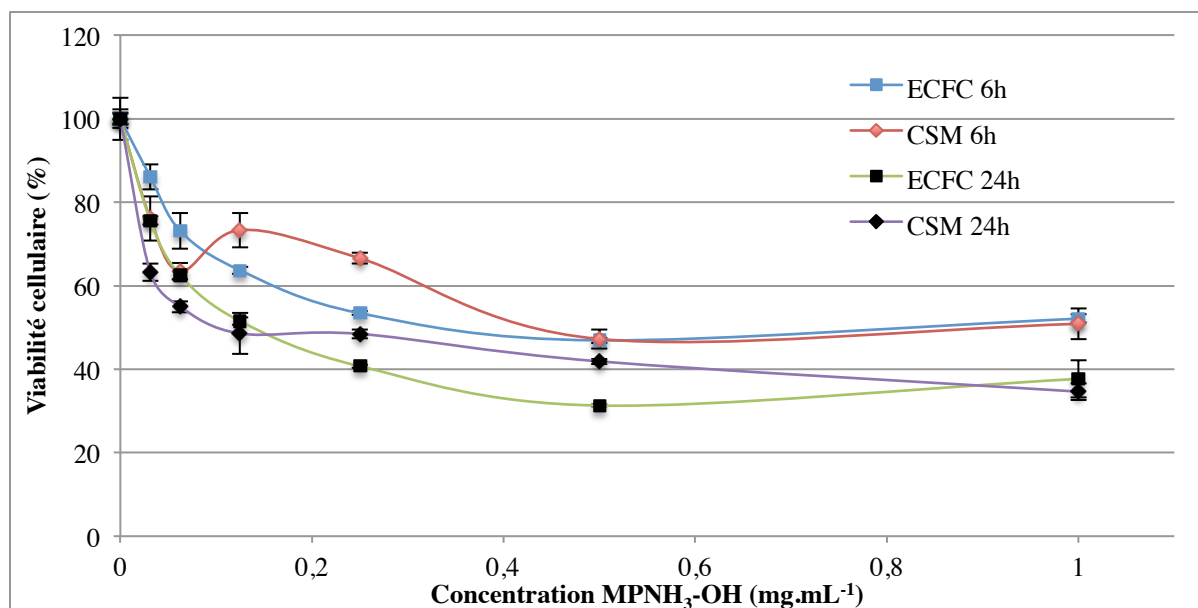
Pour tous les tests, les concentrations en nanoparticules sont indiquées en mg.mL⁻¹. Cependant, je considère important d'utiliser une autre unité, le µg.cm⁻². En effet, en fonction de leur stabilité colloïdale, les nanoparticules peuvent avoir tendance à sédimenter et s'accumuler au fond des puits, au contact des cellules. Ainsi pour une même concentration mais deux volumes différents, les cellules ne "verront" pas la même quantité de particules, contrairement à un toxique moléculaire dissous en solution. J'ai donc accordé une grande importance à toujours me placer à la même masse de nanoparticules par unité de surface pour les différents tests, surtout lorsque j'ai été amené à changer de taille de puits (plaques 6, 12, 24 ou 48 puits). Le Tableau 5.1 indique les équivalences entre ces deux unités pour les concentrations généralement utilisées dans mes expériences, ainsi qu'une estimation du nombre de MPNH correspondant.

mg.mL ⁻¹	µg.cm ⁻²	Nombre de MPNH
1,0	294	7,72.10 ¹¹
0,5	147	3,86.10 ¹¹
0,25	73,5	1,93.10 ¹¹
0,125	36,8	9,65.10 ¹⁰
0,0625	18,4	4,82.10 ¹⁰
0,03125	9,19	2,41.10 ¹⁰

Tableau 5.1. Equivalence entre les unités utilisées pour préciser la concentration en nanoparticules.

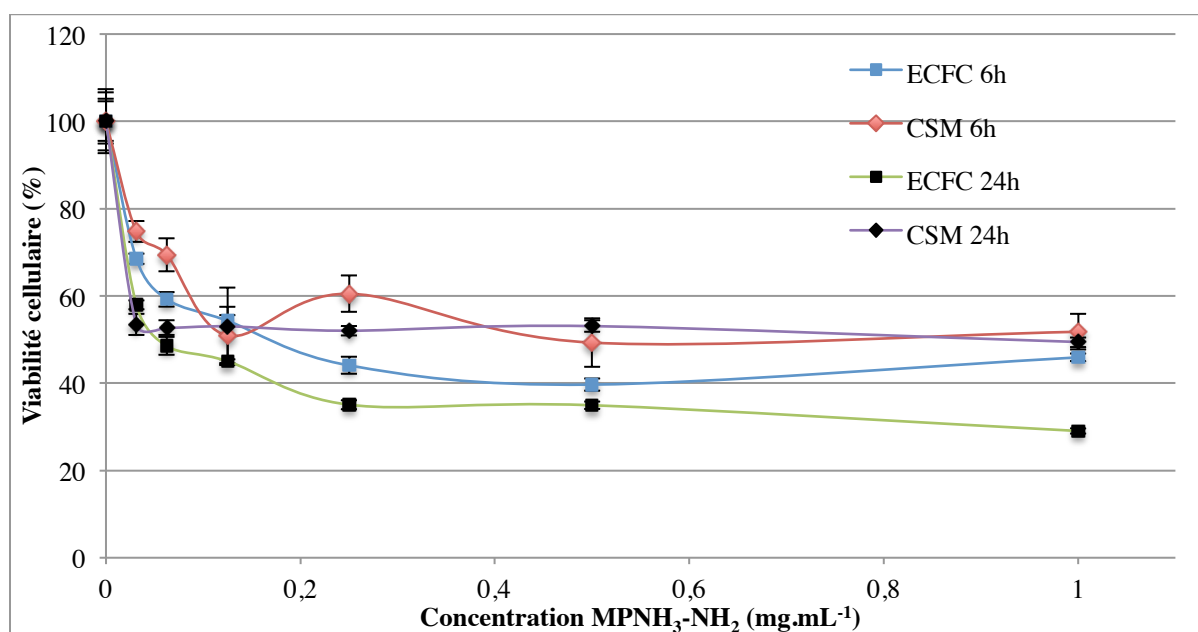
i. Tests MTT

Les tests MTT ont été effectués en utilisant les concentrations présentées ci-dessus sur des ECFC ou des CSM , après une incubation de 6 ou 24 h. Les résultats sont donnés dans les Graphiques 5.19, 5.20 et 5.21 ci-dessous. Ils correspondent aux MPNH₃-OH, MPNH₃-NH₂ et MPNH₃-COOH, respectivement.



Graphique 5.19. Tests MTT réalisés sur des CSM ou des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₃-OH.

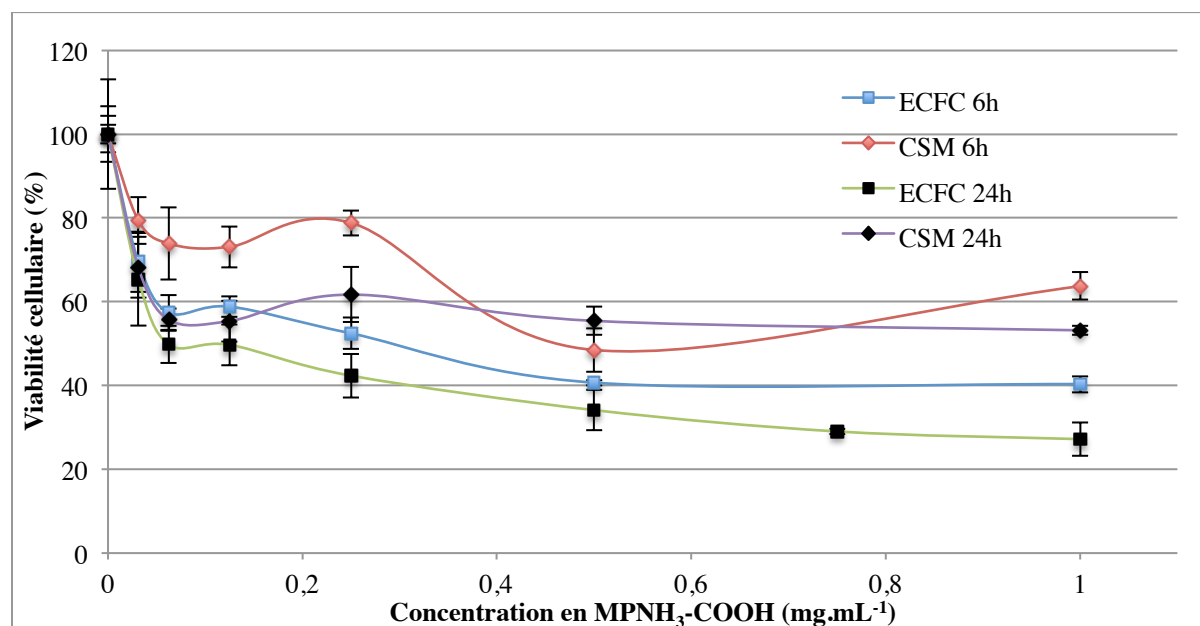
Les MPNH₃-OH présentent une toxicité importante dès les premières concentrations testées : la viabilité est de 86 % pour les ECFC marquées 6 h avec environ 31 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour une application en thérapie cellulaire, il est préférable de se situer à une concentration inférieure à une concentration inhibitrice de 10 % (IC₁₀). Cela signifie une concentration à laquelle la viabilité cellulaire est supérieure à 90 %. Dans ce cas, même la condition citée ci-dessus ne respecte pas ce critère. On observe une viabilité légèrement inférieure après 24 h d'incubation et peu de différence entre ECFC et CSM.



Graphique 5.20. Tests MTT réalisés sur des CSM ou des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₃-NH₂.

La toxicité des MPNH₃-NH₂ est un peu plus importante que celle des MPNH₃-OH, surtout aux faibles concentrations. Les concentrations les plus faibles sont aussi supérieures à l'IC₁₀. Cette fois on constate une viabilité légèrement inférieure pour les ECFC, notamment après 24 h d'incubation (courbe verte et carrés noirs pour les ECFC, courbe violette et losanges noirs pour les CSM). Une courbe est surprenante : celle des CSM exposées 24 h (courbe violette et losanges noirs). La viabilité cellulaire est constante et

proche de 50 % pour toutes les concentrations en $\text{MPNH}_3\text{-NH}_2$ non nulles. Ce profil est inhabituel pour un test de toxicité, soit ces particules sont particulièrement toxiques, soit un phénomène non compris perturbe ce test.



Graphique 5.21. Tests MTT réalisés sur des CSM ou des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$. (n = 3 pour la condition 24 h sur ECFC, courbe verte et carrés noirs)

Le MTT avec les $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ donne des viabilités proches des tests précédents, et on observe de nouveau une viabilité inférieure des ECFC par rapport aux CSM pour les deux temps d'incubation. Aucune concentration ne permet d'avoir plus de 90 % de viabilité. Etant donné que ces tests donnent des viabilités cellulaires trop faibles pour envisager une application, des tests à plus faibles concentrations ont été réalisés sur les $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ (Annexe 1, Graphique 8.4). Ces tests ont permis de déterminer que l' IC_{10} des $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ sur les ECFC est compris entre 6 et 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les $\text{MPNH}_3\text{-OH}$ n'ont pas été choisies car les fonctions silanols présentes en surface sont réputées avoir un effet non négligeable sur les membranes cellulaires. Des effets d'hémolyse^{340, 397} sont notamment rapportés, et il n'existe pas de consensus dans la littérature scientifique concernant leur toxicité *in vitro*. Des travaux rapportent une absence de toxicité de nanoparticules de silice sur des cellules telles que des CSM^{398,399} tandis que d'autres montrent une toxicité sur des lignées cancéreuses⁴⁰⁰ et des cellules endothéliales humaines.⁴⁰¹ Dans ce dernier cas, la toxicité des nanoparticules de silice mesurée par test MTT est fortement dépendante de leur taille. Leurs évaluations sont aussi réalisées avec un dosage des lactates déshydrogénases (LDH), un indicateur de la lyse cellulaire, et donnent des résultats similaires aux tests MTT. La toxicité rapportée pour une incubation de 24 h avec des particules de 15 nm est importante : l' IC_{50} est environ de 40 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. En revanche, des nanoparticules de plus de 100 nm semblent peu toxiques : leur

³⁹⁷ I. I. Slowing et al. Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small*. 2009, 5 (1), 57.

³⁹⁸ D.-M. Huang et al. Highly efficient cellular labeling of mesoporous nanoparticles in human mesenchymal stem cells: implication for stem cell tracking. *FASEB J*. 2005, 19 (14), 2014.

³⁹⁹ H.-M. Liu et al. Mesoporous silica nanoparticles improve magnetic labeling efficiency in human stem cells. *Small*. 2008, 4 (5), 619.

⁴⁰⁰ A. J. Di Pasqua et al. Cytotoxicity of mesoporous silica nanoparticles. *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1416.

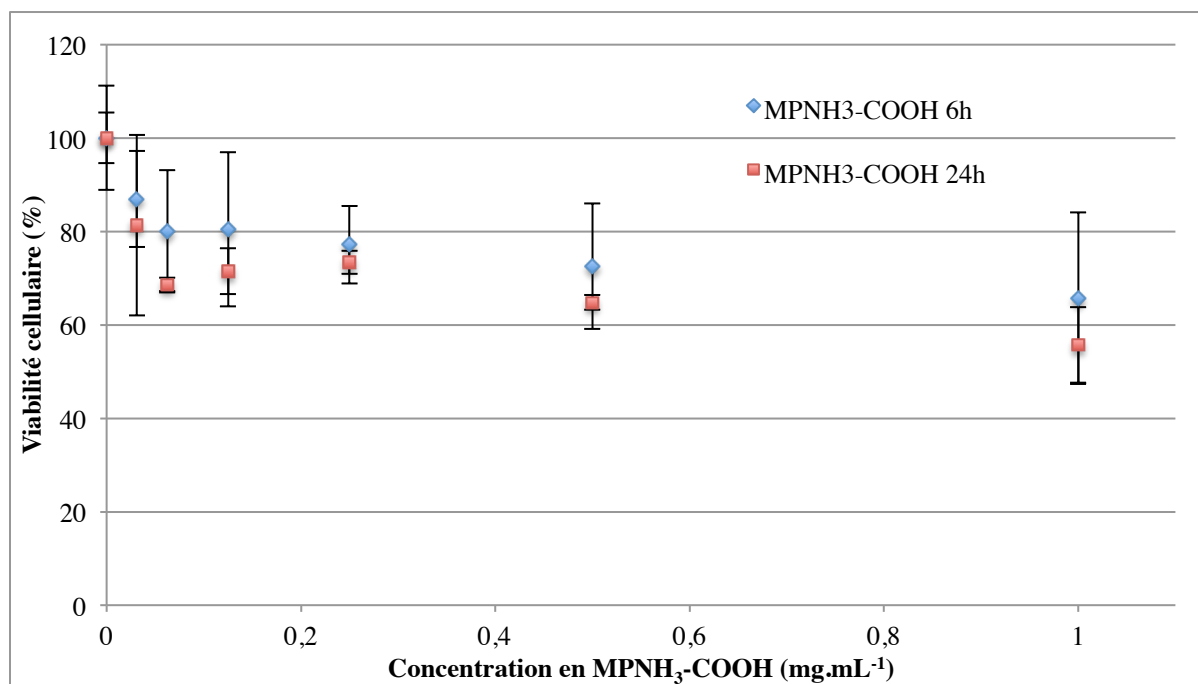
⁴⁰¹ D. Napierska et al. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*. 2009, 5 (7), 846.

IC₅₀ est supérieur à 10³ µg.cm⁻². Dans notre cas, nous utilisons des nanoparticules dont la taille est supérieure à 100 nm et les IC₅₀ observés après 24 h d'incubation sont proches de 37 µg.cm⁻², soit l'IC₅₀ qu'ils obtiennent avec leurs plus petites nanoparticules. Ils précisent aussi observer de la nécrose dès la première heure d'exposition, ce que nous n'observons pas : dans toutes les conditions testées, le tapis cellulaire semble intact après incubation.

La publication rapportant une toxicité sur des cellules cancéreuses⁴⁰⁰ donne des IC₅₀ en fonction du nombre de nanoparticules déposées sur les cellules. Après normalisation, ils obtiennent des valeurs d'IC₅₀ proches de 10⁸ nanoparticules. Ces valeurs sont très inférieures aux valeurs obtenues ici, proches de 10¹¹ nanoparticules. Les nanoparticules qu'ils utilisent font environ 200 nm en MET, et la toxicité est évaluée après 24 h à l'aide de bleu de trypan. Il est possible d'émettre une hypothèse concernant la toxicité importante observée dans cette dernière publication : lors de la synthèse des nanoparticules de silice, une seule étape d'extraction du CTAB, le surfactant utilisé pour créer la silice mésoporeuse, est effectuée. Nous utilisons aussi du CTAB lors de la synthèse de la couche de silice. Cependant, nous réalisons au moins 5 lavages pour l'éliminer, car nous observons toujours le CTAB en spectroscopie infrarouge après 3 lavages. Mais nos conditions de lavages diffèrent des leurs. Cette substance particulièrement toxique pour les cellules peut expliquer une toxicité importante si elle est toujours présente dans les nanoparticules internalisées.

Ces deux comparaisons avec des travaux similaires montrent que la toxicité obtenue avec les MPNH se situe entre deux extrêmes décrits dans la littérature scientifique. De plus, nos nanoparticules ne sont pas identiques à celles utilisées dans les publications citées ci-dessus qui n'utilisent que des nanoparticules de silice et parfois des nanoparticules magnétiques entourées de silice mésoporeuses.

Nous avons réalisé quelques tests MTT sur des macrophages RAW, afin de déterminer si la toxicité importante observée était liée à la sensibilité des ECFC et des CSM (Graphique 5.22).



Graphique 5.22. Tests MTT réalisés sur des cellules RAW ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₃-COOH (n = 2).

La toxicité est moins importante pour les macrophages que pour les ECFC ou les CSM, mais elle devient aussi inférieure à l'IC₁₀ dès la première concentration en MPNH₃-COOH (0,031 mg.mL⁻¹). Cela est en faveur d'une plus grande sensibilité des ECFC et des CSM. Cependant, le fait que les cellules semblent intactes lors de l'incubation avec les nanoparticules et qu'elles ne se décollent pas du fond des puits est difficilement corrélable avec une viabilité inférieure à 50 %. Il est possible que d'autres biais non envisagés soient à l'origine des profils de toxicité observés. Ainsi nous avons décidé de réaliser d'autres tests de toxicité afin de confirmer ou non ces premiers résultats.

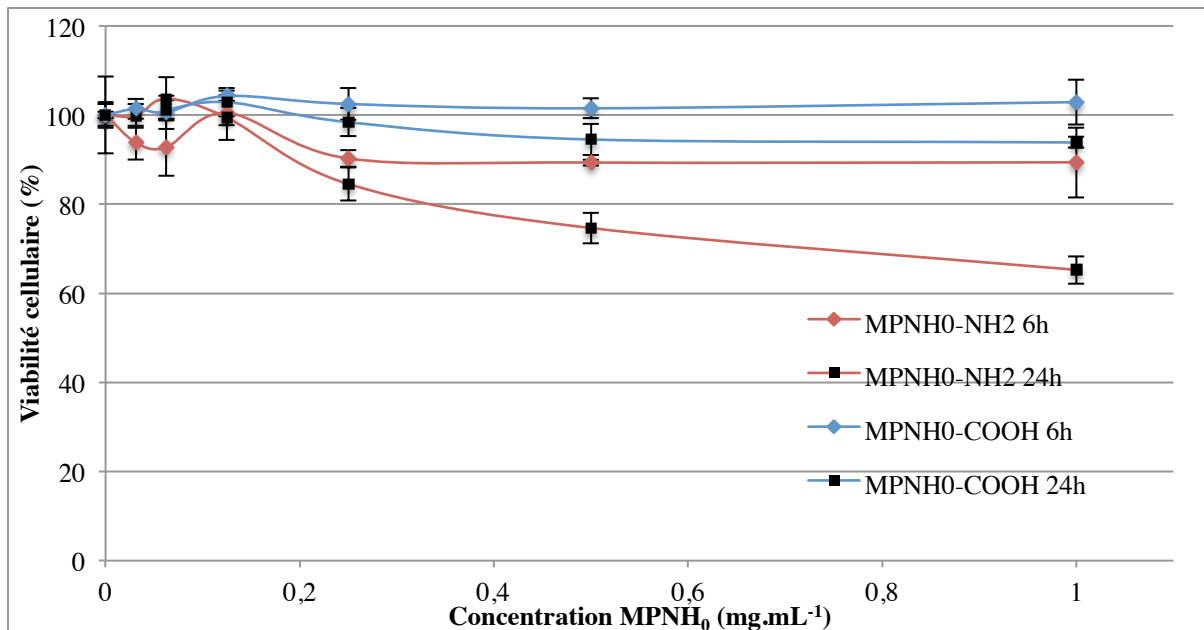
Les groupes silanols présents en surface des nanoparticules de silice sont vraisemblablement responsables d'hémolyse^{340, 397, 402} et de formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).⁴⁰³ De plus, le potentiel des MPNH-OH est plus faible en valeur absolue que celui des MPNH-NH₂ et COOH, ce qui ne favorise pas leur internalisation.³⁷⁰ Pour ces raisons, les tests de toxicité ultérieurs n'ont été réalisés que sur des MPNH fonctionnalisés (MPNH-NH₂ et MPNH-COOH). De surcroît, ces tests n'ont été réalisés que sur des ECFC.

ii. Tests Alamar Blue

Les tests AB ont été effectués avec les quatre types de MPNH sur des ECFC. Ils sont présentés ci-dessous par type de MPNH, la toxicité de chaque type a été évaluée pendant 6 ou 24 h avec un recouvrement -NH₂ ou -COOH (Graphiques 5.23 à 5.26, respectivement).

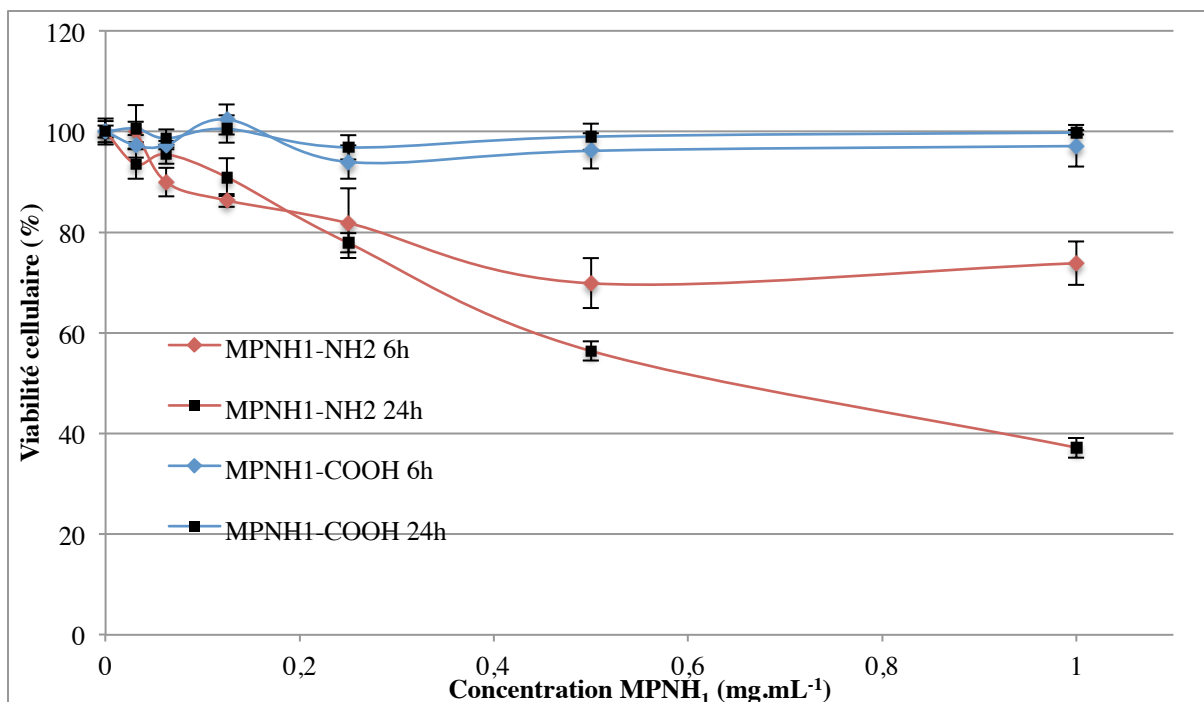
⁴⁰² Y.-S. Lin & C. L. Haynes. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 4834.

⁴⁰³ T. Heikkilä et al. Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 74, 483.

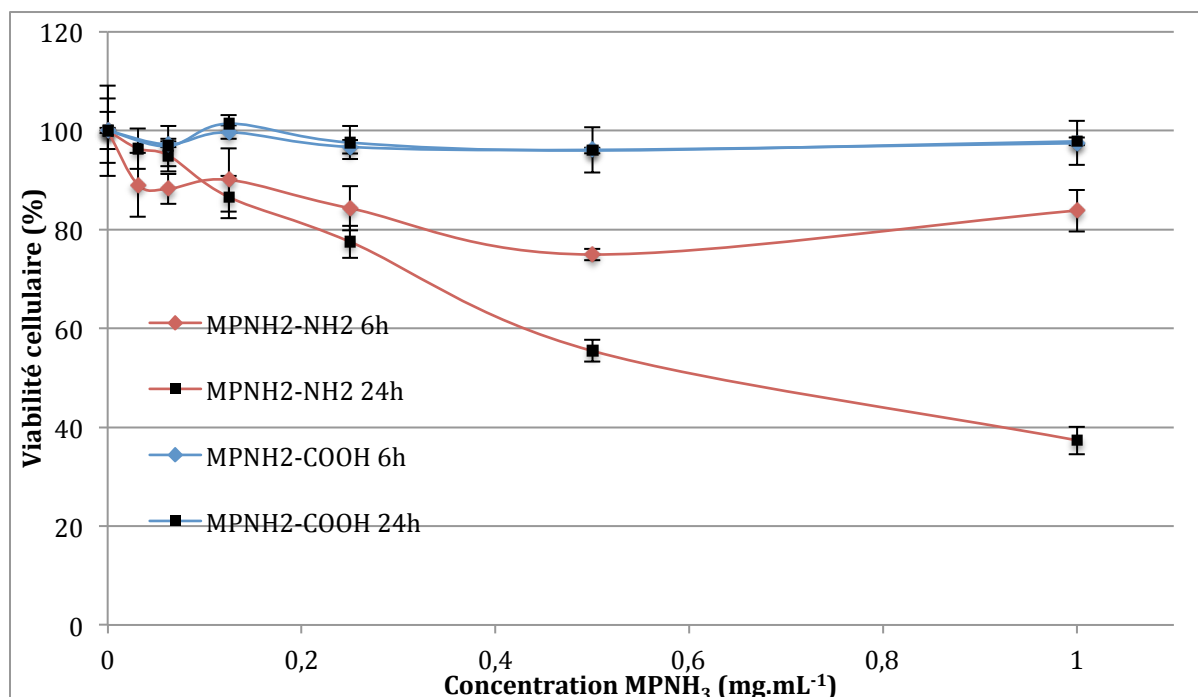


Graphique 5.23. Tests AB réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₀-NH₂ ou -COOH.

Ce premier test montre que seule l'incubation avec des MPNH₀-NH₂ pendant 24 h entraîne une viabilité inférieure à 80 %. Les MPNH₀-COOH ne semblent pas toxiques et le recouvrement amino (courbes rouges) semble entraîner une toxicité plus importante que le recouvrement carboxyle (courbes bleues).

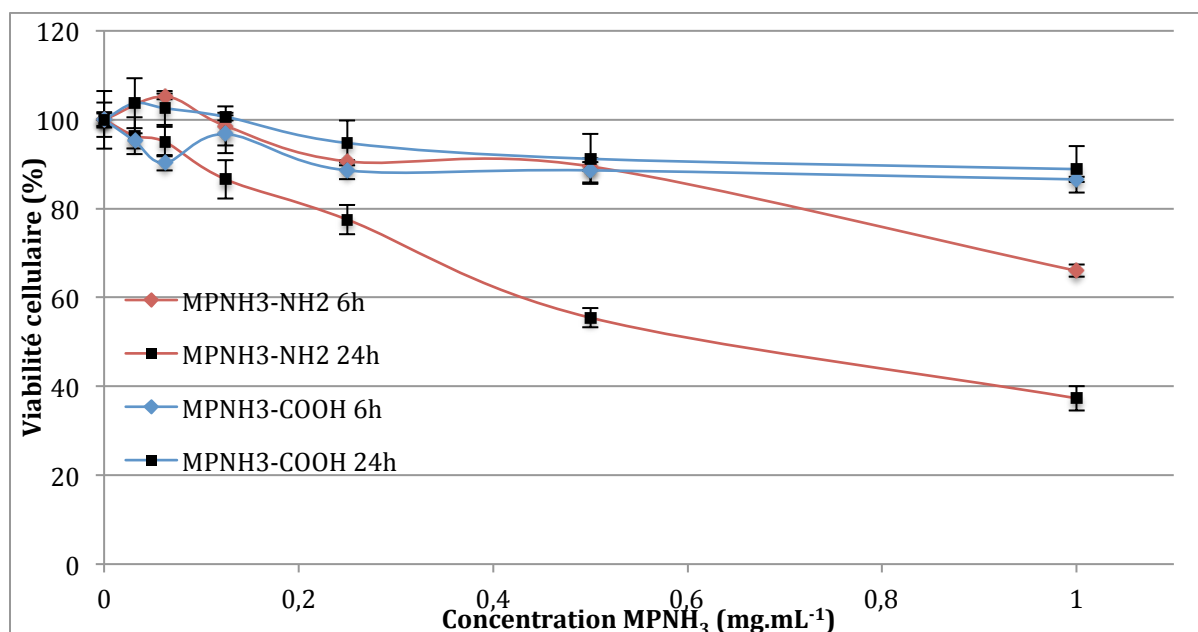


Graphique 5.24. Tests AB réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₁-NH₂ ou -COOH.



Graphique 5.25. Tests AB réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₂-NH₂ ou -COOH.

Les résultats des tests AB sont très proches pour les MPNH₁ (Graphique 5.24) et les MPNH₂ (Graphique 5.25). La toxicité est négligeable pour les particules recouvertes de fonctions carboxyles (courbes bleues), tandis que l'IC₁₀ est inférieure à 0,125 mg.mL⁻¹ pour les MPNH recouverts de fonctions amines (courbes rouges). Le temps d'incubation n'a pas d'effet sur la toxicité des MPNH-COOH, tandis que la toxicité augmente avec celui-ci pour les MPNH-NH₂.



Graphique 5.26. Tests AB réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 ou 24 h avec des MPNH₃-NH₂ ou -COOH.

Pour les MPNH₃, la toxicité est légèrement supérieure à celle des autres MPNH. Les MPNH₃-COOH gardent tout de même une toxicité faible car la viabilité cellulaire reste proche de 90 % même aux concentrations les plus élevées. La toxicité des MPNH₃-NH₂

est très proche de celle des MPNH₁-NH₂ et MPNH₂-NH₂. Pour ces MPNH₃-NH₂, la toxicité dépend aussi de la durée d'incubation.

Contrairement aux tests MTT on observe des différences de viabilité entre les conditions testées : la toxicité dépend des groupes chimiques présents en surface des MPNH. Les MPNH-NH₂ (courbes rouges) sont bien plus toxiques que les MPNH-COOH (courbes bleues). Et pour les MPNH-NH₂, la toxicité est liée au temps d'incubation, contrairement aux MPNH-COOH pour lesquels cette durée n'influence pas la viabilité cellulaire. De plus, pour les MPNH-COOH, la viabilité cellulaire reste supérieure ou égale à 90 %, même aux concentrations les plus importantes en nanoparticules (294 µg.cm⁻² soit 1,0 mg.mL⁻¹). On peut remarquer aussi que les MPNH₃ semblent légèrement plus toxiques que les MPNH₀, MPNH₁ et MPNH₂ si l'on compare les résultats obtenus pour des recouvrements et des durées d'incubation identiques. Les deux types de tests donnent donc des résultats assez différents, surtout aux basses concentrations : le MTT montre une chute rapide de la viabilité cellulaire tandis qu'elle est beaucoup plus lente en AB.

Les différences de toxicité observées lors des tests AB sont potentiellement dues aux recouvrements utilisés, qui peuvent influencer plusieurs facteurs :

- certains recouvrements de nanoparticules peuvent être toxiques,
- le recouvrement peut modifier la quantité internalisée et donc la toxicité,
- la stabilité colloïdale des nanoparticules dépend du recouvrement, et leur état d'aggrégation a une influence sur leur internalisation et leur toxicité.

Ainsi l'absence de toxicité des MPNH-COOH peut être due au fait que ce recouvrement empêche leur internalisation ! Les potentiels ζ des MPNH-OH, -NH₂ et -COOH ont été donnés en partie IV. Les MPNH-NH₂ ont un potentiel positif, tandis que les -COOH ont un potentiel négatif. L'efficacité de l'internalisation de nanoparticules est liée à la valeur absolue de ce potentiel : plus elle est élevée, plus l'internalisation semble efficace³⁷⁰ et les voies d'internalisation changent aussi lorsque le potentiel dépasse une certaine valeur.⁴⁰⁴ En valeur absolue, il n'y a pas de différence significative entre le potentiel ζ des MPNH-NH₂ et celui des MPNH-COOH. Mais la littérature montre que les particules positives sont plus internalisées que les particules négatives,³⁷⁰ ce qui pourrait expliquer une toxicité plus importante des MPNH-NH₂. Cependant, cela n'explique pas la différence observée entre MTT et AB.

iii. Comment expliquer les différences MTT/AB

Le MTT, qui est réduit par des substances intracellulaires telles que le NADH et le NADPH, montre une toxicité importante pour tous les types de recouvrement et les temps d'incubation. Il est légitime de considérer que les substances responsables de la réduction du MTT voient leurs concentrations intracellulaires diminuer lors de l'exposition à des MPNH. Le médiateur de l'AB (1-méthoxyPMS) est pris en charge par les diaphorases, des enzymes dont les cofacteurs sont le NADH et le NADPH. On peut imaginer qu'une augmentation de l'activité des diaphorases, suite à l'internalisation des MPNH, fasse chuter les taux intracellulaires de NADH et NADPH. Cela aboutirait à une transformation efficace de l'AB conjointement à une plus faible réduction du MTT.

⁴⁰⁴ T.-H. Chung et al. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007, 28, 2959.

Plusieurs études démontrent que l'internalisation de nanoparticules de silice perturbe le fonctionnement des mitochondries⁴⁰⁵ ou bien provoque un stress oxydant.⁴⁰⁶ Ce stress oxydant peut être caractérisé par une augmentation intracellulaire de la concentration d'ions superoxyde⁴⁰³ et d'autres ERO, ainsi qu'une chute du taux de glutathion.⁴⁰⁷ De plus, cet effet dépend de nombreux facteurs : outre les effets dose et durée dépendant, la taille des nanoparticules de silice semble jouer un rôle important. Or il se trouve que les enzymes responsables de la transformation de l'AB ont un rôle antioxydant important. Ces diaphorases maintiennent les états réduits de l'ubiquinone ou de l' α -tocophérolquinone, deux substances jouant un rôle antioxydant dans les membranes.^{408, 409} Si les MPNH provoquent un stress oxydant, et que les taux intracellulaires de diaphorases augmentent, il est envisageable que l'activité de ces enzymes consomme le NADH et le NADPH intracellulaire, favorisant une diminution de la transformation du MTT tandis que la transformation de l'AB se trouve augmentée. Ainsi, les variations des tests MTT et AB peuvent être la conséquence d'une perturbation du métabolisme cellulaire et ne résultent pas forcément d'un dysfonctionnement mitochondrial.⁴¹⁰ Il est aussi probable que d'autres biais non compris soient responsables de ces différences. Pour cette raison, il est nécessaire de réaliser des tests qui ne sont pas basés sur la transformation intracellulaire d'un réactif.

Un tableau récapitulatif des tests MTT et AB réalisés sur les ECFC avec les MPNH donne les valeurs d'IC₁₀ et IC₅₀ mesurées en mg.mL⁻¹ (Tableau 5.2)

Type de NP	Recouvrement	MTT (IC ₁₀ /IC ₅₀ en mg.mL ⁻¹)		AB (IC ₁₀ /IC ₅₀ en mg.mL ⁻¹)	
		6 h	24 h	6 h	24 h
MPNH ₀	-OH	--	--	--	--
	-NH ₂	--	--	0,25 / >1	0,2 / >1
	-COOH	--	--	>1 / >1	>1 / >1
MPNH ₁	-OH	--	--	--	--
	-NH ₂	--	--	0,125 / >1	0,125 / 0,75
	-COOH	--	--	>1 / >1	>1 / >1
MPNH ₂	-OH	--	--	--	--
	-NH ₂	--	--	0,125 / >1	0,125 / 0,75
	-COOH	<0,045 / 0,15	--	>1 / >1	>1 / >1
MPNH ₃	-OH	<0,03 / 0,4	<0,03 / 0,13	--	--
	-NH ₂	<0,03 / 0,2	<0,03 / 0,063	0,25 / >1	0,125 / 0,6
	-COOH	0,07 / 0,25	<0,03 / 0,06	0,25 / >1	0,5 / >1

Tableau 5.2. Tableau récapitulatif des tests de toxicité effectués et des valeurs IC₁₀ et IC₅₀ mesurées. Lorsque celles-ci sont inférieures ou supérieures aux concentrations testées, cela est indiqué par < ou > et la valeur de la concentration la plus faible ou la plus élevée testée, respectivement.

⁴⁰⁵ Z. Tao et al. Mesoporous silica nanoparticles inhibit cellular respiration. Nano Lett. 2008, 8 (5), 1517.

⁴⁰⁶ B. L. Razzaboni & P. Bolsaitis. Evidence of an oxidative mechanism for the hemolytic activity of silica particles. Environ. Health Perspect. 1990, 87, 337.

⁴⁰⁷ W. Lin et al. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2006, 217, 252.

⁴⁰⁸ D. Siegel et al. The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. Mol. Pharmacol. 1997, 52, 300.

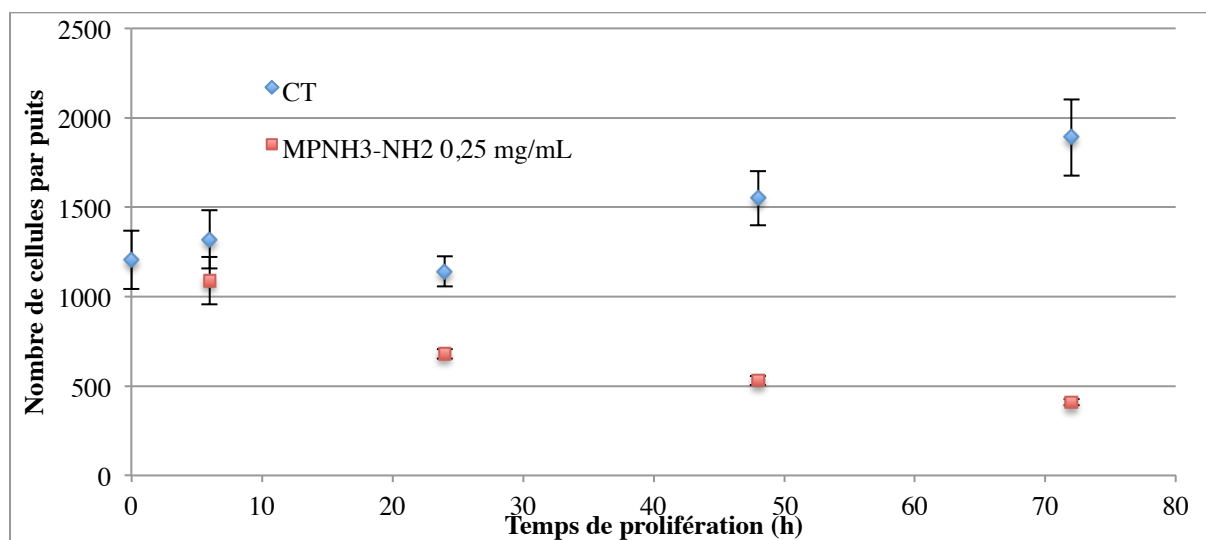
⁴⁰⁹ F. Navarro et al. Protective role of ubiquinone in vitamine E and selenium-deficient plasma membrane. BioFactors. 1999, 9, 163.

⁴¹⁰ S. N. Rampersad. Multiple application of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors. 2012, 12, 12347.

Afin de s'affranchir de ces réactifs, nous avons effectué des tests de prolifération cellulaire, lors desquels seul le bleu de trypan est utilisé pour différencier une cellule viable d'une cellule morte au microscope optique.

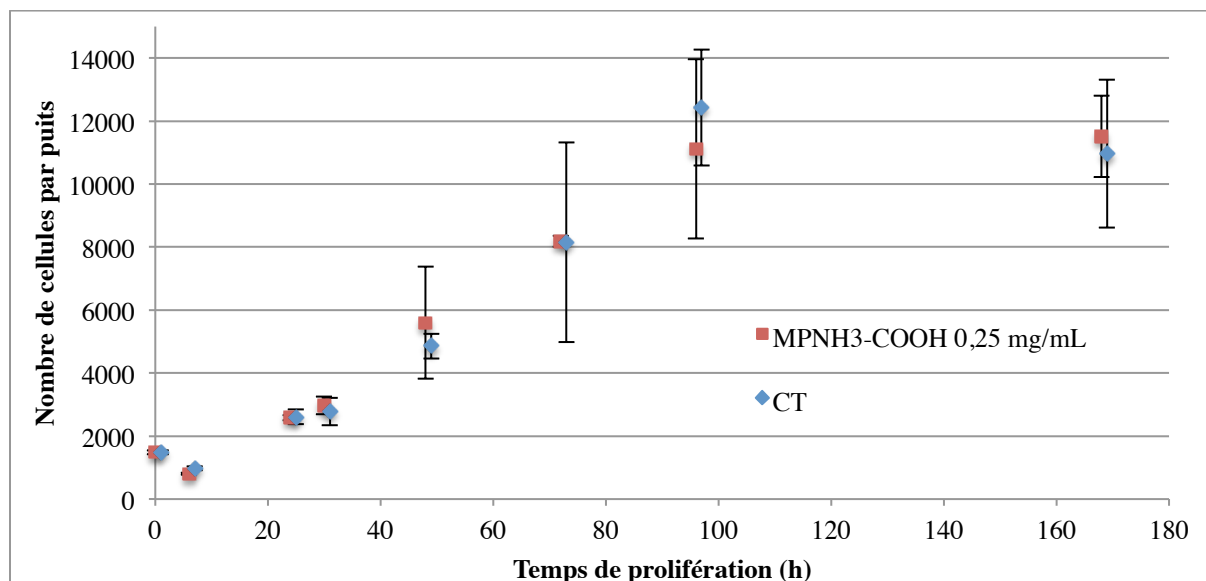
iv. Tests de prolifération cellulaire

Pour les tests de prolifération cellulaire, j'ai choisi une concentration à laquelle on observe des différences importantes entre les recouvrements et les résultats des tests MTT et AB. A la concentration de $73,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), les tests MTT donnent des viabilités proches de 50 %, tandis que les tests AB donnent des viabilités supérieures à 90 % pour les MPNH-COOH et proches de 80 % pour les MPNH-NH₂. J'ai réalisé ces tests de prolifération sur des ECFC avec des MPNH₃-NH₂ ou -COOH (Graphiques 5.27 et 5.28). Les cellules sont exposées à des MPNH pendant 6 h, puis les cellules présentes dans trois puits sont comptées et comparées à trois puits témoins à chaque temps.



Graphique 5.27. Test de prolifération cellulaire réalisé sur des ECFC ayant incubé 6 h avec des MPNH₃-NH₂.

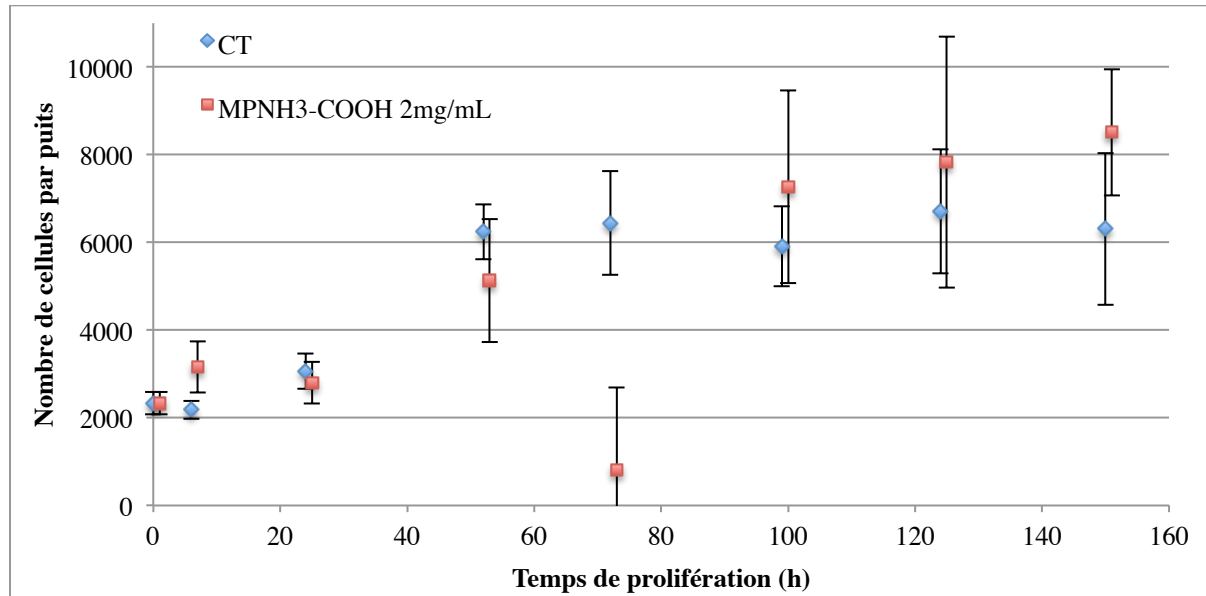
Une exposition de 6 h à $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MPNH₃-NH₂ semble altérer significativement la prolifération des ECFC. La même condition de marquage a été testée avec des MPNH₃-COOH (Graphique 5.28).



Graphique 5.28. Test de prolifération cellulaire réalisé sur des ECFC ayant incubé 6 h avec des MPNH₃-COOH.

En revanche, l'incubation avec les MPNH₃-COOH n'altère pas la prolifération des ECFC, même après 7 jours de prolifération.

On observe donc une toxicité dépendante du recouvrement des nanoparticules. Ce résultat est similaire à celui obtenu lors des tests AB : les MPNH₃-NH₂ semblent perturber la prolifération des ECFC, contrairement aux MPNH₃-COOH à la concentration testée. Les tests AB montrent aussi que même de fortes concentrations en MPNH-COOH ne sont pas toxiques, j'ai donc réalisé un troisième test de prolifération en faisant incuber les ECFC avec 588 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (soit 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) pendant 6 h (Graphique 5.29).



Graphique 5.29. Test de prolifération cellulaire réalisé sur des ECFC ayant incubé 6 h avec une concentration élevée de MPNH₃-COOH.

Les tests de toxicité sont en faveur d'une faible toxicité des MPNH-COOH. De plus, Les MPNH-NH₂ ont une stabilité colloïdale inférieure aux MPNH-COOH. En effet, on constate à l'oeil nu que les MPNH-NH₂ flocculent et sédimentent dans le milieu de culture lors des incubations. Pour les marquages et les caractérisations cellulaires ultérieures, une concentration de 73,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en MPNH-COOH sera utilisée. Tout d'abord, l'évaluation de leur internalisation a été réalisée, les résultats sont présentés ci-dessous.

b) Internalisation

i. Microscopie électronique

Les conditions de marquage des ECFC pour la MET sont les mêmes que celles utilisées pour les deux premiers tests de prolifération cellulaire (6 h, 73,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ soit 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ces marquages n'ont été réalisés qu'avec des MPNH-COOH. L'équivalence en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ est particulièrement importante dans les dernières expériences décrites si on veut être dans les mêmes conditions que les tests de toxicité car la quantité de cellules utilisée est bien plus importante et la culture se fait dans des plaques 6 ou 12 puits, voire dans des T25 ou 75 pour les expériences de MET.

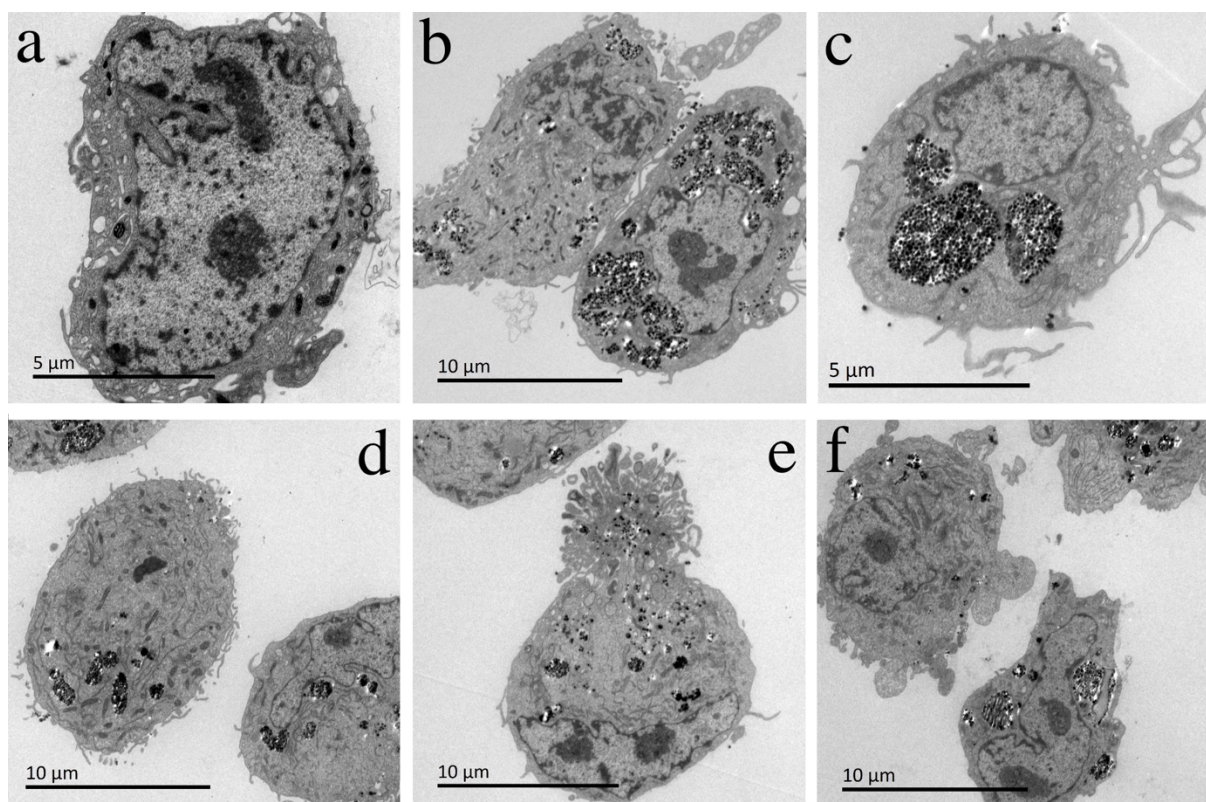


Figure 5.14. Images MET d'ECFC. a) Cellules témoins n'ayant pas incubé avec des MPNH. ECFC ayant incubé 6 h avec $73,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de MPNH₀-COOH (b), MPNH₁-COOH (c), MPNH₂-COOH (d et e) et MPNH₃-COOH (f). On observe des perturbations des membranes sur quelques ECFC marquées (e).

Les ECFC marquées avec des MPNH₂-COOH et MPNH₃-COOH (Figures 5.14.d et f, respectivement) semblent contenir moins de nanoparticules que celles marquées avec les MPNH₀-COOH ou MPNH₁-COOH (Figures 5.14.b et c). On observe aussi différentes sortes d'excroissances au niveau de la membrane cellulaire des ECFC fixées. Certaines proéminences font penser à des blebs, ou bulles (Figure 5.15), qui peuvent être observées dans de nombreux phénomènes physiologiques.⁴¹¹ Celles-ci ont été observées sur les cellules témoins (Figure 5.15.a) ou des cellules marquées avec des MPNH₁-COOH ou MPNH₃-COOH (Figures 5.15.b et 5.14.f, respectivement).

Ce phénomène de blebbing est caractéristique du début de l'apoptose mais peut aussi survenir pour favoriser la mobilité cellulaire, lors de la cytodierèse,⁴¹¹ pour réguler rapidement la tension de la membrane plasmique⁴¹² ou lors d'un stress chimique ou physique.⁴¹³ Il est ainsi possible que la fixation réalisée ait provoqué l'apparition de blebs sur quelques cellules, y compris sur les cellules non marquées.

⁴¹¹ G. T. Charras. A short history of blebbing. *J. Microsc.* 2008, 231 (3), 466.

⁴¹² L. L. Norman et al. Cell blebbing and membrane area homeostasis in spreading and retracting cells. *Biophys. J.* 2010, 99, 1726.

⁴¹³ G. Charras & E. Sahai. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, 15, 813.

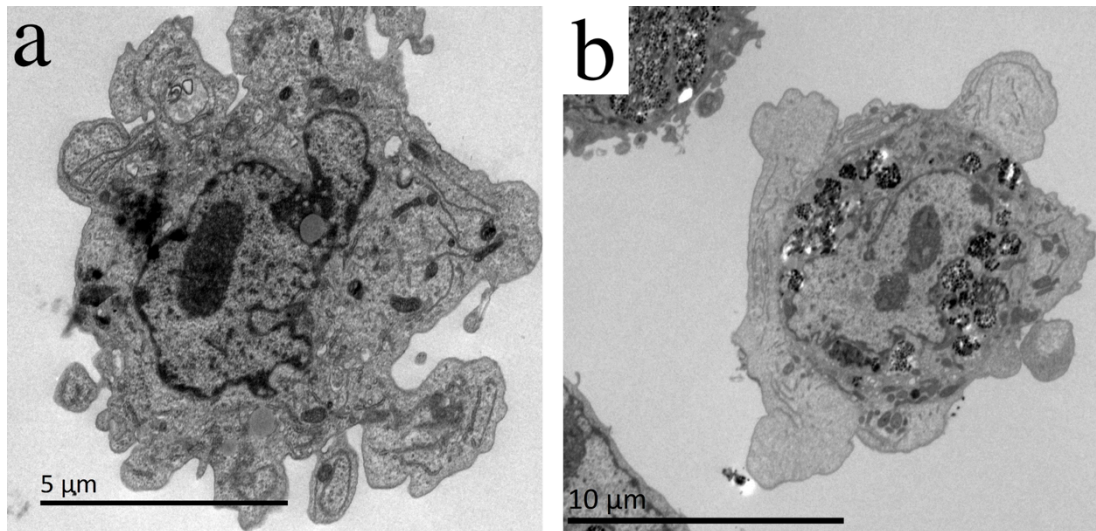


Figure 5.15. Images MET d'ECFC non marquées (a) ou ayant incubé 6 h avec des MPNH₁-COOH (b). On peut observer des blebs se former au niveau de la membrane des cellules.

Un autre type de proéminences de membranes peut aussi être observé sur des ECFC marquées avec des MPNH₁-COOH ou des MPNH₂-COOH (Figure 5.16).

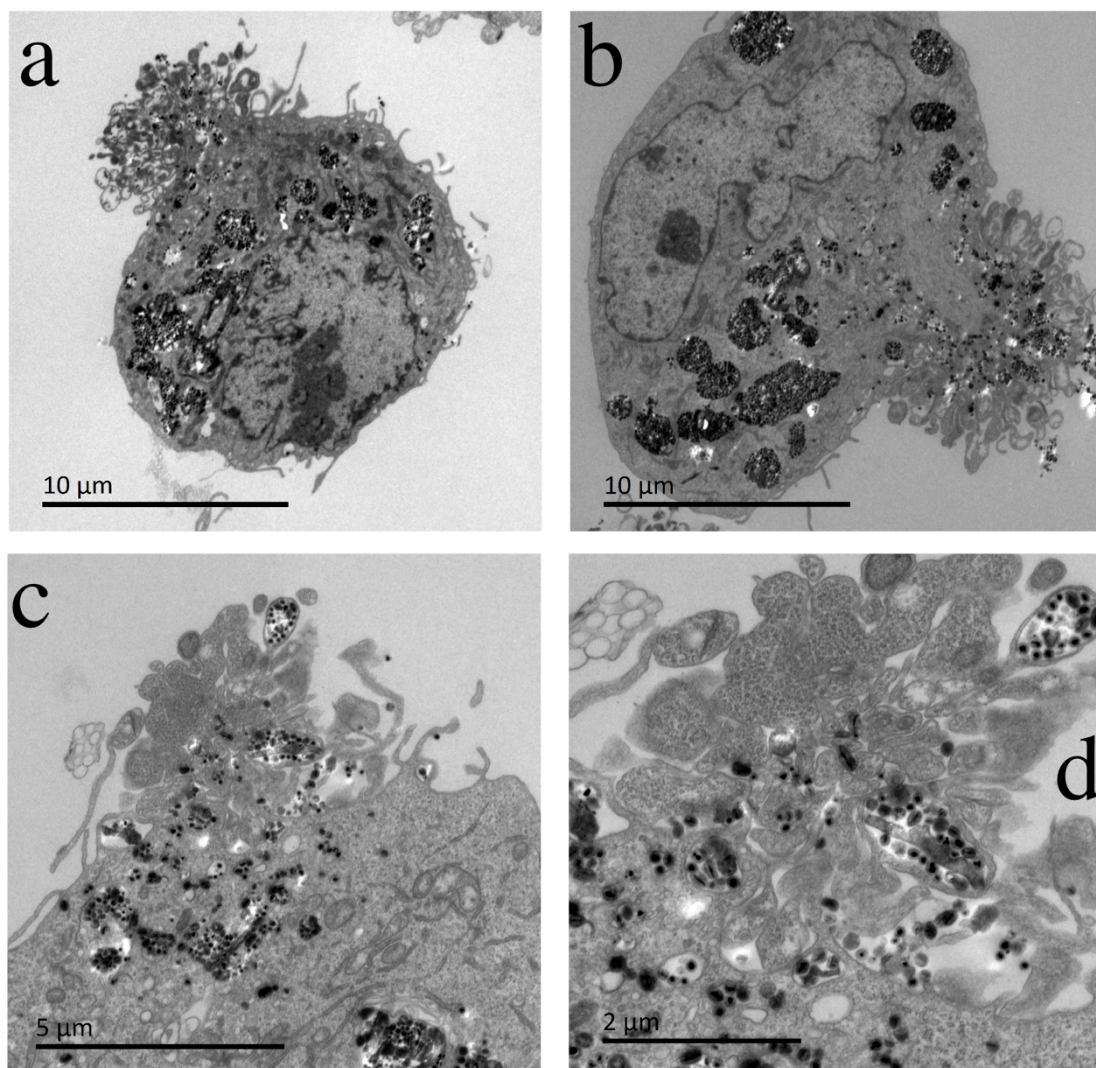


Figure 5.16. Images de MET montrant des zones de rupture membranaire d'ECFC marquées avec des MPNH₁-COOH (a) ou des MPNH₂-COOH (b-d).

Ces proéminences, contrairement aux blebs précédemment évoqués, semblent être le lieu d'une rupture de la membrane, a priori synonyme de mort cellulaire. De plus, les nanoparticules sont distribuées de manière variable à l'intérieur des cellules. On voit qu'elles peuvent être rassemblées dans de grandes vésicules vraisemblablement issues de pinocytose ou plutôt isolées dans de plus petites vésicules, voire libres dans le cytoplasme (Figure 5.17).

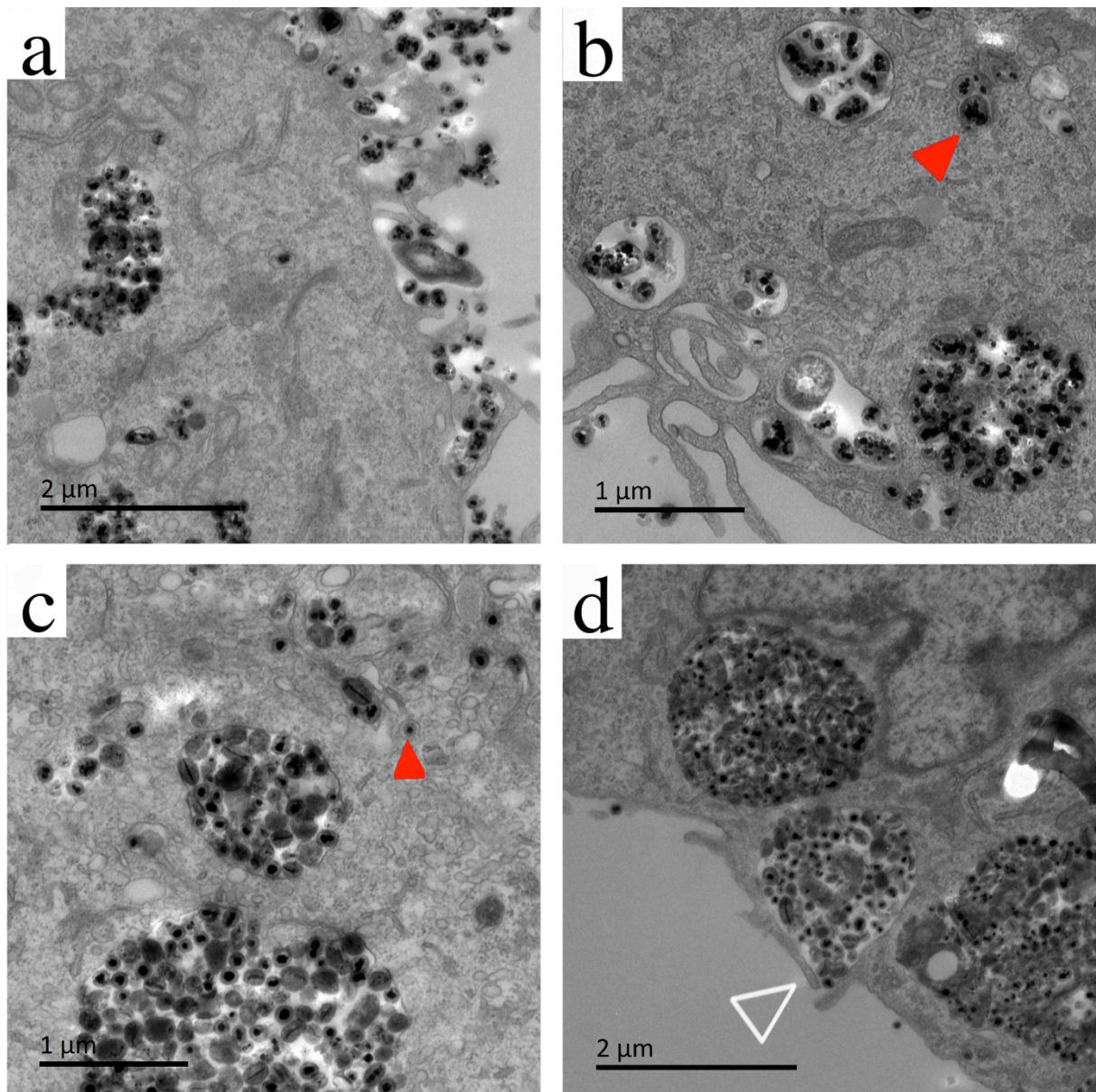


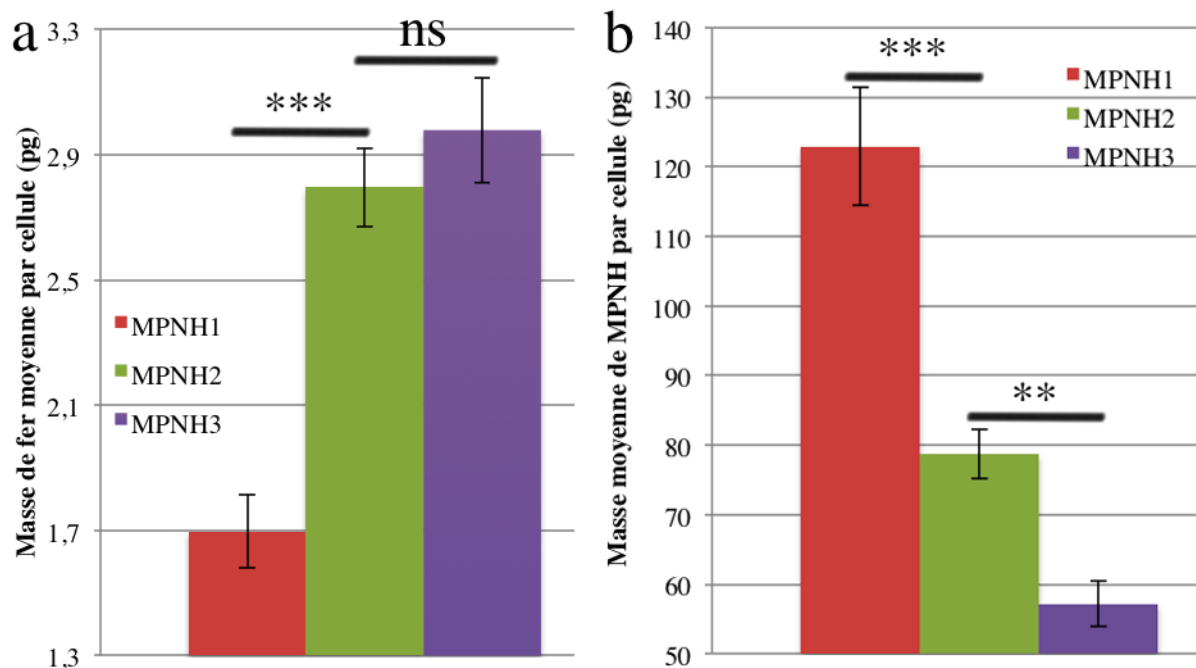
Figure 5.17. Images de MET agrandies d'ECFC ayant été incubées avec des $MPNH_0-COOH$ (a,b) et des $MPNH_2-COOH$ (c,d). On peut observer des nanoparticules contenues dans de petites vésicules d'endocytose (pointes de flèches rouges) ou la fermeture de grandes vésicules de macropinocytose (pointe de flèche blanche).

Ces expériences de microscopie montrent bien que les $MPNH-COOH$ sont internalisés par les ECFC et que les résultats de toxicité obtenus par les tests d'AB et de prolifération ne sont pas la conséquence d'une absence de leur internalisation. Ces particules sont aussi internalisées selon différentes voies : des $MPNH$ sont observés dans de petites vésicules intracellulaires (pointes de flèches rouges, Figure 5.17), tandis que la majorité est regroupée dans de grandes vésicules de macropinocytose (pointes de flèches blanches, Figure 5.17). Les $MPNH$ isolés dans des petites vésicules ont probablement

suivi une endocytose clathrine dépendante, comme cela a été montré pour des nanoparticules de silice d'une centaine de nanomètres.³⁹⁸ Cela peut entraîner une distribution variée à l'intérieur des cellules. Bien que la majeure partie du contenu des endosomes se retrouve au sein des lysosomes,³⁹⁹ il semble que des nanoparticules de silice sortent des endosomes et se retrouvent dans le cytoplasme.³³⁹ Cette présence de certaines nanoparticules dans le cytoplasme peut être problématique car elles peuvent alors se retrouver en contact avec des organites intracellulaires tels que les mitochondries³⁹⁸ ou les ribosomes, voire la membrane nucléaire. De telles interactions peuvent éventuellement entraîner un stress de ces organites et perturber le métabolisme cellulaire. Ce type d'interactions pourrait être la cause des résultats de toxicité élevée observés lors des tests de MTT.

ii. Expérience de magnétophorèse

Pour quantifier l'internalisation des MPNH par les cellules, une expérience de magnétophorèse a été réalisée au MSC en marquant les ECFC dans des conditions identiques à celle de l'expérience de MET. La magnétophorèse permet de déterminer la masse moyenne d'USPIO que chaque cellule contient (Figure 5.30.a). A partir de cette masse et des données d'ICP-MS déterminées dans la Partie IV, on peut remonter à une masse moyenne de MPNH par cellule (Graphique 5.30.b). Le seul inconvénient de cette technique est qu'on ne peut pas mesurer la masse moyenne de MPNH₀ car ils ne contiennent pas de fer et ne provoquent pas de déplacement des cellules vers l'aimant.



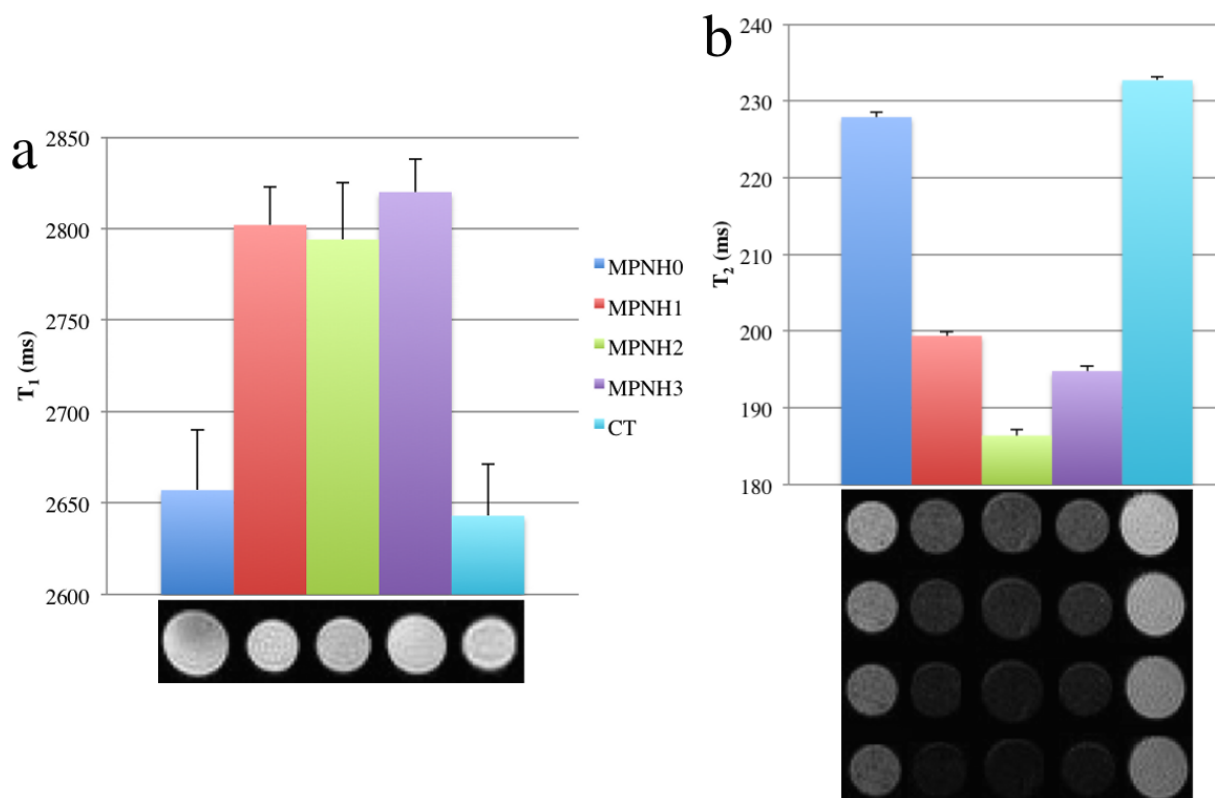
Graphique 5.30. Expérience de magnétophorèse permettant d'évaluer la masse moyenne de fer (a), et donc de MPNH (b), dans des cellules ECFC après 6 h d'incubation avec les MPNH₁-COOH, MPNH₂-COOH et MPNH₃-COOH. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test Anova suivi par une comparaison de Bonferroni, les barres d'erreur montrent les erreurs types des moyennes (n = 88, 178 et 109, respectivement). **, *** correspondent à p<0,01 et p<0,001, respectivement.

Malgré la faible proportion d'USPIO dans les MPNH, il est possible d'attirer des ECFC marquées à l'aide d'un aimant *in vitro*. La magnétophorèse montre que les cellules marquées avec les MPNH₂-COOH contiennent la même quantité de fer que celles marquées avec les MPNH₃-COOH (Graphique 5.30.a). Rappelons que les pourcentages massifs respectifs de fer dans ces hybrides valent 3,55 et 5,21 % (Partie IV). Cela

explique la plus faible masse moyenne de MPNH₃-COOH internalisée par chaque ECFC comparée avec les MPNH₂-COOH (Graphique 5.30.b) : les MPNH₃ sont moins bien internalisés que les MPNH₂ et les MPNH₁. Nous avons évoqué les différences morphologiques des MPNH en Partie IV, il est probable que celles-ci soient à l'origine de différences d'internalisation.⁴¹⁴ Le marquage le plus efficace sera donc celui pour lequel le compromis luminescence, susceptibilité à être attiré par un aimant et contraste obtenu en IRM sera le plus intéressant.

iii. Expérience d'IRM

Après l'expérience de magnétophorèse, les cellules ont été fixées dans l'agarose pour être caractérisées par spectrométrie IRM afin de mesurer les temps T_1 et T_2 des gels obtenus (Graphique 5.31).



Graphique 5.31. Mesures de T_1 (a) et T_2 (b) de gels d'agarose ensemencés avec $1,5 \cdot 10^6$ ECFC par mL. Le tube témoin (CT) contient des ECFC non marquées fixées dans de l'agarose à la même concentration que les autres tubes. On peut voir des images des gels d'agarose sous les graphiques, en pondération T_1 (a) et T_2 (b).

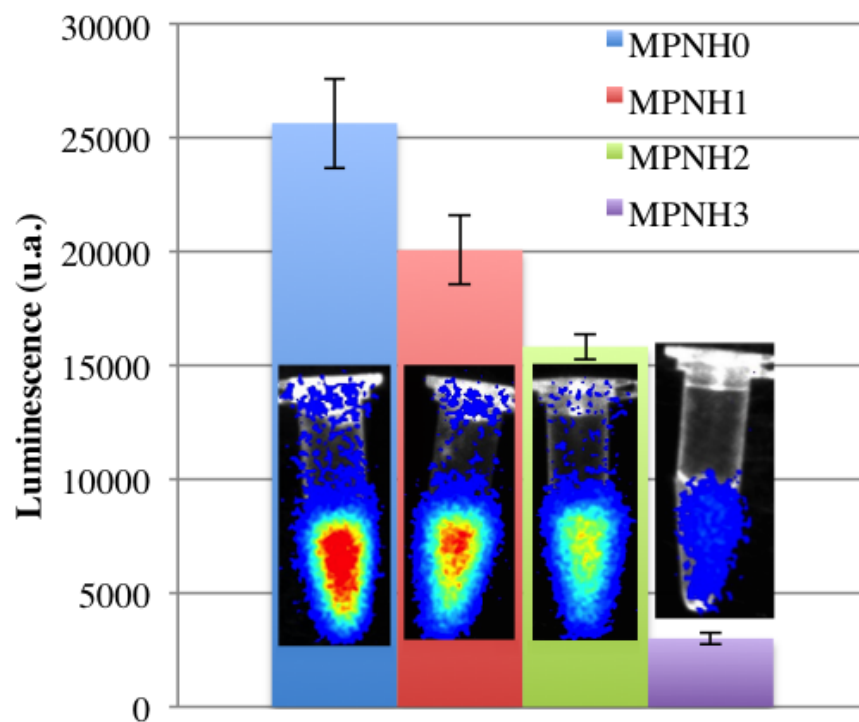
Les images pondérées en T_1 suggèrent une légère influence de la présence d'USPIO sur le contraste des gels (Graphique 5.31.a). En effet, il n'y a pas de différence entre le T_1 du témoin et celui du gel contenant les ECFC marquées avec les MPNH₀-COOH. Les trois gels contenant des ECFC marquées avec des MPNH_{1,2,3}-COOH ont des T_1 légèrement supérieurs au témoin. L'évolution du contraste est plus importante sur les images pondérées en T_2 (Figure 5.31.b) ce qui correspond bien à l'effet observé en Partie IV. De plus, le gel contenant les cellules marquées avec les MPNH₀-COOH (barre bleu foncé, graphique 5.31.b) a un contraste similaire au gel témoin contenant des ECFC non marquées. On voit que les trois tubes contenant des cellules marquées avec des MPNH possédant des USPIO (MPNH_{1,2,3}) ont un T_2 plus faible que le témoin. En revanche, le

⁴¹⁴ X. Huang et al. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 2010, 31, 438.

tube contenant des ECFC marquées avec les MPNH₃-COOH a un T₂ plus élevé que celui contenant les ECFC marquées avec les MPNH₂-COOH. Malheureusement cet écart ne peut être expliqué autrement que par un biais d'expérimentation. Il est probable que les cellules ne soient pas distribuées de manière homogène dans les échantillons.

iv. Mesure de luminescence

On ne peut pas quantifier l'internalisation à l'aide de la luminescence émise par les cellules marquées. En effet, en fonction du milieu dans lequel sont placées les MPNH, la luminescence peut être perturbée par les USPIO, comme je l'ai évoqué en Partie IV (Graphique 4.4). En revanche, il est intéressant de comparer l'intensité lumineuse de cellules marquées avec les quatre MPNH dans les mêmes conditions. Les gels utilisés en IRM sont illuminés avec une DEL orange et la luminescence persistante est mesurée (Graphique 5.32).



Graphique 5.32. Luminescence de 200 µL de gels d'agarose contenant $1,5 \cdot 10^6$ ECFC par mL ayant incubé 6 h en présence de $72,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de chaque type de MPNH-COOH.

Après illumination visible, la luminescence des cellules marquées avec les MPNH dépend du type de MPNH utilisé. On peut remarquer qu'elle est bien plus faible pour les cellules marquées avec les MPNH₃-COOH que pour les autres types. Or, le marquage avec les MPNH₃-COOH aboutit à une quantité d'USPIO non significativement différente de celle obtenue avec les MPNH₂-COOH (Graphique 5.30.a) alors qu'il y a un facteur 6 entre la luminescence des cellules marquées avec les MPNH₃-COOH et celles des cellules marquées avec les MPNH₂-COOH (Graphique 5.32). Cela est en défaveur de l'utilisation des MPNH₃-COOH pour réaliser une expérience de vectorisation cellulaire *in vivo*. De plus, bien qu'il soit possible d'attirer les ECFC marquées avec les MPNH₁-COOH *in vitro*, le gain en luminescence est faible par rapport aux MPNH₂-COOH (augmentation d'un tiers) tandis que la quantité d'USPIO internalisée est significativement plus importante lorsque le marquage est effectué avec les MPNH₂-COOH. Les MPNH₂-COOH semblent donc être le meilleur candidat pour marquer des cellules et les suivre *in vivo* en essayant de les attirer à l'aide d'un aimant.

c) Evaluation des propriétés cellulaires

i. Capacité de migration

In vitro, l'étude de la migration de cellules peut être réalisée à l'aide d'un test appelé "Scratch assay".⁴¹⁵ Pour effectuer un tel test, il suffit d'ensemencer des puits avec des cellules à confluence et de réaliser des "blessures" en grattant le fond des puits avec un cône. Cette blessure mime une rupture de l'endothélium en présence de laquelle les cellules endothéliales situées au bord vont migrer pour cicatriser. On appelle parfois ce test "wound healing" et en comparant les vitesses de cicatrisation entre des populations de cellules ayant incubé avec différentes substances, on en déduit leurs effets sur la capacité de migration des cellules. La durée du test est fixée par les cellules qui migrent le plus rapidement : lorsque la première blessure est fermée, on compare les cinétiques de migration des cellules pour chaque condition.

Pour réaliser ce test, deux détails sont importants : afin de minimiser les variations entre les échantillons, il faut réaliser les blessures les plus similaires possible, et il faut s'affranchir du phénomène de division cellulaire.

Si des blessures trop différentes sont réalisées, c'est à dire ne possédant pas les mêmes largeurs, il est possible d'observer un retard à la cicatrisation dans certains puits qui sera uniquement dû au fait que la distance séparant les deux bords des blessures sera plus grande que celle du témoin. C'est ce qu'on observe sur la Figure 5.18. Deux blessures de tailles différentes (Figure 5.18.a et c) ont été réalisées et la cicatrisation n'est pas totale après 24 h dans le cas de la blessure la plus large (Figure 5.18.d).

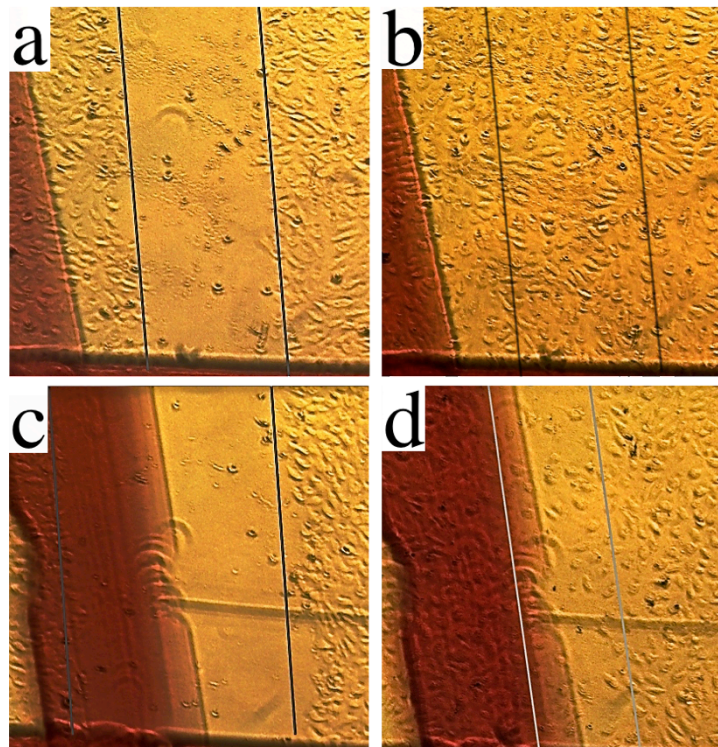


Figure 5. 18. Illustration de l'influence de la taille de la blessure initiale sur la cicatrisation après 24 h. Deux blessures sont réalisées au même moment (a et c), après 24 h la petite blessure est refermée tandis que la blessure la plus large est toujours visible.

⁴¹⁵ C.-C. Liang et al. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. Nat. Protoc. 2007, 2 (2), 329.

Les blessures ont été réalisées après 6 h d'incubation avec chaque type de MPNH-COOH, à la concentration de $73,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). De plus, cette expérience a été réalisée dans du milieu contenant 2 ou 10 % de sérum afin d'observer la différence due à la division des ECFC. En effet, en présence de 10 % de sérum, une part non négligeable de la blessure va se refermer à cause de la prolifération des ECFC, ce qui ne sera pas le cas en présence de 2 % de sérum. L'évaluation de la migration a été réalisée 24 et 44 h après blessures. 6 zones blessées ont été photographiées pour évaluer la cicatrisation dans chaque zone. Les Figures 5.19 et 5.20 montrent les blessures initiales et 24 h après.

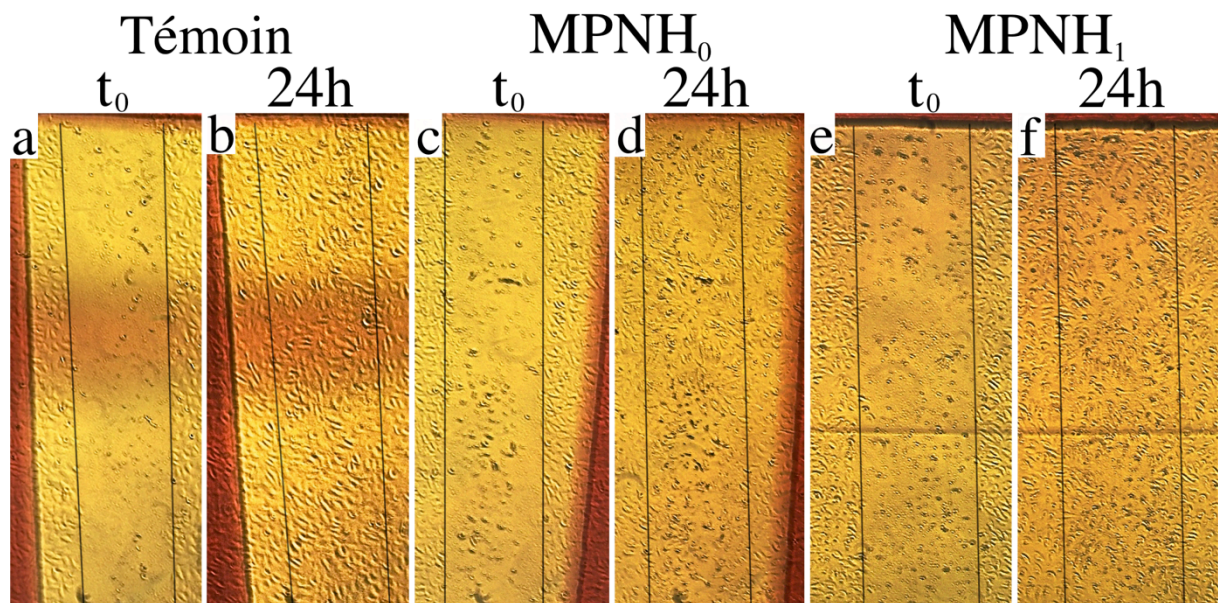


Figure 5.19. Scratch assays réalisés sur les ECFC non marquées (a,b) ou marquées avec des $\text{MPNH}_0\text{-COOH}$ (c,d) et des $\text{MPNH}_1\text{-COOH}$ (e,f) cultivées dans du milieu contenant 2 % de sérum. Les blessures sont visualisées à t_0 (a,c,e) ou après 24 h (b,d,f). Les barres grises verticales délimitent les blessures initiales.

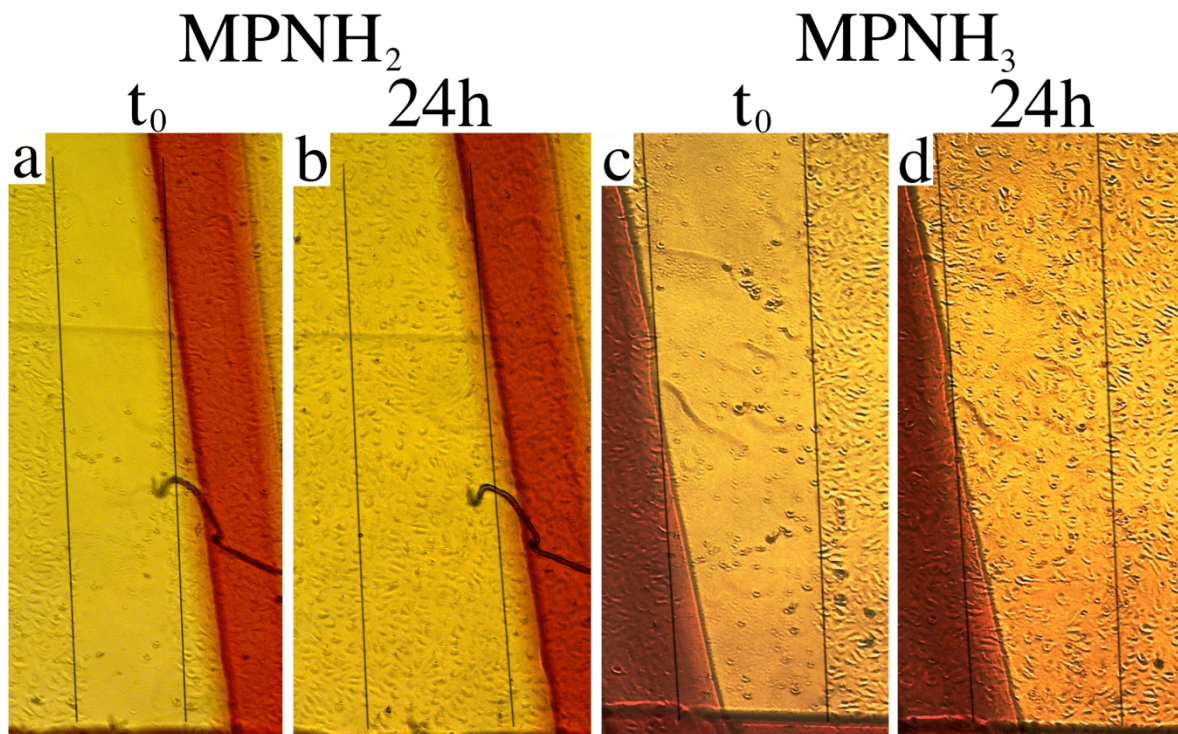
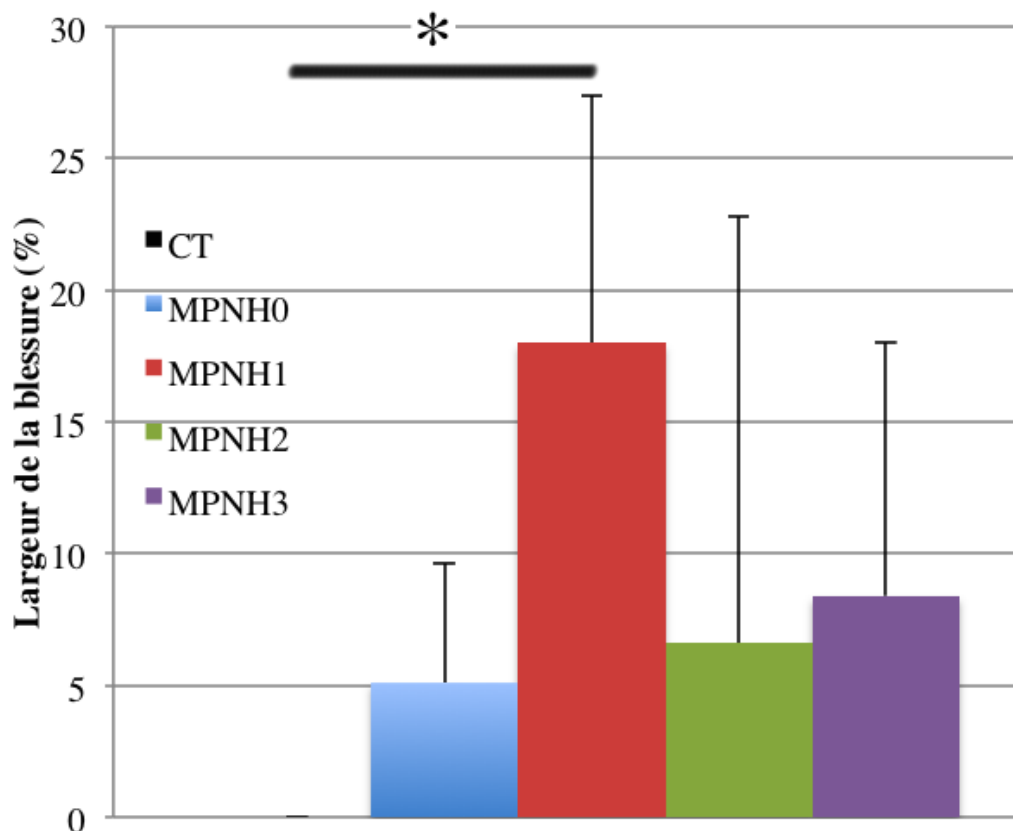


Figure 5.20. Scratch assays réalisés sur les ECFC marquées avec des $\text{MPNH}_2\text{-COOH}$ (a,b) et des $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ (c,d) cultivées dans du milieu contenant 2 % de sérum. Les blessures sont visualisées à t_0 (a,c) ou après 24 h (b,d). Les barres verticales délimitent les blessures initiales.

Les cicatrices sont presque toutes refermées au bout de 24 h. Les cicatrifications sont quantifiées et les éventuels retards sont calculés en pourcentage par rapport aux blessures initiales (Graphique 5.33).



Graphique 5.33. Evolution de la largeur des blessures réalisées au fond de puits ensemencés par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH. * correspond à $p < 0,05$.

Dans les puits contenant 10 % de sérum, les blessures étaient toutes refermées après 24 h d'incubation, contrairement aux puits contenant 2 % de sérum qui ont permis d'observer des différences entre les conditions de marquages. Cependant, les retards observés ne sont significatifs ($p < 0,05$) qu'entre les ECFC témoins et les ECFC marquées avec les MPNH₁-COOH (Graphique 5.33). Après 44 h, toutes les blessures avaient disparu. Or, d'après la magnétophorèse, les MPNH₁-COOH sont les nanoparticules les plus internalisées par les ECFC (sans considérer les MPH₀). Il est envisageable que l'internalisation plus importante des MPNH₁ soit responsable du retard significatif observé.

Une publication montre qu'un marquage de progéniteurs endothéliaux avec des bionanoparticules magnétiques a un effet significatif sur leur viabilité, leur prolifération et leur migration dès une concentration supérieure à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.⁴¹⁶ Mais la différence de nanoparticules utilisées, un temps d'incubation de 3 jours et une concentration non rapportée à une masse de nanoparticules par unité de surface ne permettent pas de comparer nos résultats de manière rigoureuse. Une autre étude a déterminé l'influence d'un marquage de cellules épithéliales par des nanoparticules sur leur capacité à

⁴¹⁶ H.-J. Kang et al. Magnetic bionanoparticles enhances homing of endothelial progenitor cells in mouse hindlimb ischemia. Korean. Circ. J. 2012, 42 (6), 386.

migrer.⁴¹⁷ Les nanoparticules d'oxyde de titane, de silice et d'hydroxyapatite utilisées ont des diamètres hydrodynamiques proches de 270 nm. Après réalisation d'une blessure avec le même type de cône de pipette que nous (200 μL), les nanoparticules ont été déposées pendant 12 h sur les cellules. Les concentrations testées sont 125 μM et 1,25 mM, ce qui correspond à peu près à 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A ces concentrations les cellules sont viables mais migrent avec un retard important, à moins qu'un inhibiteur de l'internalisation par voie clathrine dépendante ne soit ajouté au milieu. D'autres expériences suggèrent que l'internalisation de nanoparticules perturbe l'assemblage des microtubules, dérégulant les propriétés de contractilité et mobilité des cellules.⁴¹⁷ Ces résultats peuvent expliquer pourquoi l'internalisation de MPNH peut retarder significativement la migration des ECFC. Etant donné que l'internalisation varie pour les différents MPNH, cela peut provoquer des variations sur la capacité des cellules à migrer.

ii. Capacité à former des ébauches vasculaires

Evaluer la capacité des ECFC à former des structures vasculaires est un des moyens les plus spécifiques pour évaluer leur capacité à stimuler l'angiogenèse.⁴¹⁸ Ce test peut s'effectuer *in vitro* avec tout type de cellule endothéliale déposé sur des constituants appropriés mimant la matrice extracellulaire. Le Matrigel, un mélange de protéines obtenu à partir de sarcome murin (Engelbreth-Holm-Swarm), principalement composé de laminine,⁴¹⁹ stimule l'organisation de cellules endothéliales en réseaux évoquant la microvascularisation. Ainsi ce produit mime l'environnement extracellulaire de nombreux tissus vivants et permet d'observer le processus par lequel les cellules endothéliales s'organisent pour créer de nouveaux vaisseaux *in vivo*. Ces expériences ont été réalisées avec des cellules marquées dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes (MPNH-COOH, 6 h, 73,5 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, soit 0,25 mg.mL^{-1}) et les puits ont été observés 16 h après dépôt des cellules sur le Matrigel (Figure 5.21).

⁴¹⁷ C. Y. Tay et al. Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration. *Nano Lett.* 2014, 14, 83.

⁴¹⁸ R. Auerbach et al. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 2003, 49 (1), 32.

⁴¹⁹ H. K. Kleinman & G. R. Martin. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer. Biol.* 2005, 15, 378.

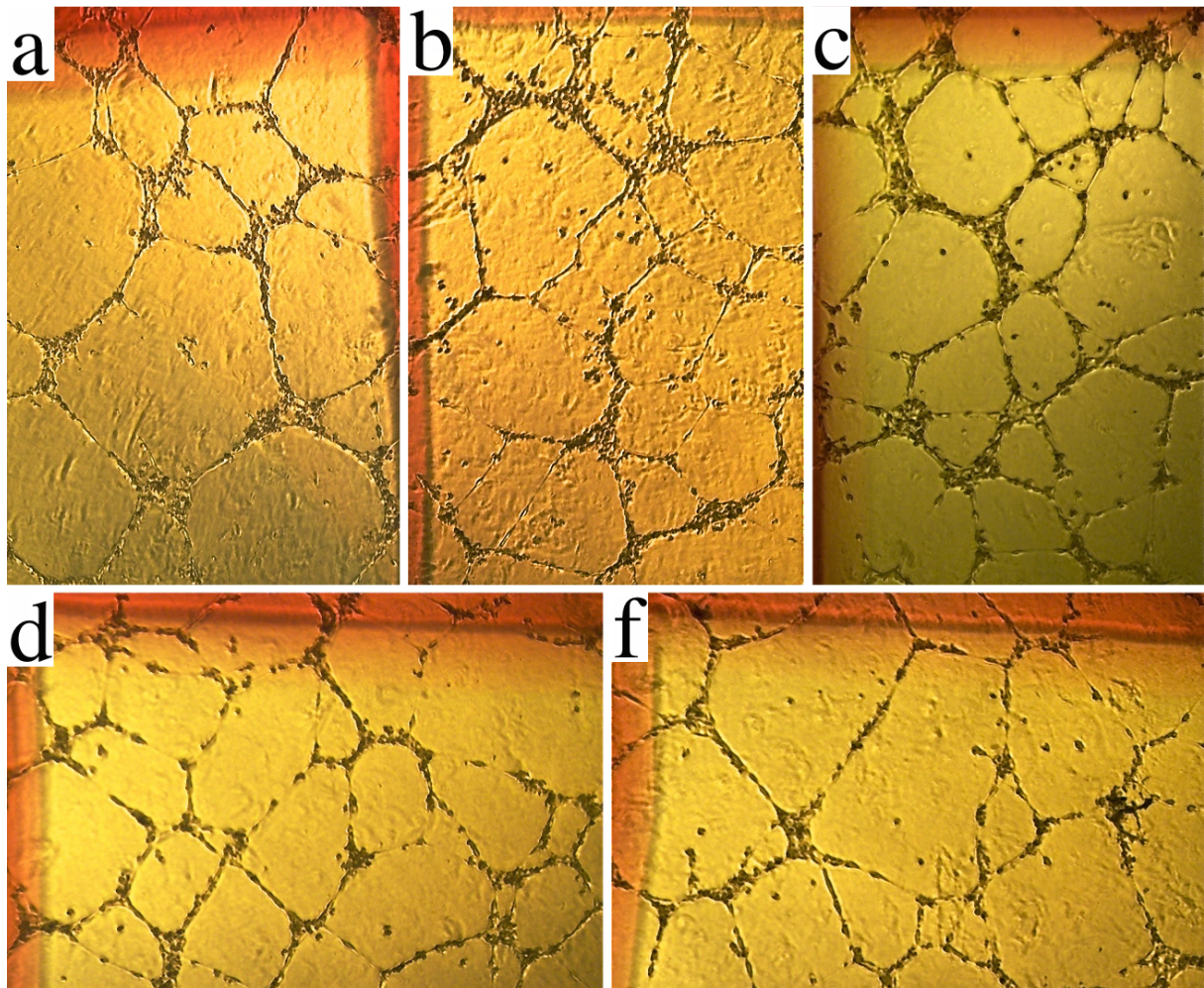
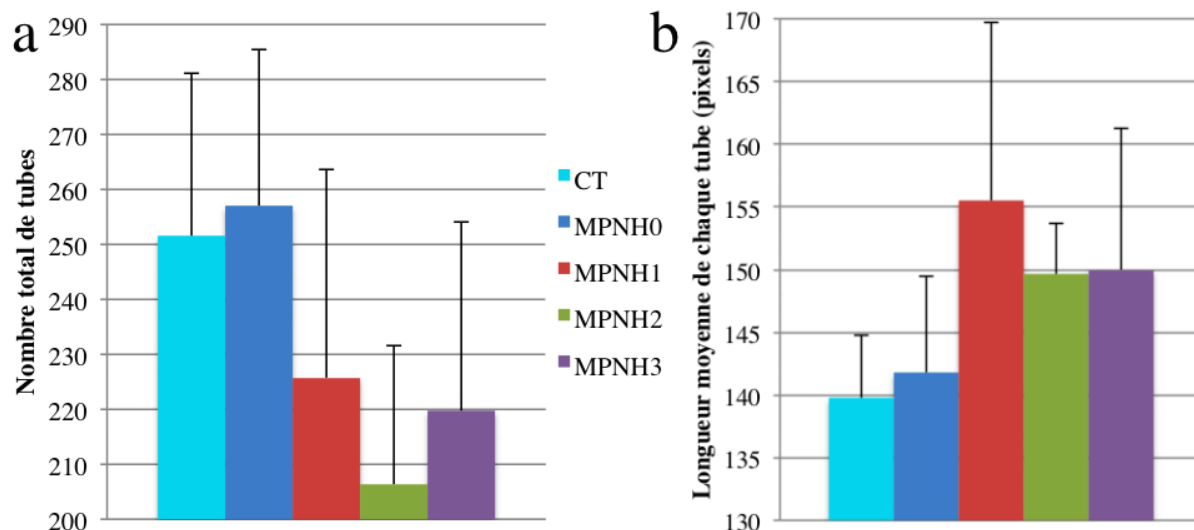


Figure 5.21. Formation d'ébauches vasculaires 16 h après dépôt d'ECFC non marquées (a) ou marquées avec des MPNH_{0,1,2,3}-COOH (b-f, respectivement) sur du Matrigel.

Une fois les cellules organisées en réseau sur le Matrigel, il faut quantifier les propriétés de ces réseaux. Les principales propriétés comparées sont le nombre total de tubes formés (Graphique 5.34.a) et leurs longueurs moyennes (Graphique 5.34.b). Il est aussi possible de caractériser plus précisément ces ébauches vasculaires en évaluant la longueur totale du réseau (Annexe II, Graphique 8.6), la surface moyenne occupée par les cellules (Annexe II, Graphique 8.7), le nombre de boucles formées (Annexe II, Graphique 8.8), leurs périmètres et leur aires moyens (Annexe II, Graphiques 8.9 et 8.10). La qualité du réseau formé est ainsi rigoureusement décrite et comparée à celle d'un réseau témoin.



Graphique 5.34. Caractérisation d'ébauches vasculaires formées par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH et déposées sur du matrigel. a) Quantification du nombre total de tubes et b) longueur moyenne des tubes formés.

Il n'y a pas de différences significatives entre les réseaux formés par les ECFC marquées et les témoins, quelle que soit la propriété considérée. Cependant, on constate une évolution progressive pour chaque caractéristique qui suggère une influence plus importante du marquage avec les MPNH₂ et MPNH₃ qu'avec les MPNH₁ et les MPNH₀. Il aurait été intéressant de réaliser un suivi de la formation de ces ébauches vasculaires au cours du temps, afin de constater un éventuel effet du marquage sur les cinétiques de formation de ces ébauches.

Des résultats variés sont rapportés dans la littérature scientifique. L'équipe de Claire Wilhelm et Florence Gazeau a montré que des ECFC ayant incubé 2 h avec environ 0,4 mg.mL⁻¹ d'IONP avaient des propriétés normales de formation d'ébauches vasculaires.³²² Cependant, après une durée d'incubation de 10 à 18 h sur Matrigel, une légère modification du réseau vasculaire formé était observée. Les tubes semblent plus fins pour les cellules marquées que pour les témoins. Des observations similaires sont présentées dans une publication utilisant aussi des ECFC mais d'autres types d'IONP.⁴²⁰ Une autre publication montre un effet bien plus important, malgré l'utilisation d'IONP à des concentrations plus faibles (1 h d'incubation à 0,016 ou 0,16 mg.mL⁻¹).⁴²¹ Les cellules utilisées sont des cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) et les IONP sont utilisées recouvertes de citrate ou de dextran contrairement aux IONP nues utilisées pour marquer les ECFC dans la publication précédemment citée. Dans le cas des HUVEC, le marquage cellulaire empêche totalement la formation d'ébauches vasculaires, une cytotoxicité importante est observée après quelques heures d'incubation et la structure du cytosquelette est significativement altérée.

Il est difficile de comparer les résultats présentés ci-dessus à ceux de la littérature car les cellules utilisées ne sont pas toujours les mêmes bien qu'il s'agisse de cellules endothéliales, les concentrations en nanoparticules sont données en mg.mL⁻¹, voire en mol.L⁻¹ de fer. De plus, les travaux cités n'utilisent pas de nanoparticules similaires aux

⁴²⁰ E. S. M. Lee et al. The use of microgel iron oxide nanoparticles in studies of magnetic resonance relaxation and endothelial progenitor cell labelling. *Biomaterials*. 2010, 31, 3296.

⁴²¹ X. Wu et al. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int. J. Nanomed.* 2010, 5, 385.

notres. Mais il semble qu'un retard ou une altération de la formation d'ébauches vasculaires par les cellules marquées puissent être dû à une interaction entre les nanoparticules internalisées et les microtubules, comme cela est supposé pour leur capacité de migration.⁴¹⁷

4) Vectorisation magnétique *in vivo*

Toutes les expériences précédentes permettent de considérer que les ECFC marquées avec des MPNH-COOH dans les conditions citées gardent une bonne viabilité et conservent leurs capacités de migration et à former un réseau vasculaire. Nous avons donc réalisé une expérience afin de déterminer s'il était possible de suivre en temps réel la distribution d'ECFC marquées avec des MPNH et l'influence de la présence d'un champ magnétique sur cette distribution après administration des cellules *in vivo*. Les résultats de magnétophorèse, de toxicité et de luminescence nous ont poussé à utiliser les MPNH₂-COOH pour cela.

Pour cette expérience, nous avons utilisé des ECFC marquées avec des MPNH₀-COOH ou des MPNH₂-COOH dans des conditions identiques à celles utilisées pour les tests cellulaires (6 h, 73,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit 0,25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Des injections de $5\cdot 10^5$ ECFC ont été réalisées dans la cavité péritonéale de souris après avoir été illuminées par une DEL orange pendant 5 min. Une image de luminescence a été réalisée avant et après apposition d'un aimant sur le flanc droit de la souris (Figure 5.20). Les ECFC marquées avec les MPNH₀-COOH représentent le témoin car les MPNH₀ ne contiennent pas d'USPIO et ne réagissent donc pas à la présence d'un champ magnétique (Figure 5.23 et Graphique 35). Pour évaluer l'influence de la présence de l'aimant sur la distribution des ECFC après injection intrapéritonéale, j'ai suivi la luminescence de cinq points situés sur un segment suivant une coupe transverse (points bleus et ligne rouge, Figure 5.22).

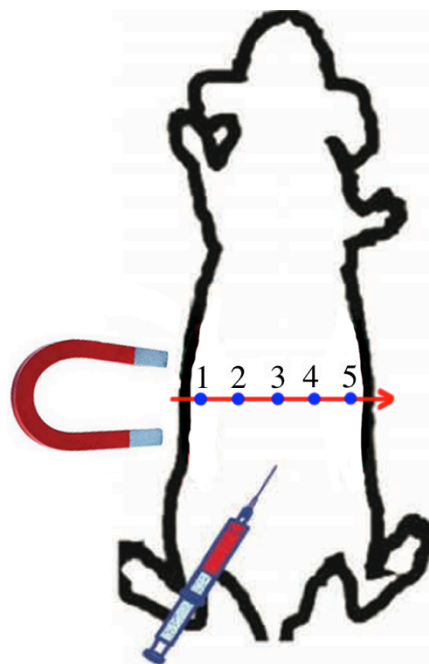


Figure 5.22. Schéma de l'expérience de vectorisation magnétique cellulaire *in vivo*. La ligne rouge porte cinq points bleus pour lesquels la luminescence est enregistrée. L'évolution au cours du temps de la luminescence sera tracée en fonction de leur distance à l'aimant.

Pour les $MPNH_0-COOH$, on peut constater que la distribution de la luminescence dans les souris change peu (Figure 5.23), et que le profil de luminescence tracé comme indiqué ci-dessus évolue très peu après apposition de l'aimant contre le flanc droit de la souris (Graphique 5.35).

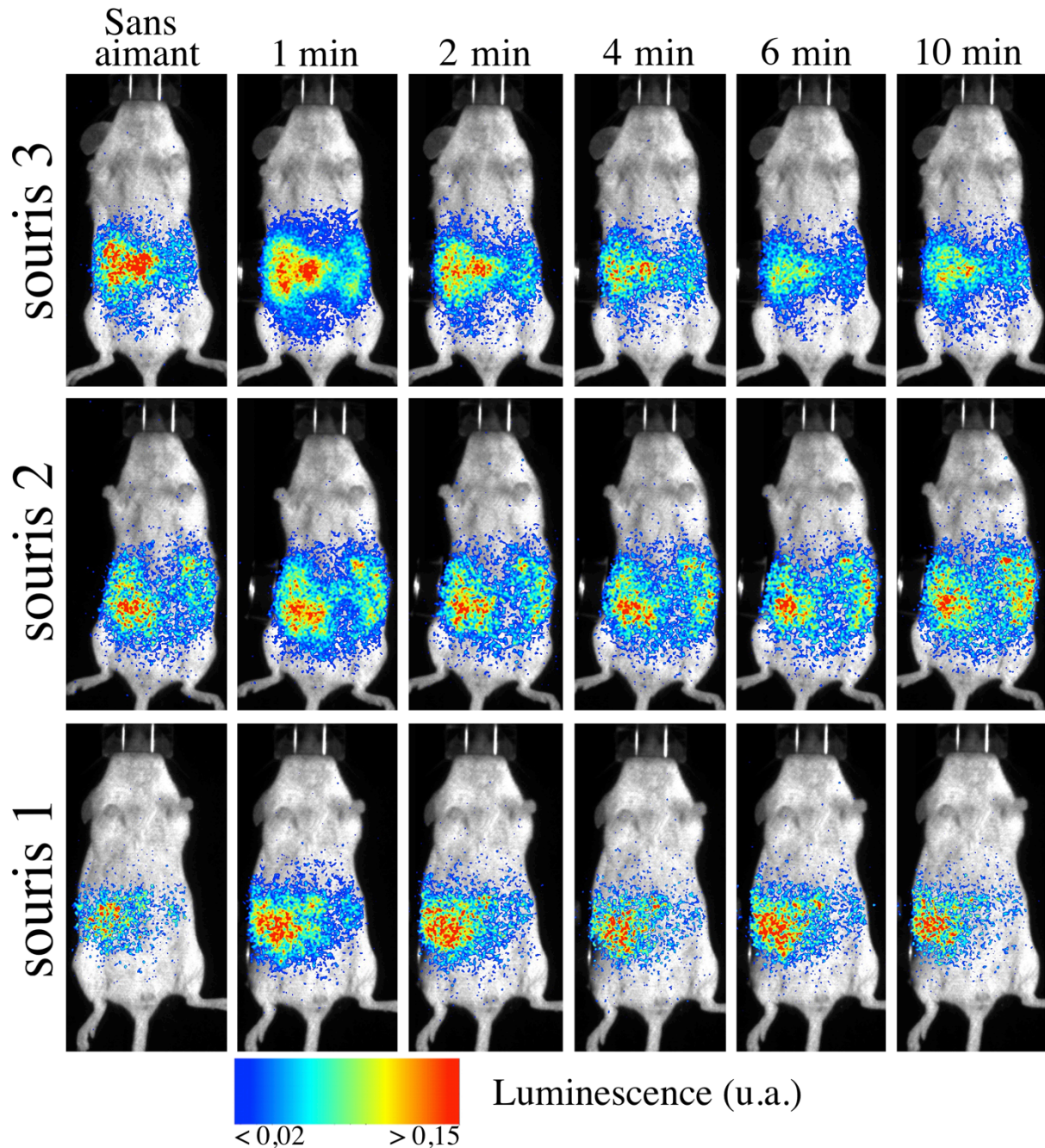
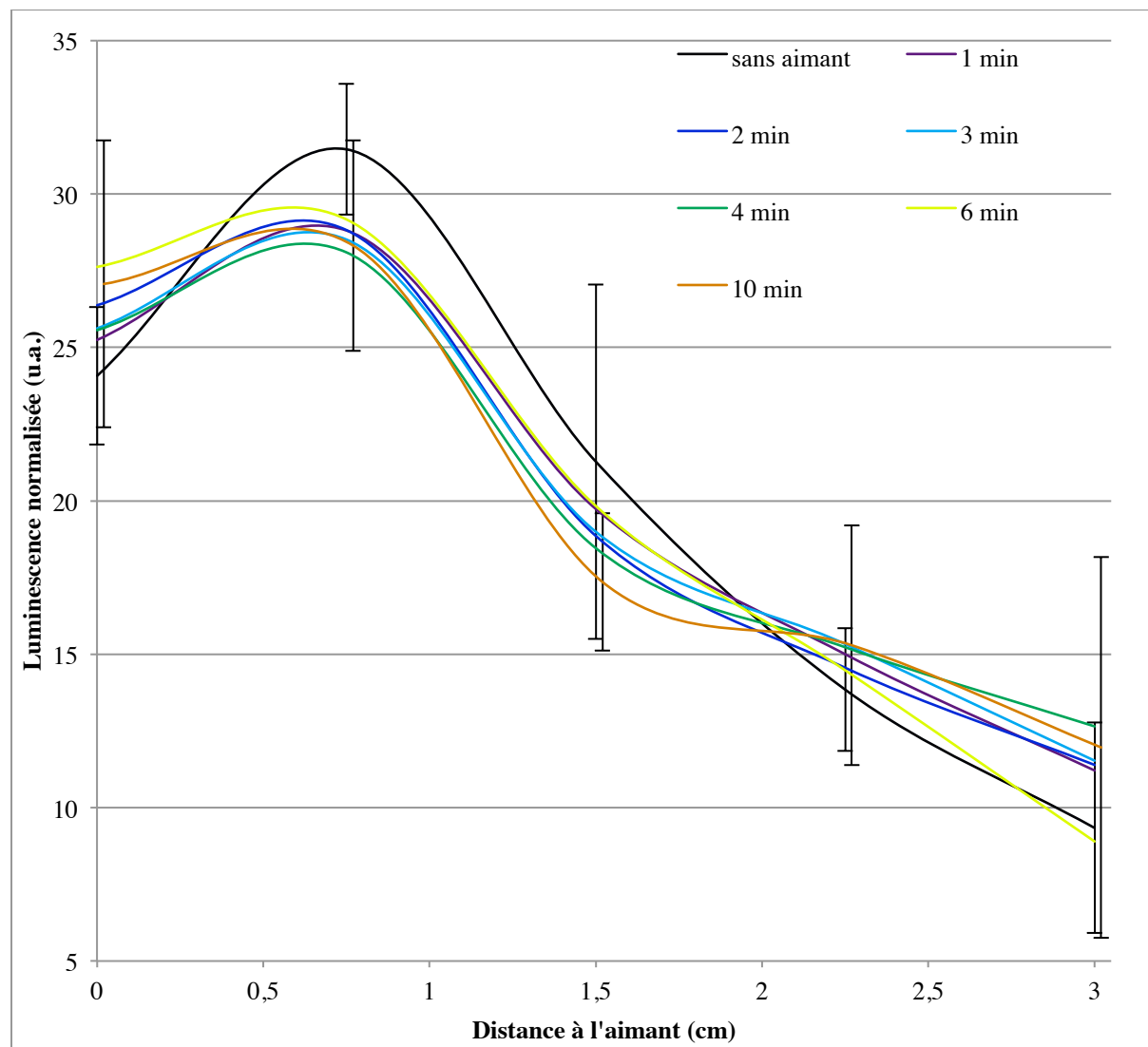


Figure 5.23. Images de luminescence persistante de souris ayant reçu une injection intrapéritonéale de $5 \cdot 10^5$ ECFC marquées avec des $MPNH_0-COOH$.

Après injection, on voit que la distribution des ECFC marquées n'est pas homogène dans les souris (images "sans aimant", Figure 5.23). Cela est dû au fait que l'injection a été réalisée légèrement dans la partie droite de l'abdomen des souris.

De plus, les images montrent que la distribution de la luminescence dans l'abdomen des souris n'évolue pas au cours du temps (Figure 5.23). Afin d'évaluer plus rigoureusement ce phénomène, des profils de luminescence sont tracés à partir des cinq

points pour lesquels la luminescence est enregistrée. Les points 1 à 5 (Figure 5.22) ont des abscisses respectives de 0, 0,75, 1,5, 2,25 et 3 cm. Ces abscisses correspondent à leur distance à l'aimant. Le résultat est donné dans le Graphique 5.35 ci-dessous.



Graphique 5.35. Evolution temporelle moyenne du profil de luminescence le long d'une ligne tracée entre le flanc droit et le flanc gauche de la souris dans le prolongement de l'aimant. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de $5 \cdot 10^5$ ECFC marquées avec des $MPNH_0-COOH$ ($n = 3$). Les barres d'erreurs sont tracées pour la courbe "sans aimant" et la courbe "10 min".

Non seulement la distribution des cellules change peu en présence de l'aimant, mais elle n'évolue pas non plus naturellement au cours du temps au sein de la souris après l'injection. Cette condition peut donc servir de témoin pour l'expérience réalisée avec des ECFC marquées par des $MPNH_2-COOH$.

Contrairement à l'expérience précédente, la distribution de la luminescence dans les souris (Figure 5.24) et le profil de luminescence observé après injection des ECFC marquées avec des $MPNH_2-COOH$ évoluent significativement au cours du temps (Graphique 5.36).

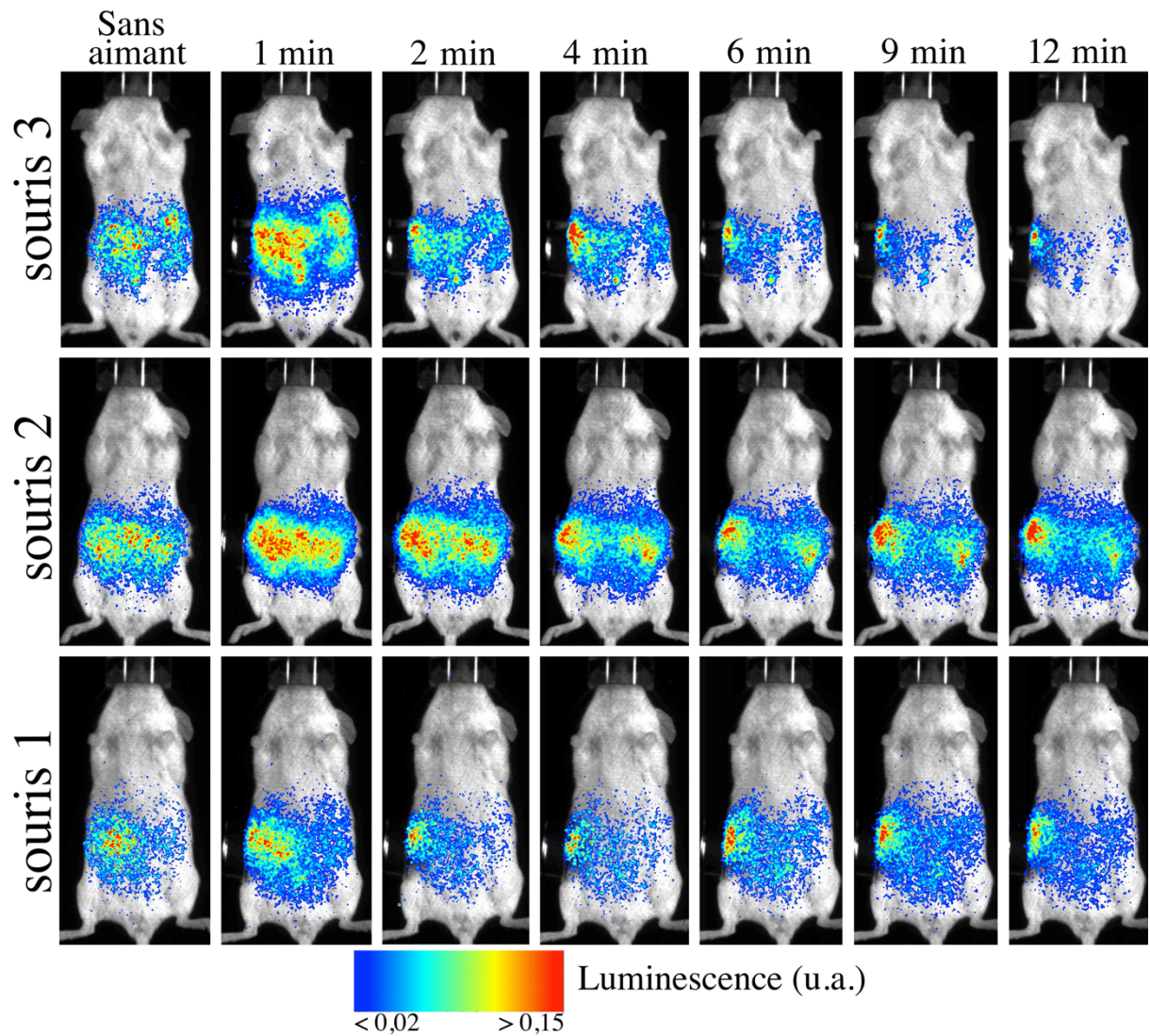
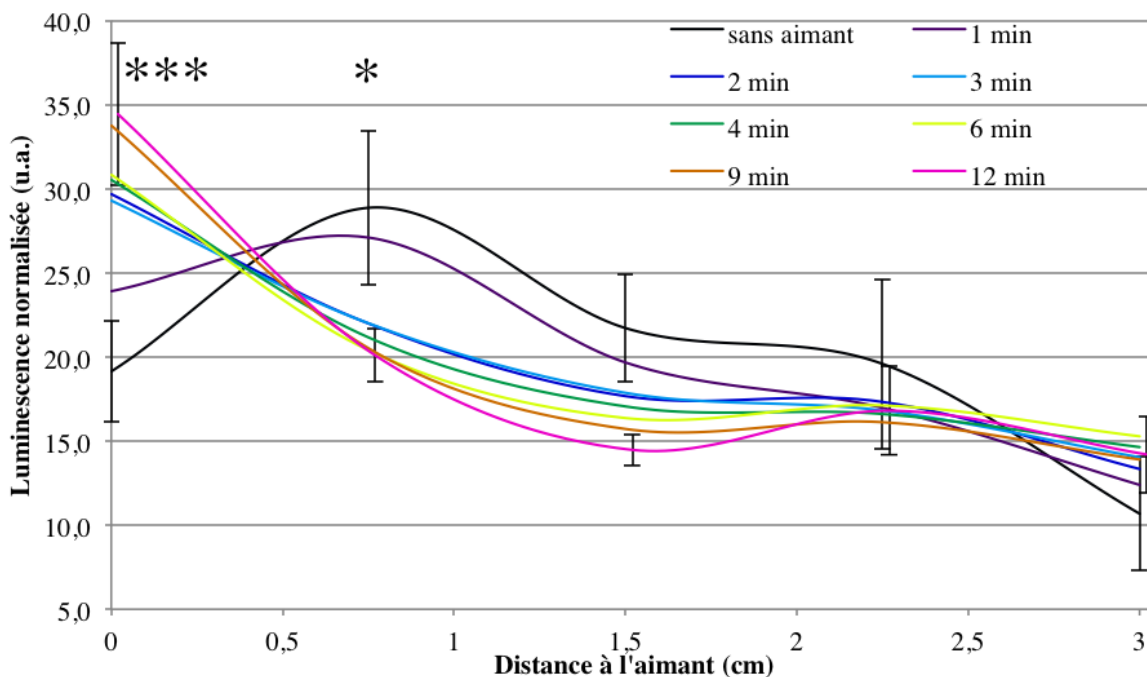


Figure 5.24. Images de luminescence persistante de souris ayant reçu une injection intrapéritonéale de $5 \cdot 10^5$ ECFC marquées avec des MPNH₂-COOH.

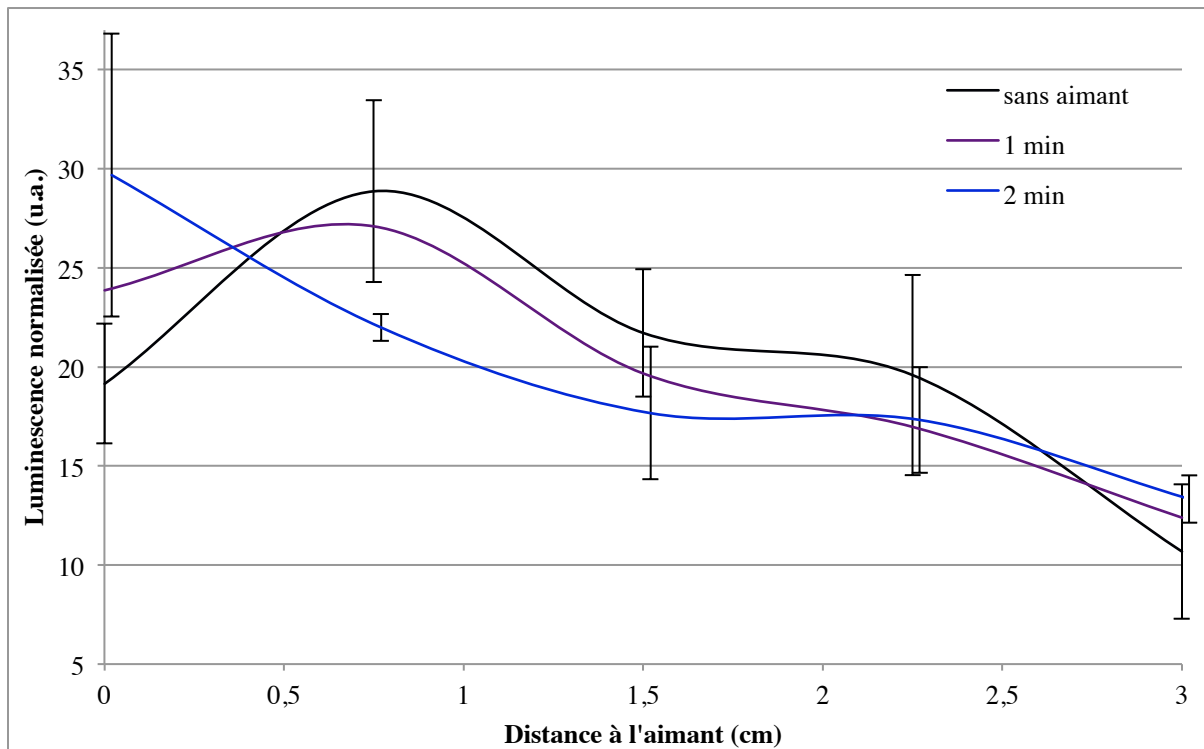
On observe un déplacement de la luminescence située dans la partie droite de l'abdomen vers le flanc droit de la souris au cours du temps, celui contre lequel est placé l'aimant. De plus, on constate que la luminescence provenant de la moitié gauche des souris ne semble pas évoluer spatialement au cours du temps, contrairement à celle de la moitié droite de ces souris. L'évolution des profils de luminescence est présentée dans le Graphique 5.36, ci-dessous.



Graphique 5.36. Evolution temporelle moyenne du profil de luminescence le long d'une ligne tracée entre le flanc droit et le flanc gauche de la souris dans le prolongement de l'aimant. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 5.10^5 ECFC marquées avec des $MPNH_2-COOH$ ($n = 3$). Les barres d'erreur sont indiquées pour la courbe "sans aimant" et la courbe "12 min". L'analyse statistique a été réalisée en comparant la luminescence avant apposition de l'aimant à celle enregistrée après 12 min à l'aide d'un test Anova suivi par une comparaison de Bonferroni. * et *** correspondent à $p < 0,05$ et $p < 0,001$, respectivement.

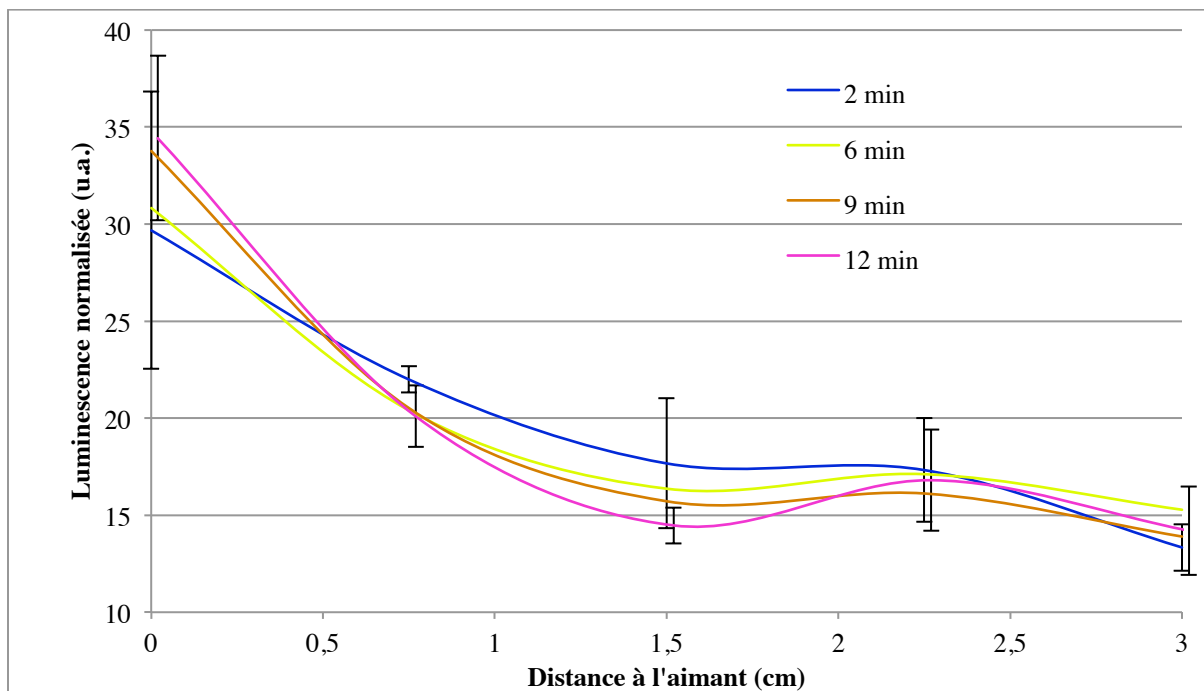
Le signal de luminescence persistante augmente de manière significative dans la zone la plus proche de l'aimant (abscisses inférieures à 1 cm). De plus, deux remarques peuvent être faites à propos de ces profils. Tout d'abord, ce graphique confirme ce qui est observé sur les images de luminescence : celle-ci n'évolue presque pas à une distance supérieure à 2 cm de l'aimant. Cela permet de déterminer une distance efficace d'action de l'aimant. Il serait intéressant de changer l'aimant et ainsi faire varier le champ magnétique utilisé pour voir s'il est possible de modifier cette distance efficace. D'autre part, on peut remarquer que l'évolution de ces profils en deux phases : une première phase de transition rapide (Graphique 5.37) suivie d'une stabilisation (Graphique 5.38).

Après apposition de l'aimant contre le flanc droit des souris pendant les deux premières minutes, on observe une augmentation rapide de la luminescence à proximité de l'aimant tandis que la luminescence d'une zone située entre 0,75 et 1 cm de l'aimant diminue (Graphique 5.37).



Graphique 5.37. Evolution du profil de luminescence le long d'une ligne tracée entre le flanc droit et le flanc gauche de la souris dans le prolongement de l'aimant. Les souris ont reçu 5.10^5 ECFC marquées avec des $MPNH_2-COOH$ ($n = 3$) pendant les deux premières minutes d'apposition de l'aimant. Les barres d'erreur sont indiquées pour les courbes "sans aimant" et "2 min".

Le profil de luminescence évolue ensuite de plus en plus lentement pendant une dizaine de minutes, mais la tendance d'augmentation de luminescence à proximité de l'aimant se confirme (Graphique 5.38).



Graphique 5.38. Evolution lente des profils de luminescence le long d'une ligne tracée entre le flanc droit et le flanc gauche de la souris dans le prolongement de l'aimant. Les souris ont reçu 5.10^5 ECFC marquées avec des $MPNH_2-COOH$ ($n = 3$) 2 à 12 min après apposition de l'aimant. Les barres d'erreur sont indiquées pour les courbes "2 min" et "12 min".

Après 6 minutes d'apposition de l'aimant sur le flanc des souris on voit apparaître un creux dans le profil de luminescence tracé autour de la distance de 1,5 cm de l'aimant, ce qui correspond à peu près à la moitié de la souris. Etant donné qu'à partir de cette distance à l'aimant l'évolution de luminescence n'est pas significative, on peut considérer que l'aimant utilisé permet de modifier la distribution des cellules dans la moitié droite de la souris, sur une distance d'environ 1,5 cm.

Ces expériences de vectorisation cellulaire magnétique *in vivo* montrent qu'il est possible d'attirer des cellules injectées dans la cavité péritonéale et de les suivre en luminescence pendant plus de 10 minutes. Les conditions utilisées (champ magnétique de l'aimant, conditions de marquage, choix du MPNH) permettent en même temps de définir leur champ d'efficacité : il existe une distance efficace d'attraction des cellules, et une durée pendant laquelle leur biodistribution se modifie en réponse à la présence de l'aimant. En effet, il semble qu'après quelques minutes, cette biodistribution n'évolue presque plus. Il est probable que les cellules se fixent dans la cavité, certainement par adhérence au péritoine. Dans un second temps, la biodistribution des cellules injectées pourrait peut-être évoluer par exemple par dissémination hématogène. Cette expérience nécessite d'être répétée afin de démontrer la possibilité d'attirer les cellules du côté gauche des souris, de tenter de suivre les ECFC marquées à plus long-terme en réilluminant la souris ultérieurement, ou encore de faire des images IRM afin de visualiser la zone d'accumulation des cellules.

Nous avons comparé notre système à ceux de la littérature. Ainsi, des tentatives de rétention de cellules marquées à la base de la queue après injection intraveineuse n'ont pas permis d'observer une accumulation, contrairement à ce qui était présenté Figure 3.56.³²⁵ Il est probable que le champ magnétique de l'aimant utilisé ne soit pas assez intense ou que la quantité d'USPIO présente dans les cellules ne suffise pas à ralentir puis arrêter des cellules entraînées dans la circulation sanguine. En revanche, l'expérience que nous avons réalisée et dont les résultats sont détaillés ci-dessus est similaire à la seconde publication citée en introduction.³²⁶ Dans cette publication, 10^6 CSM marquées avec des UCNP recouverts d'IONP sont injectées dans la cavité péritonéale, tandis qu'un aimant est placé sur le flanc droit de la souris. L'image de luminescence est réalisée 6 h après injection intrapéritonéale et apposition de l'aimant, tandis qu'aucune information n'est donnée sur l'évolution de la biodistribution des cellules pendant la dizaine de minutes qui suit l'injection. Dans notre expérience, nous utilisons une quantité deux fois plus faible de cellules et nous observons une accumulation des cellules à proximité de l'aimant seulement quelques minutes après injection, ce qui est indice que nos conditions de marquage cellulaire sont efficace pour réaliser de la vectorisation magnétique.

5) Conclusion

Les nanoparticules à luminescence persistante développées et synthétisées au laboratoire ont été intégrées à des nanohybrides multimodaux afin de marquer des cellules ayant un intérêt thérapeutique. Il est ainsi possible de suivre ces cellules en luminescence persistante en s'affranchissant du signal d'autofluorescence, en IRM et de les attirer avec un aimant *in vivo*. Bien que des tests de viabilité cellulaire basés sur le

MTT suggèrent une toxicité importante à la concentration utilisée pour marquer les cellules utilisées, d'autres tests de viabilité ainsi que des tests de caractérisation des propriétés de ces cellules ne semblent pas montrer d'impact important du marquage sur les ECFC. Ces résultats ouvrent des perspectives d'utilisation de nanoparticules multimodales ou de cellules marquées dans un but thérapeutique et encouragent à continuer les recherches de nouvelles applications en thérapies ciblées et cellulaires ainsi qu'une meilleure compréhension de leur devenir *in vivo*.

6) Limites et perspectives de la vectorisation cellulaire avec les MPNH

Les limites rencontrées par un suivi cellulaire faisant suite à un marquage à l'aide de nanoparticules sont nombreuses et la technique développée ici ne permet malheureusement pas de toutes les éviter. Tout d'abord, les divisions cellulaires entraînent une dilution des nanoparticules, et donc une diminution de l'évolution du contraste et du signal de luminescence dus à la concentration spatiale initiale. Cela peut être une limite si l'on souhaite suivre des cellules marquées à long terme. En revanche, le phénomène de diminution du signal peut être limité si l'application d'un aimant à proximité du site où l'on veut retrouver les cellules permet effectivement de les y retenir. Cette solution permet a priori de limiter les effets similaires de migration des cellules. La quantité de cellules accumulées à l'endroit désiré peut difficilement être évaluée par IRM, donc dans des cas de marquage n'utilisant que des USPIO.⁴²² Ici, la luminescence peut donner une information sur la quantité de cellules effectivement retenues au site désiré. Cependant, elle ne donne pas d'information sur la viabilité cellulaire. Le signal observé pourrait finalement correspondre à des nanoparticules situées dans les ganglions lymphatiques.

La toxicité entraînée par la localisation de MPNH dans la cavité péritonéale doit aussi être étudiée. Une toxicité due à des injections intrapéritonéales répétées de nanosphères de silice de 100 nm a été observée chez des souris.⁴²³ Après injection intrapéritonéale, la majorité des nanoparticules est retrouvée dans le foie et la rate : les quantités injectées montrent une légère toxicité hépatique à partir de 12 injections de 0,5 mg en 6 semaines. Dans notre cas, la dose utilisée lors de l'injection intrapéritonéale est environ de 0,05 mg ($5 \cdot 10^5$ ECFC marquées avec environ 100 pg de MPNH). Bien que cela soit inférieur aux doses toxiques rapportées dans cette publication, il est nécessaire de vérifier les effets à long terme de l'injection des MPNH par voie intrapéritonéale avant d'émettre une conclusion sur leur toxicité. Enfin, la dégradation des particules est un processus délicat pouvant avoir diverses conséquences néfastes.⁴²⁴ Ces problèmes seront abordés dans la Partie VI de ce manuscrit.

Le marquage de cellules d'intérêt avec des nanoparticules bimodales peut être envisagé pour réaliser de la reconstruction de tissus *in vitro* tout en ayant une modalité permettant d'évaluer le phénomène en temps réel,^{425,426} ou encore réaliser du ciblage de

⁴²² J. W. Bulte. Hot spot MRI emerges from the background. Nat. Biotechnol. 2005, 23 (8), 945.

⁴²³ T. Liu et al. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. Biomaterials. 2012, 33, 2399.

⁴²⁴ P. Borm et al. Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. Toxicol. Sci. 2006, 90 (1), 23.

⁴²⁵ G. Frasca et al. Formation of a three-dimensional multicellular assembly using magnetic patterning. Langmuir. 2009, 25, 2348.

tumeurs ou métastases à l'intérieur du péritoine avec des cellules immunitaires actives contre les cellules tumorales. En effet, de plus en plus d'essais cliniques se basent sur l'utilisation de cellules en oncologie. Dans la plupart des cas, les cellules utilisées sont des cellules immunitaires (lymphocytes T) modifiées génétiquement ou exposées à des antigènes tumoraux afin d'éradiquer des cellules cancéreuses *in vivo*.⁴²⁷ Mais des travaux rapportent les effets bénéfiques de cellules souches mésenchymateuses sur la croissance et la néoangiogénèse tumorale.⁴²⁸ Dans des cas de cancers du péritoine ou de carcinomes péritonéaux, il est imaginable qu'un marquage de ces cellules avec des nanoparticules permettant de les attirer vers les cellules cancéreuses ainsi que de les suivre en temps réel permette d'augmenter leur effet thérapeutique.

7) Section expérimentale

a) Synthèse des ZGO-OH et des MPNH

Voir Partie IV, p. 134 et 135.

b) Fonctionnalisation des ZGO-OH et MPNH-OH

Les ZGO-NH₂ recouvertes de fonctions amino sont obtenues en faisant réagir 10 mg de ZGO-OH avec 40 µL de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) dans 4 mL de DMF, pendant 5 h sous agitation et à température ambiante. L'APTES en excès est éliminé par trois étapes de centrifugation et redispersion dans le DMF.

Les ZGO fonctionnalisées avec de la fluorescéine sont obtenues soit en réalisant la même synthèse que celle citée ci-dessus et en ajoutant 66,5 mg de FITC, soit en faisant réagir 10 mg de ZGO-NH₂ avec 3,9 mg de FITC dans 4 mL de DMF sous agitation pendant 1 h à température ambiante. Le FITC n'ayant pas réagi est éliminé par lavages dans le DMF.

Les MPNH recouverts de fonctions amino (notées MPNH_{0,1,2,3}-NH₂) sont obtenus en faisant réagir 10 mg de MPNH-OH avec 40 µL de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) dans 4 mL de DMF, pendant 5 h sous agitation et à température ambiante. L'APTES en excès est éliminé par trois étapes de centrifugation et redispersion dans le DMF.

Les MPNH recouverts de fonctions carboxylates (MPNH_{0,1,2,3}-COOH) sont obtenus en faisant réagir 10 mg de MPNH_{0,1,2,3}-NH₂ avec 5 mg d'anhydride diglycolique (DGA) dans 4 mL de DMF sous agitation pendant 12 h à température ambiante. Le DGA n'ayant pas réagi est éliminé par lavages dans le DMF.

c) Tests de toxicité

Pour tous les tests de toxicité, chaque condition est réalisée en tripliquée. Les lignées cellulaires ayant servi aux tests de cytotoxicité sont soit des macrophages murins RAW 264.7, cultivés dans du DMEM complétement avec du sérum de veau foetal (10% en volume) et 1% de pénicilline/streptomycine, soit des ECFC issu de sang de cordon

⁴²⁶ D. Fayol et al. Design of biomimetic vascular grafts with magnetic endothelial patterning. *Cell Transplant.* 2013, 22, 2105.

⁴²⁷ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01416038> ; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02159716> ; <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01567891>.

⁴²⁸ M. Kéramidas et al. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumor growth and tumor angiogenesis. *Stem. Cell. Res. Ther.* 2013, 4, 41.

ombilical, cultivées dans de l'EGM-2 complétement avec 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont déposées sur des plaques 96 puits (Falcon, Strasbourg, France) placées dans une atmosphère à 5% en CO₂ et à 37°C, dans le milieu adapté pendant une nuit avant le début du test.

i. Tests MTT

Après dépôt de 2.10⁴ cellules dans les puits, le milieu est remplacé par du milieu complet contenant des concentrations croissantes de nanoparticules et 6 ou 24 h plus tard celui-ci est enlevé et du milieu complet contenant 0,5 mg.mL⁻¹ de bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) est ajouté pendant 2 h à 37°C. Le milieu est de nouveau enlevé et les cristaux de formazan sont dissouts par ajout de DMSO. L'absorbance lue à 562 nm en utilisant un lecteur de plaque EL340 (BioTek Instruments, USA) ou Infinite F2000 Pro (TECAN Instruments, Suisse) permet de déterminer la viabilité cellulaire dans chacune des conditions.

Le même protocole est utilisé pour les cellules ECFC, sauf que de la gélatine est ajoutée au fond du puits avant dépôt des cellules, que celles-ci sont cultivées dans du milieu EGM-2, et que les plaques P96 sontensemencées avec 10⁴ ECFC par puits.

Lorsque l'on veut éviter le biais dû à l'absorbance des nanoparticules, l'étape suivante est ajoutée entre la redispersion du formazan par le DMSO et la lecture à 562 nm : après 15 mn les surnageants sont transférés dans une plaque propre pour éviter la perturbation du test par la présence de nanoparticules au fond des puits.

L'expérience permettant d'évaluer le biais dû à l'absorbance des nanoparticules a été réalisée exactement selon le même protocole qu'un test MTT mais sans déposer de cellule dans les puits.

ii. Tests WST-8

Les protocoles de ces tests sont les mêmes que pour le MTT, sauf que le MTT est remplacé par du 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (WST-8). Enfin, la lecture peut être réalisée par absorbance sans avoir à retourner une dernière fois les plaques pour rajouter du DMSO. L'absorbance lue à 475 nm en utilisant un lecteur de plaque EL340 (BioTek Instruments, USA) ou Infinite F2000 Pro (TECAN Instruments, Suisse) a permis de déterminer la viabilité cellulaire dans chacune des conditions.

Lorsque l'on veut éviter le biais dû à l'absorbance des nanoparticules, la moitié des surnageants est transférée dans une plaque propre pour éviter la perturbation du test par la présence de nanoparticules au fond des puits.

L'expérience permettant d'évaluer le biais dû à l'interaction entre les nanoparticules et le réactif a été réalisée exactement selon le même protocole qu'un test MTT mais sans déposer de cellules dans les puits.

iii. Tests de cytométrie en flux

Ces tests sont réalisés en déposant 2.10⁴ cellules (RAW ou ECFC) par puits dans des plaques 96 puits. Après une nuit, les milieux de culture sont remplacés par du milieu contenant des quantités croissantes de nanoparticules. Après une incubation de 6 h, le milieu est à nouveau éliminé. Les puits sont rincés trois fois avec 300 µL de PBS sans K⁺, Ca²⁺ ni Mg²⁺ et 200 µL de trypsine EDTA sont déposés. Une fois décollées, les cellules sont mélangées à 500 µL de DMEM complétement, 200 µL de milieu sont utilisés pour rincer les puits et les cellules sont centrifugées 5 min à 240 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans 150 µL de HBSS contenant du Ca²⁺ et Mg²⁺. 150

μL de réactif Viacount sont ajoutés et trois mesures de viabilité cellulaires comprenant au moins 5.10^3 évènements sont réalisées à l'aide d'un appareil GuavaEsayCyte6-2L (Merck Millipore) en agitant la suspension cellulaire entre chaque mesure.

iv. Tests Alamar Blue

Les protocoles de ces tests sont les mêmes que pour le WST-8, sauf que le WST-8 est remplacé par de l'Alamar Blue (Invitrogen) et que 10^4 ECFC sont initialement déposées dans les puits. Enfin, la lecture de la viabilité cellulaire peut être réalisée directement dans les puits en mesurant la fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{ém}} = 590 \text{ nm}$) à l'aide d'un TECAN Infinite F200 Pro.

L'expérience ayant permis de déterminer la gamme de linéarité de l'AB avec les ECFC a été réalisée en déposant des quantités croissantes d'ECFC (de 4.10^3 à 2.10^4) dans des puits de plaques P96. Après une nuit, de l'AB est ajouté au milieu et des mesures de fluorescence sont réalisées toutes les heures pendant 5 h.

L'expérience permettant d'évaluer le biais dû à l'interaction entre les nanoparticules et le réactif a été réalisée en déposant des concentrations croissantes de nanoparticules ZGO-NH₂ dans des puits recouverts de gélatine et contenant du milieu de culture avec ou sans 10^4 ECFC. Un volume d'Alamar Blue représentant 10 % du volume final, a été déposé et la fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{ém}} = 590 \text{ nm}$) a été mesurée 6 h plus tard à l'aide d'un TECAN Infinite F200 Pro.

v. Test au bleu trypan

Ces tests sont réalisés en déposant 2.10^4 cellules (RAW ou ECFC) par puits dans des plaques 96 puits. Après une nuit, les milieux de culture sont remplacés par du milieu contenant des quantités croissantes de nanoparticules. Après une incubation de 6 h, le milieu est à nouveau éliminé. Les puits sont rincés trois fois avec 300 μL de PBS sans K⁺, Ca²⁺ ni Mg²⁺ et 100 μL de trypsine EDTA sont déposés. Une fois décollées, les cellules sont mélangées à 200 μL de DMEM complété et contenant 10 % de bleu trypan, 200 μL supplémentaire de milieu sont utilisés pour rincer les puits. La viabilité cellulaire est ensuite évaluée à l'aide d'un lecteur Countess II Automated Cell Counter (ThermoFischer).

vi. Tests de prolifération cellulaire

Des puits de plaques P96 sontensemencés avec 5.10^3 ECFC. Après une nuit, les milieux de culture sont remplacés par du milieu témoin ou du milieu contenant une quantité donnée de nanoparticules. Le nombre de cellules présent dans 3 puits est alors évalué comme suit :

- le surnageant est aspiré doucement à la pipette,
- 300 μL de DPBS sont ajoutés puis aspirés,
- 20 μL de trypsine sont déposés pendant 5 min à 37 °C,
- 40 μL de milieu contenant 10 % de bleu trypan sont ajoutés pour récupérer les cellules et 20 μL supplémentaire sont utilisés pour rincer les puits
- les cellules sont comptées sur une lame de Malassez.

Après une incubation de 6 h, les surnageants sont aspirés et 200 μL de milieu sans nanoparticule sont ajoutés. Le nombre de cellules présentes dans les puits témoins et dans les puits ayant reçu des nanoparticules est régulièrement évalué comme précisé ci-dessus.

vii. Scratch test

Pour une expérience d'invasion classique, 10 puits de P6 sontensemencés avec 3.10^5 ECFC et des MPNH-COOH de chaque type sont déposées dans deux puits à la concentration de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($73,5 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$) pendant 6 h. Les puits sont ensuite rincés avec du PBS et trois blessures sont réalisées dans chaque puits. Pour chaque type de MPNH, un puits est rempli avec de l'EBM2 contenant 10 % de sérum tandis que l'autre ne contient que 1 % de sérum. La largeur des blessures est mesurée lorsque les blessures des puits témoins ont disparu.

viii. Formation de pseudo-tubes sur Matrigel

La veille, le Matrigel est placé à 4°C pour une décongélation douce et les cones et les plaques de culture cellulaire sont placées au congélateur. Les aliquots de Matrigel sont placés dans la glace pendant leur manipulation. $150 \text{ }\mu\text{L}$ de Matrigel sont déposés dans les puits d'une P48 en mettant le cone bien au centre, il ne doit pas y avoir de bulle, et la polymérisation s'effectue en laissant la plaque à 37°C pendant une heure. 4.10^4 ECFC sont ensuite déposées sur le Matrigel dans chaque puits après avoir incubé 6 h avec les quatre types de MPNH-COOH. Chaque condition est répétée dans deux puits et 4 zones sont observées dans chaque puits après 16 h d'incubation. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel en ligne Wimasis, en utilisant le protocole WimTube (<http://www.wimasis.com/en/products/13/WimTube>).

d) Expériences d'internalisation cellulaire

i. Détection en microscopie confocale

10^5 cellules RAW sont déposées sur une lame en verre pendant la nuit. Les nanoparticules ZGO-NH₂ fonctionnalisées avec de la fluorescéine sont ensuite déposées pendant 6 h à la concentration de 1 mg.mL^{-1} . Les cellules lavées et fixées au paraformaldéhyde sont marquées avec du TOPRO-3 afin de visualiser le noyau. Les images ont été réalisées en utilisant un microscope confocal (Leica Microsystems) à l'aide d'un filtre FITC ($\lambda_{\text{exc}}=488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$) ou TOPRO-3 ($\lambda_{\text{exc}}=633 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=656 \text{ nm}$).

ii. Détection en microscopie électronique à transmission

Tout d'abord, 5 flasques de 75 cm^2 sontensemencés avec 3.10^6 ECFC. Le lendemain, des MPNH-COOH sont déposées afin de réaliser un marquage à $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($73,5 \text{ }\mu\text{g.cm}^{-2}$) pendant 6 h. Après marquage, les cellules sont rincées, décollées et fixées avec du glutaraldéhyde 5 % dans un tampon de cacodylate de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ avant d'être traitées avec 1 % de tétraoxyde d'osmium dans une solution aqueuse de cyanoferrate de potassium 1,5 %. Après lavage avec de l'eau distillée, les cellules sont progressivement déshydratées avec de l'éthanol puis fixées dans une résine Epon. De fines couches sont découpées avec une lame de diamant et les coupes colorées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle aqueuse 4 % sont observées à l'aide d'un microscope JEOL JEM-100S.

iii. Détection en luminescence

Après une incubation similaire à celle réalisée pour un test de toxicité, les puits sont rincés doucement trois fois avec du PBS si la mesure de luminescence est réalisée dans les puits. La plaque de culture est alors illuminée pendant 2 min avec une DEL orange et l'acquisition de luminescence est réalisée avec une caméra utilisant un dispositif à transfert de charge basé au GaAs (Optima, Biospace Lab). Les cellules peuvent aussi être

décollées, centrifugées à 240 g et redispersées dans 500 μL de milieu de culture (deux fois) avant d'être redispersées dans une solution d'agarose ayant une température de gélification basse. Les tubes sont ensuite placés dans la glace pour que l'agarose gélifie rapidement. La solution d'agarose utilisée est préparée en mélangeant 30 mg d'agarose (BMA Products, USA) dans 10 mL d'eau mQ. L'agarose est ensuite dissout à l'aide d'un four à micro-ondes, puis la solution est laissée une heure à 50°C afin d'enlever les bulles. Enfin, sa température est descendue à 38°C avant redispersion des cellules. Le volume utilisé pour fixer les cellules est calculé afin que leur concentration dans l'agarose soit de $1,5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Les tubes contenant le gel avec les cellules sont illuminés et observés comme expliqué ci-dessus.

iv. Quantification en magnétophorèse

$8 \cdot 10^4$ ECFCensemencées dans des P12 ont été incubées pendant 6 h avec $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($73,5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$). Les puits sont rincés deux fois avec du PBS sans K^+ , Ca^{2+} ni Mg^{2+} et les cellules sont décollées à l'aide de trypsine-EDTA. Après ajout d'EGM-2 et rinçage des puits, les mobilités magnétophorétiques des cellules individuelles sont évaluées dans un champ magnétique de 145 mT et dans un gradient de champ de $17 \text{ T} \cdot \text{m}^{-1}$ créé par un aimant permanent (NdFeB, Calamit). La masse de fer présente dans chaque cellule est déduite d'un calcul prenant en considération l'équilibre entre les forces visqueuses et magnétiques en jeu pour un objet magnétique dans un gradient de champ. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées par test ANOVA avec un ajustement de Bonferroni.

e) Tests *in vivo*

i. Injection ECFC sur nude

Environ $8 \cdot 10^5$ ECFC sont incubées 18 h avec $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ZGO-NH₂. Les puits sont rincés et les cellules décollées. Des quantités croissantes sont injectées en sous-cutané ou en intramusculaire dans un volume inférieur à 40 μL . Les souris sont ensuite illuminées avec une DEL orange pendant 2 min avant que la luminescence persistante soit observée avec une caméra Optima (Biospace Lab).

ii. Injections intrapéritonéales de cellules marquées

Deux T75 sontensemencées avec $6 \cdot 10^6$ ECFC. 5,5 mg de MPNH₀-COOH ou MPNH₂-COOH sont dispersées dans 22 mL de milieu EGM2 et déposés sur les cellules. Après 6 h, le milieu est aspiré, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS et décollées avec de la trypsine-EDTA. La suspension cellulaire est mélangée à du milieu de culture et les cellules sont centrifugées à 240 g pendant 5 min. Les cellules sont comptées et les culots cellulaires sont redispersés dans un volume afin de se placer à une concentration de $5 \cdot 10^6$ ECFC mL^{-1} . Les cellules sont ensuite illuminées pendant 5 min avec une DEL rouge avant que $5 \cdot 10^5$ ECFC ne soient injectées dans la cavité péritonéale de souris Balb/c anesthésiée à l'aide d'isoflurane. Une première acquisition de luminescence persistante est réalisée pendant 10 secondes puis un aimant est apposé sur le flanc droit de la souris. L'évolution de la luminescence persistante est enregistrée pendant une dizaine de minutes, jusqu'à stabilisation de sa distribution.

f) Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés comme la moyenne, les barres d'erreurs indiquent la déviation standard, sauf si précisé autrement. Les comparaisons statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad, en utilisant des tests ANOVA, suivi par un ajustement de Bonferroni. Dans tous les cas, une probabilité minimale p de 0,01 a été choisie pour indiquer une différence significative.

VI. LIMITES ET PERSPECTIVES

1) <u>Suivi de la dégradation des MPNH</u>	p. 209
a) Dégradation <i>in vitro</i>	p. 209
i. Introduction.....	p. 209
ii. Evolution des propriétés de luminescence.....	p. 210
iii. Evolution du signal de RPE.....	p. 211
iv. Suivi de la dégradation en MET.....	p. 211
b) Toxicité et dégradation <i>in vivo</i>	p. 214
c) Luminescence.....	p. 217
d) Conclusion.....	p. 221
e) Section expérimentale.....	p. 221
2) <u>Pistes d'amélioration de la synthèse des ZGO</u>	p. 222
a) La voie de synthèse micro-ondes.....	p. 223
i. Introduction.....	p. 223
ii. Synthèse, composition et caractéristiques physicochimiques.....	p. 223
iii. Propriétés de luminescence et utilisation <i>in vivo</i>	p. 227
iv. Toxicité.....	p. 229
v. Conclusion.....	p. 229
b) Synthèse par combustion.....	p. 230
c) Amélioration de la synthèse hydrothermale.....	p. 233
i. Empêcher le frittage.....	p. 233
ii. Optimiser les paramètres.....	p. 235
d) Conclusion.....	p. 239
e) Section expérimentale.....	p. 239

De nombreuses questions ont été soulevées dans les deux premières parties des résultats. Certains phénomènes surprenants sont difficilement explicables sans réaliser d'autres expériences. Des limites de l'utilisation de ces nanoparticules sont aussi rencontrées. De plus, des sujets importants ne sont pas abordés dans ces deux parties, notamment concernant le devenir et la toxicité de nanoparticules telles que les MPNH *in vivo*.

Cette dernière partie de résultats présente des expériences ou des pistes de réflexion afin d'envisager des réponses aux questions et limites rencontrées précédemment. Dans un premier temps, des travaux complémentaires sur les MPNH sont présentés. Ils concernent la dégradation des MPNH *in vitro*, la toxicité des MPNH après injection intraveineuse et les phénomènes de perturbation de la luminescence par les USPIO. Dans un second temps, des pistes d'amélioration des nanoparticules à luminescence persistante sont discutées. Celles-ci consistent en de nouvelles voies de synthèse ou des modifications de la synthèse hydrothermale habituellement utilisée.

1) Suivi de la dégradation des MPNH

Des expériences complémentaires de l'utilisation de MPNH *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin d'évaluer notamment leur dégradation et leur toxicité à plus long-terme. La dégradation de ces nanoparticules peut avoir plusieurs conséquences. La première est une disparition progressive du signal de luminescence ou du contraste en IRM. Les USPIO nues se dégradent assez rapidement,^{429, 430} ce qui en empêche un suivi à long-terme *in vivo*. En revanche la présence d'une couche de silice autour des USPIO peut modifier la cinétique de ce phénomène.

a) Dégradation *in vitro*

i. Introduction

Comprendre comment se dégradent ces nanoparticules est intéressant pour plusieurs raisons : outre le fait que le suivi en imagerie n'est plus possible lorsque les nanoparticules sont dégradées, cette dégradation peut entraîner une toxicité latente, qu'il est nécessaire de connaître si les nanoparticules sont vouées à résider longtemps dans l'organisme. Or, les nanoparticules que nous utilisons n'ont ni la taille requise pour être excrétées par les reins, ni la possibilité d'être prises en charge rapidement et facilement par l'organisme, contrairement aux nanoparticules d'oxyde de fer. Instinctivement, la disparition progressive des nanoparticules peut être considérée comme bénéfique pour la cellule. On sait que certaines nanoparticules qui se dégradent peu ou mal, telles que les fibres d'amiantes ou certains nanotubes de carbone entraînent un stress chronique néfaste pour les cellules exposées.^{142,143} Mais une dégradation rapide n'est pas forcément le plus bénéfique pour la cellule.⁴¹⁴ De fortes quantités intracellulaires de métaux tels que le fer pour les USPIO, de zinc et de gallium pour les ZGO ou de cadmium pour les QD ne sont pas sans effet. L'exemple du fer, certainement un des constituants de nanoparticules le moins toxique, n'est pas aussi simple que l'on pourrait penser. Sur l'ensemble du processus d'internalisation puis de dégradation, il semble que l'étape la plus délétère pour la cellule soit celle de dégradation, tandis que l'internalisation est sans impact sur la croissance, la différenciation et la viabilité cellulaire.⁴¹⁰ En effet, la toxicité apparaît lorsque les USPIO sont présents dans les endosomes⁴²⁹ : le fer, une fois libéré sous sa forme ionique rentre alors dans le cycle de métabolisme classique de la cellule, ce qui implique la catalyse de réactions de formation d'ERO, y compris le radical hydroxyl par la réaction de Fenton, dont le potentiel oxydant est fortement délétère pour la cellule.⁴³¹ Concernant le zinc, une étude a montré que la dissolution de nanoparticules d'oxyde de zinc au sein des lysosomes était responsable d'une inflammation chronique entraînant progressivement une fibrose pulmonaire.⁴³² De plus, ces lysosomes semblent pouvoir être déstabilisés dans certaines conditions favorisant l'interaction des nanoparticules avec leurs membranes (potentiel ζ élevé au

⁴²⁹ A. S. Arbab et al. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* 2005, 18 (6), 383.

⁴³⁰ L. Lartigue et al. Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution *in situ* monitoring. *ACS Nano.* 2013, 7 (5), 3939.

⁴³¹ H. H. Hoepken et al. Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J. Neurochem.* 2004, 88 (5), 1194.

⁴³² W.-S. Cho et al. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Part. Fibre Toxicol.* 2011, 8, 27.

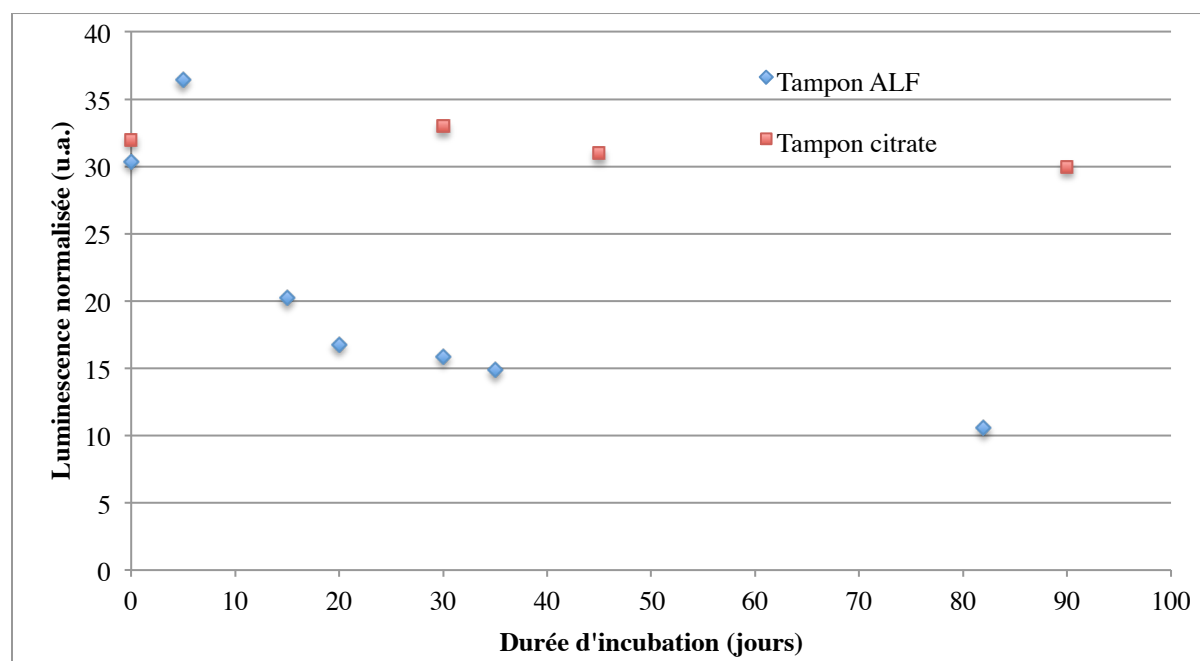
sein des lysosomes) ou lorsque les ions libérés sont toxiques, la conséquence étant l'apparition d'une inflammation dans les cellules ayant capté ces particules.⁴³³

Les ZGO et les MPNH sont des nanoparticules luminescentes, il est donc logique de vouloir suivre l'évolution de cette propriété au fil du temps après les avoir placés dans un tampon particulier. De plus les MPNH sont superparamagnétiques, on peut donc aussi suivre l'évolution du magnétisme de ces particules. Les expériences de dégradation des MPNH ont été effectuées avec Jeanne Volatron au MSC, dont le sujet de thèse est justement l'étude du devenir de nanoparticules *in vivo*.

Les essais de dégradation ont été réalisés avec des MPNH₃-OH placés dans un tampon citrate (pH 4,7) à 37°C ou dans un tampon mimant le milieu lysosomal (appelé "fluide lysosomal artificiel" ou ALF)⁴³⁴ à 37°C. Les propriétés de luminescence et de résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été mesurées pendant plusieurs semaines.

ii. Evolution des propriétés de luminescence

Le suivi en luminescence des MPNH₃-OH a été réalisé pendant plusieurs mois (Graphique 6.1).



Graphique 6.1. Evolution temporelle de la luminescence de nanoparticules MPNH₃-OH placés dans un tampon citrate ou ALF (tous deux à pH 4,7 et à 37°C).

La luminescence des MPNH₃-OH est restée stable dans le tampon citrate pendant une centaine de jours (carrés rouges, Graphique 6.1). En revanche, la luminescence des MPNH₃-OH placés dans le tampon ALF diminue significativement dès 15 jours (losanges bleus, Graphique 6.1). Il est tout de même discutable d'attribuer cette évolution à une dissolution des ZGO, car leur luminescence est influencée par la présence d'USPIO, comme évoqué en Partie IV. Ce problème sera à nouveau évoqué dans cette partie, au paragraphe c) Luminescence. En effet, si la présence des USPIO modifie l'intensité

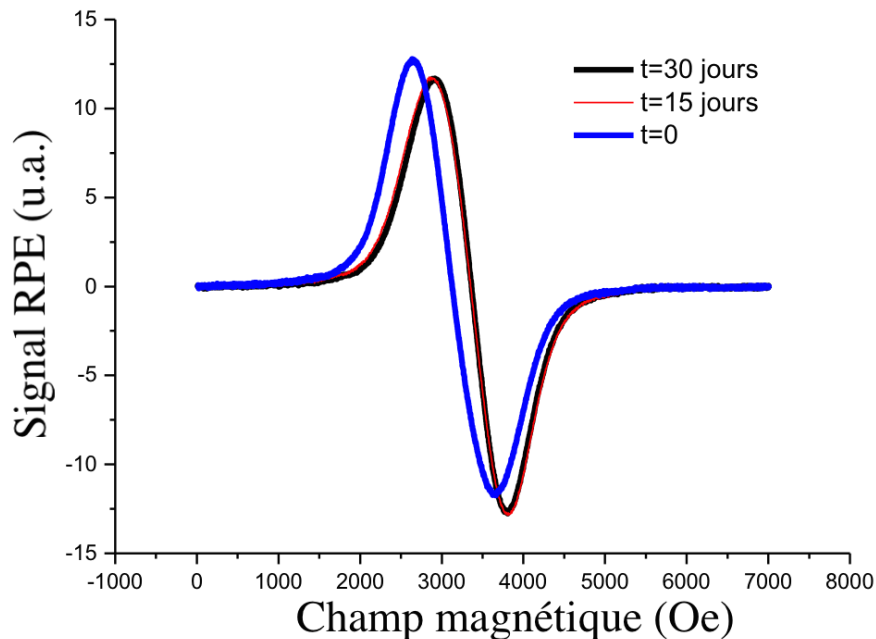
⁴³³ W.-S. Cho et al. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2012, 126 (2), 469.

⁴³⁴ W. Stopford et al. Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *J. Environ. Monit.* 2003, 5 (4), 675.

lumineuse, une dissolution des USPIO peut entraîner une évolution de la luminescence sans que les ZGO ne se dissolvent. Pour cette raison, un suivi en RPE a aussi été réalisé, afin de quantifier la quantité de fer paramagnétique présent dans les MPNH placés dans le tampon ALF.

iii. Evolution du signal de RPE

Le suivi en RPE des MPNH₃-OH n'a été effectué que pendant 30 jours (Graphique 6.2). Mais la luminescence diminue pendant cette période et il est intéressant de comparer les deux expériences.



Graphique 6.2. Evolution temporelle du signal RPE de MPNH₃-OH placées dans du milieu ALF à 37°C. (Crédit Jeanne Volatron)

On voit tout de même qu'après 15 et 30 jours, il y a une légère évolution du signal du fer superparamagnétique et l'intégration du signal de RPE indique une baisse de sa concentration (8,69 mmol.L⁻¹ à 15 jours, contre 10 mmol.L⁻¹ initialement). Mais le signal étant le même après 30 jours d'incubation, il est probable que la différence mesurée soit due à une évolution de l'environnement des USPIO. Cette persistance des USPIO est vraisemblablement due à la présence de la silice, car les USPIO nues placées dans du tampon ALF ont une dissolution rapide, proche de 72 à 96 h.^{429,430} La luminescence diminue dès 15 jours puis se stabilise, tandis que le signal RPE indique une très légère baisse de la concentration en USPIO à 15 jours avant une stabilisation, au moins jusqu'à 30 jours. Il est donc possible que l'évolution de la luminescence soit liée à une évolution de la quantité d'USPIO, mais cela n'est pas certain. De plus, la luminescence semble dépendre d'autres facteurs, tels que l'environnement des ZGO. Ainsi, une modification progressive de l'environnement des USPIO et des ZGO dans la silice au cours des premières semaines d'incubation dans le tampon ALF pourrait expliquer les diminutions initialement observées de la luminescence et du signal de RPE.

iv. Suivi de la dégradation en MET

L'évolution de la structure physique des MPNH peut éventuellement expliquer l'évolution de la luminescence. Des images de MET ont été réalisées après 30 et 90 jours d'incubation des MPNH₃-OH dans le tampon ALF (Figure 6.1).

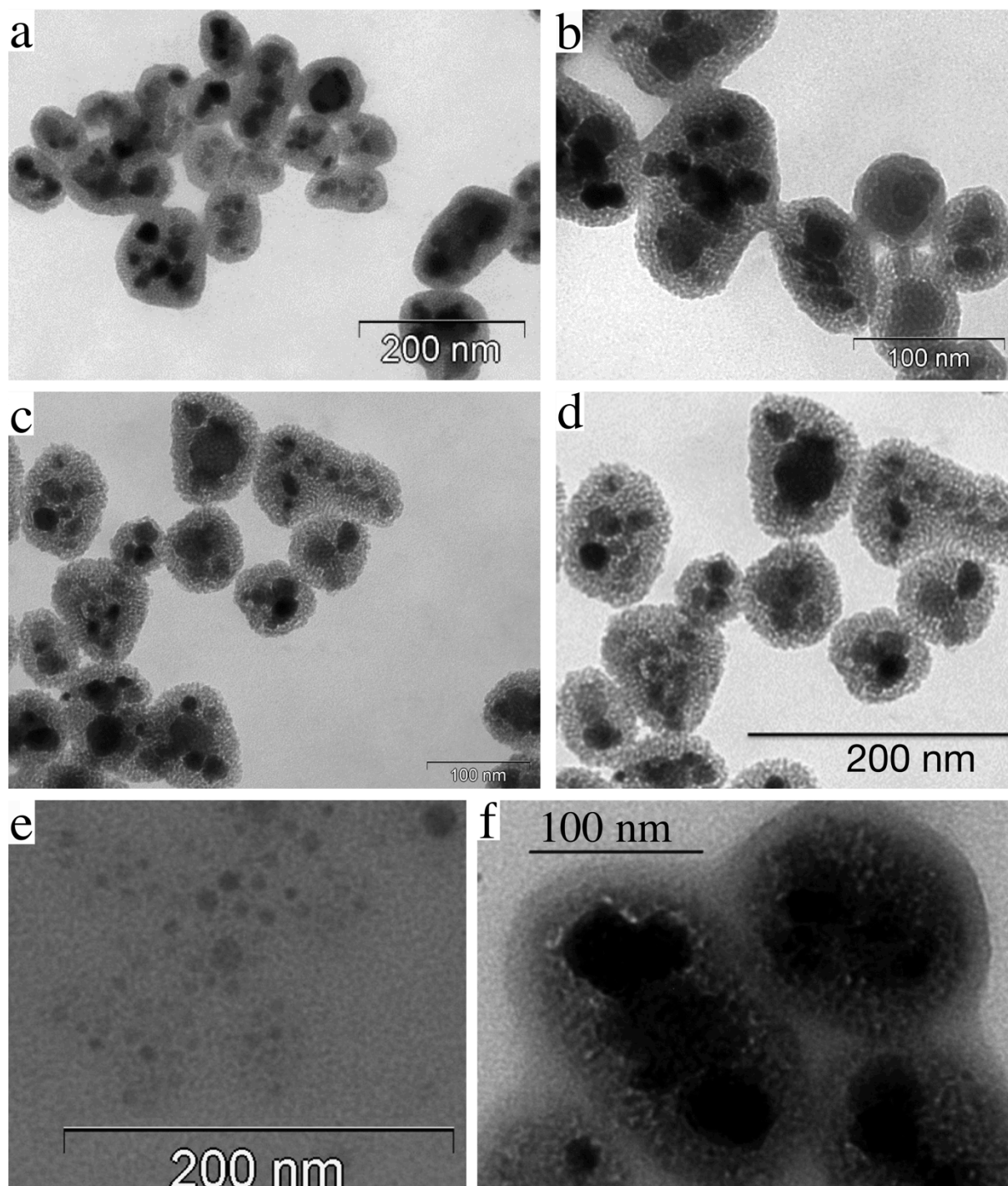


Figure 6.1. Suivi de la dégradation de MPNH₃-OH incubées à 37°C dans du tampon ALF en MET. a-b) MPNH₃-OH initiales. c-d) MPNH₃-OH ayant incubé 30 jours dans du tampon ALF. e-f) MPNH₃-OH ayant incubé 90 jours dans du tampon ALF. (Crédit Jeanne Volatron)

En MET, après 30 jours, on observe que la silice enrobant les ZGO et les IONPs semble être plus poreuse qu'initialement (Figure 6.1.c et d). Après 90 jours d'incubation, la silice est soit complètement (Figure 6.1.e), soit partiellement dissoute (Figure 6.1.f). Cette vitesse de dégradation de la silice est particulièrement faible lorsqu'on la compare aux résultats publiés sur le même sujet. Mahon et al. ont montré que des nanoparticules de silice se dissolvaient dans du milieu de culture cellulaire (DMEM) en 24 h, ou commençaient à se dissoudre au maximum au bout de 48 h lorsqu'elles étaient placées

dans des milieux salins.⁴³⁵ Cependant, il est difficile de comparer deux systèmes nanoparticulaires distincts incubant dans des milieux différents. La silice que nous synthétisons subit une étape hydrothermale (24 h à 120°C dans un réacteur en téflon), ce qui n'est pas le cas de la silice poreuse utilisée dans la publication sus-citée. Et il n'y a pas de lien causal entre la complexité d'un milieu et la vitesse de dissolution des nanoparticules. L'adsorption de certaines protéines en surface peut parfois protéger un type de nanoparticules de la dégradation, comme cela a notamment été observé sur des nanoparticules d'oxyde de fer par Jeanne Volatron au MSC (résultats en cours de publication).

Il semble ainsi que les MPNH₃-OH se dégradent progressivement dans du tampon ALF, perdant peu à peu leurs propriétés superparamagnétiques et luminescentes, bien que cette dernière semble se stabiliser et très peu diminuer après une cinquantaine de jours d'incubation.

La dégradation des MPNH est donc assez lente. Mais comme je l'ai déjà souligné, la vitesse de dégradation n'est pas forcément liée linéairement à la toxicité. Si la présence de certaines nanoparticules est fortement toxique à long-terme (certains nanotubes de carbone ont un effet amiante-like), il n'est pas impensable que certaines nanoparticules qui ne se dégradent pas, ou dont la dégradation est extrêmement lente, puissent être non toxiques pour les cellules. Une vitesse de dégradation intermédiaire pourrait aussi être fortement toxique car elle maintiendrait des taux faibles mais anormaux de manière chronique de substances toxiques comme les métaux lourds utilisés dans les QD.

De plus, ces expériences ne font que modéliser la dégradation des MPNH dans des cellules. Des expériences de dégradation dans des cellules *in vitro* ou *in vivo* sont nécessaires pour évaluer la toxicité due à une éventuelle rémanence et à une dégradation lente des MPNH. Cependant, ces premiers tests suggèrent qu'il est possible de suivre les MPNH plusieurs semaines *in vivo*, aussi bien en luminescence qu'en IRM. Ainsi, parallèlement à ces tests préliminaires de dégradation, nous avons voulu entreprendre un suivi à plus long terme des MPNH₃-COOH *in vivo*. Le but était d'évaluer la toxicité chronique ainsi qu'une éventuelle dégradation, en suivant au cours du temps l'évolution de la luminescence et du contraste du parenchyme hépatique en IRM. Mais les expériences de mise au point nous ont poussés à retarder le début de ces expériences pour deux raisons indépendantes :

- la faible luminescence persistante des MPNH₃-COOH après illumination DEL ne permettait pas de les observer sur de longues périodes : cela est dû à une impossibilité d'observer leur luminescence après illumination visible une fois ces nanoparticules injectées par voie intraveineuse.
- des problèmes de biodistribution et de toxicité survenus avec les MPNH₃-COOH synthétisés pour cette expérience ont empêché de continuer ces expériences.

Ces constats sont discutés dans les deux paragraphes ci-dessous.

⁴³⁵ E. Mahon et al. Stabilising fluorescence silica nanoparticles against dissolution effects for biological studies. Chem. Commun. 2012, 48, 7970.

b) Toxicité et dégradation *in vivo*

Comme évoqué ci-dessus, la toxicité à long-terme, qui doit être étudiée parallèlement à la dégradation, mérite d'être évaluée aussi bien sur des cellules marquées qu'après injection chez la souris. Je n'ai pas réalisé de tests de toxicité cellulaire autres que ceux présentés dans la Partie VI, en revanche, quelques tests de toxicité *in vivo* ont été entrepris.

Lors de l'injection intraveineuse de $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ à des souris, j'ai observé plusieurs fois une biodistribution normale (Figure 6.2.a, b et c), avec une accumulation dans le SRE après quelques minutes, pour les 2 ou 3 premières souris injectées. En revanche, pour les souris suivantes, les mêmes nanoparticules s'accumulaient en partie dans les poumons (Figure 6.2.c, d et e). Cela entraînait parfois un décès de la souris, ou la nécessité de la sacrifier, dans l'heure qui suivait cette injection.

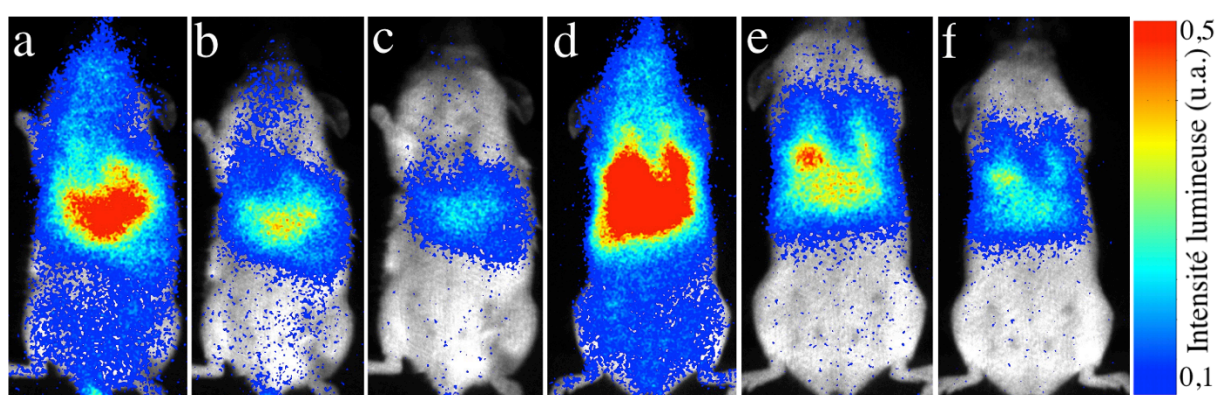
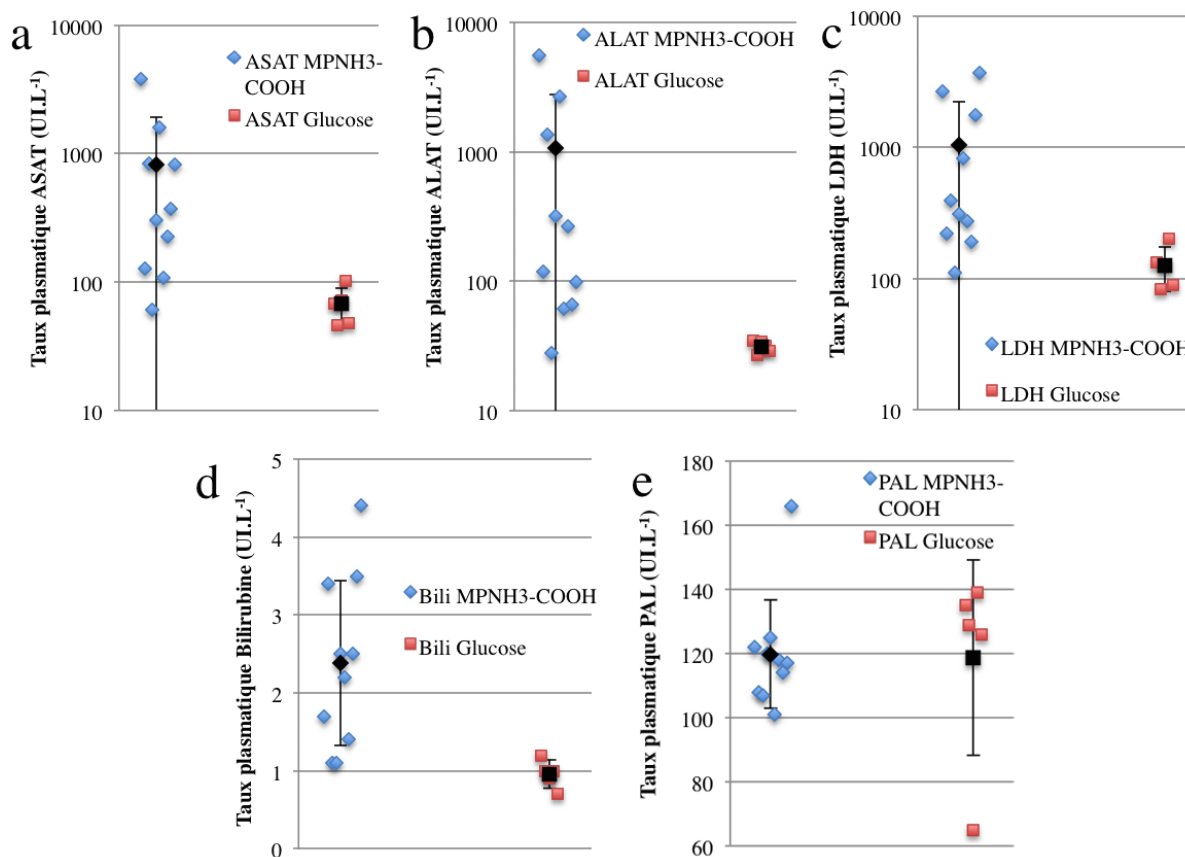


Figure 6.2. Variabilité de la biodistribution des $\text{MPNH}_3\text{-COOH}$ 2 (a,d), 5 (b,e) et 10 (c,f) min après injection de 2 mg par voie intraveineuse. On peut observer une accumulation presque totale dans le foie (a-c) ou répartie entre le foie et les poumons (d-f).

Lors de ces tests, du sang a été prélevé 24 h après injection des MPNH afin de réaliser un dosage de différentes substances (aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), phosphatases alcalines (PAL), lactates déshydrogénases (LDH) et bilirubine (Bili)) (Graphique 6.3). Ces taux ont été comparés à ceux de souris ayant reçu la solution d'injection sans nanoparticule (glucose 5 %).



Graphique 6.3. Bilans sériques de souris ayant reçu 2 mg de MPNH₃-COOH par voie intraveineuse (losanges bleus) comparés à des souris témoins n'ayant reçu que le véhicule (carrés rouges). Les marqueurs dosés dans le sérum sont l'ASAT (a), l'ALAT (b), la LDH (c), la bilirubine (d) et les phosphatases alcalines (e). (Merci à Nathalie Neveux Quenaux de l'unité de Biochimie générale et spécialisée du groupe hospitalier Cochin, Paris)

Les résultats sont surprenants pour deux raisons : certaines souris ont des taux astronomiques de ces enzymes, et la variabilité au sein du groupe de souris ayant reçu les nanoparticules (losanges bleus, Graphique 6.3) est telle que parmi ces souris, certaines ne présentent pas d'écart significatif avec le groupe témoin (carrés rouges, Graphique 6.3).

Deux résultats doivent être commentés après ces injections : la variabilité de la biodistribution des MPNH₃-COOH et la toxicité hépatique observée ci-dessus. Ces deux résultats semblent indépendants, car les résultats observés en toxicité hépatique ne sont pas corrélés à la biodistribution des particules. Cette variation de la biodistribution qui semble apparaître lorsque les MPNH₃-COOH ne sont pas injectées assez rapidement (moins de 10 min après redispersion) peut avoir deux origines :

- les propriétés morphologiques des MPNH ou une mauvaise stabilité colloïdale entraînant une floculation pourraient être à l'origine d'une embolisation des capillaires pulmonaires, faisant suffoquer la souris,
- une modification ou une dégradation de leur recouvrement, exposant les fonctions silanols initialement présentes à leur surface. Ces groupes sont responsables d'une accumulation des nanoparticules dans les poumons et le phénomène d'hémolyse rapporté^{340,397,402} en est peut-être la cause.³³⁸

Les dosages des enzymes hépatiques montrent une toxicité aigüe importante consistant en une cytolysé hépatique majeure. Après dissection, nous avons observé des foies tachetés irrégulièrement, certaines zones apparaissant plus sombre, voire de couleur

verte, ce qui est vraisemblablement le signe d'une nécrose.⁴³⁶ Le foie contient des petits vaisseaux sanguins appelés sinusoides en partie bordés par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques.⁴³⁷ Cet endothélium est unique car il possède des pores ouverts donnant sur l'espace de Disse. Ceux-ci mesurent de l'ordre de 100 nm et occupent 6 à 8 % de la surface de l'endothélium (Figure 6.3).⁴³⁷

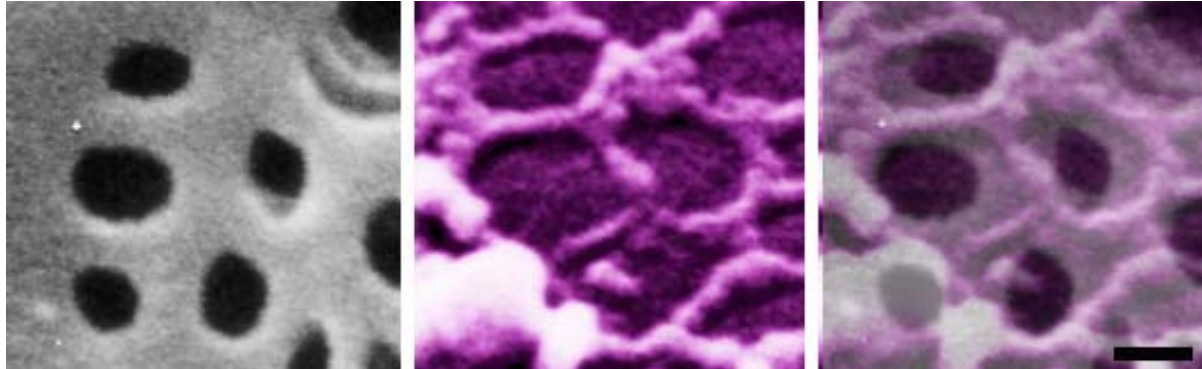


Figure 6.3. Images de microscopie électronique à balayage d'une cellule sinusoidale hépatique de rat, avant (a) et après (b) fixation et extraction du cytosquelette. c) Superposition des images a) et b), la barre d'échelle indique 100 nm. (Adapté de 437)

Cette taille proche du diamètre des MPNH est probablement la cause d'une telle toxicité hépatique. En effet, une publication a montré qu'une toxicité hépatique importante de nanoparticules de silice était probablement due à un phénomène d'embolisation de ces pores lorsque leur taille concordait avec celle des nanoparticules utilisées.⁴³⁸ Cependant, une autre équipe a publié une étude de toxicité en utilisant les mêmes nanosphères de silice d'environ 100 nm.⁴³⁹ Leur injection par voie intraveineuse montre une faible toxicité aux doses proches des nôtres (une mortalité due à l'injection n'apparaissait qu'à des quantités injectées supérieures à 10 mg par souris). Cependant, l'analyse histologique du foie semble indiquer une réaction inflammatoire suite à l'injection d'une faible dose (0,2 mg par souris) de nanoparticules de silice de 20 et 80 nm par voie intraveineuse.⁴⁴⁰ Ces résultats assez variés ne permettent pas d'expliquer la toxicité majeure observée dans notre cas. Mais il est probable que l'embolisation des pores des vaisseaux sinusoidaux puisse entraîner une telle souffrance hépatique.

Ces résultats inquiétants ne permettent pas d'envisager l'utilisation de MPNH injectées par voie intraveineuse. Avant toute nouvelle application, il est donc nécessaire de comprendre les raisons d'une telle toxicité et éventuellement de trouver un moyen de l'éviter.

⁴³⁶ S. Truant et al. L'ALPPS : une nouvelle technique de résection hépatique extrême pour métastases colorectales non résécables. *Hépatol. Gastro.* 2015, 22, 506.

⁴³⁷ F. Braet & E. Wisse. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 2002, 1, 1.

⁴³⁸ H. Nishimori et al. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72 (3), 496.

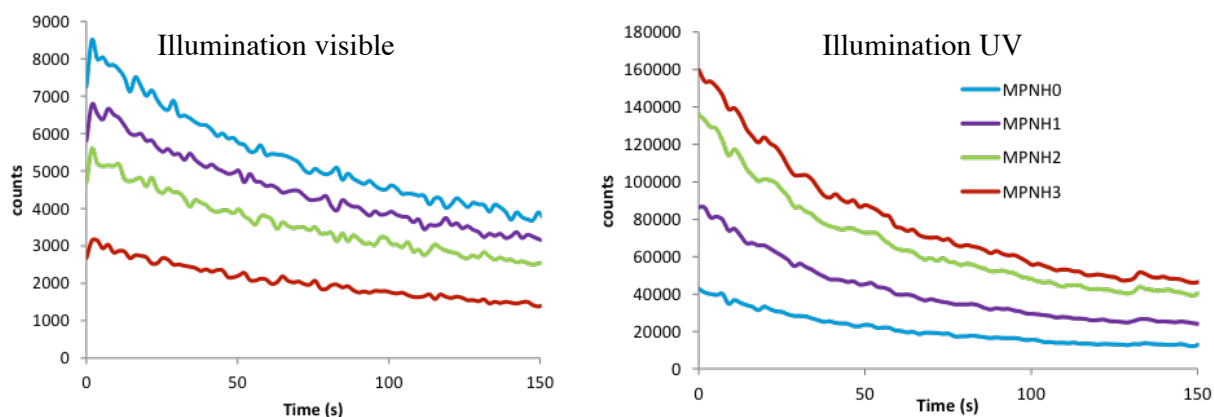
⁴³⁹ T. Liu et al. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials.* 2011, 32, 1657.

⁴⁴⁰ G. Xie et al. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol.* 2010, 84, 183.

c) Luminescence

J'ai déjà évoqué l'influence de la présence des USPIO sur la luminescence, et la Figure 4.4 montre que la luminescence des MPNH₃ est beaucoup plus faible que celles des autres MPNH après illumination visible lorsque celles-ci sont placées dans de la soude 5 mM. Ce n'est pas le cas dans le glucose 5 %, comme le montre la Figure 4.3. Cependant, cela peut représenter une limite importante à leur suivi à long terme *in vivo*. En effet, afin d'être observées *in vivo*, ces nanoparticules doivent être illuminées au travers des tissus à l'aide d'une DEL orange. La faible luminescence des MPNH₃ après illumination visible a d'ailleurs constitué une des raisons pour lesquelles les MPNH₂ ont été préférés pour réaliser l'expérience de vectorisation cellulaire *in vivo*.

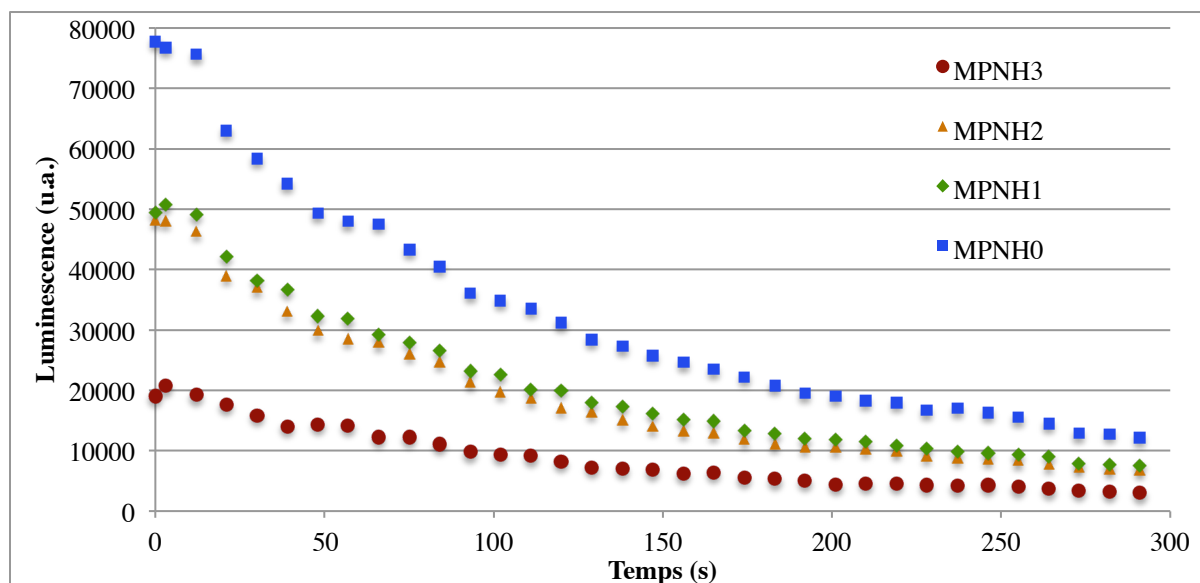
Comme nous l'avons vu en Partie IV, des mesures de luminescence réalisées sur des MPNH-OH concentrés à 10 mg.mL⁻¹ dans un milieu basique montrent des variations de la luminescence après illumination visible ou UV (Graphique 6.4).



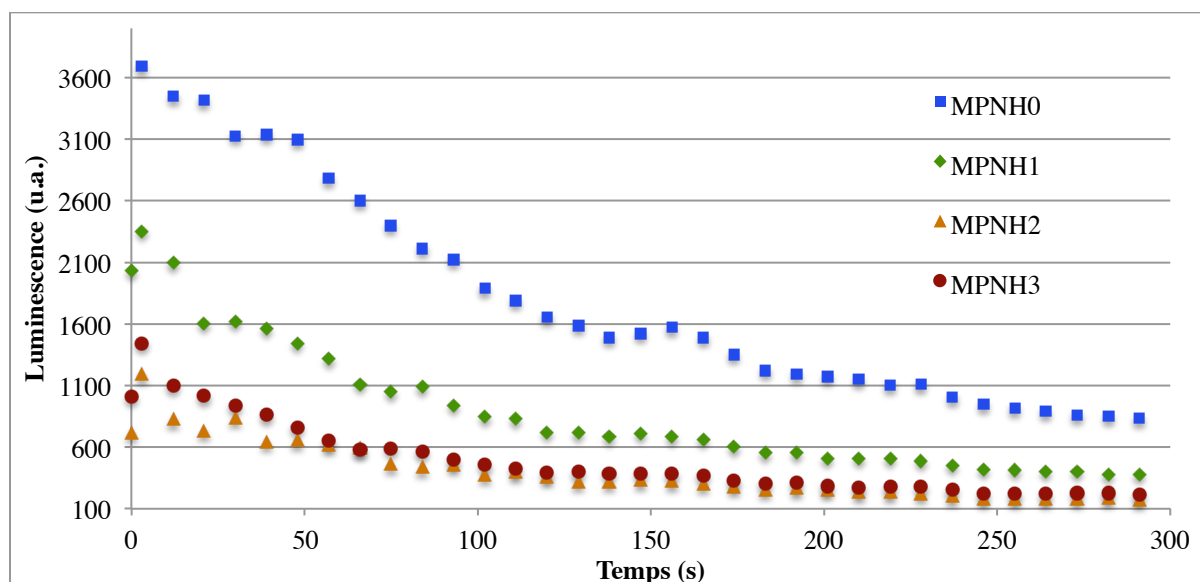
Graphique 6.4. Déclins de luminescence des MPNH-OH en suspension à 10 mg.mL⁻¹ dans NaOH 5 mM après illumination visible ou UV.

Après illumination visible, les MPNH les moins luminescentes sont ceux qui contiennent le plus de fer (courbe rouge, MPNH₃). En revanche, après une illumination UV, les MPNH sont d'autant plus luminescents qu'ils contiennent du fer.

Les premiers déclins enregistrés dans le glucose 5 % ne montraient pas de différence de luminescence entre chaque type d'hybride (Partie IV, Graphique 4.3). Initialement, il semblait y avoir un effet du milieu dans lequel les MPNH étaient redispersées. Il a donc paru intéressant d'observer la luminescence des nanoparticules après les avoir séchées (Graphiques 6.5 et 6.6).



Graphique 6.5. Déclins de luminescence des MPNH-OH en poudre après illumination UV.

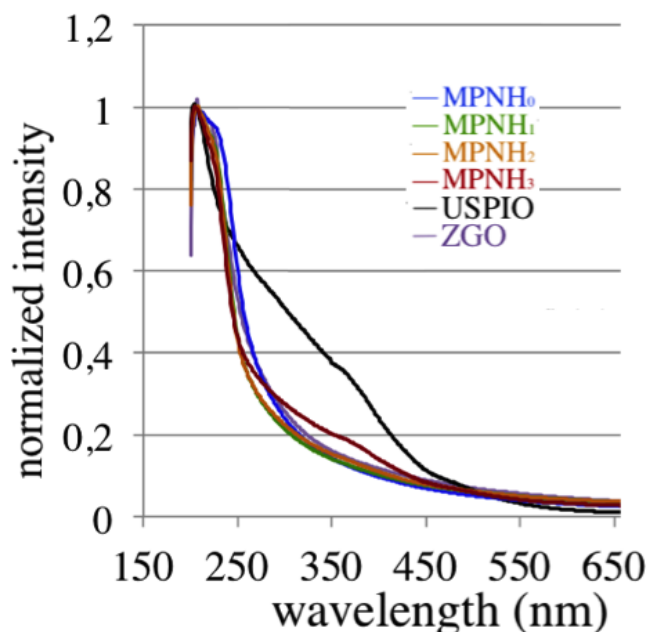


Graphique 6.6. Déclins de luminescence des MPNH-OH en poudre après illumination visible.

Etonnamment, la tendance est alors la même quelle que soit l'illumination utilisée : plus il y a d'USPIO, moins les particules sont luminescentes. Cela semble être en faveur d'un rôle important du solvant dans l'interaction entre les ZGO et les USPIO au sein des MPNH. De plus, les déclins de luminescence de poudres après illumination visible (Graphique 6.6) sont assez proches de ceux effectués en solution (Graphique 6.5).

On peut donc constater que le solvant est nécessaire pour observer une augmentation de la luminescence en présence d'USPIO après illumination UV. De plus, la nature du solvant semble être importante.

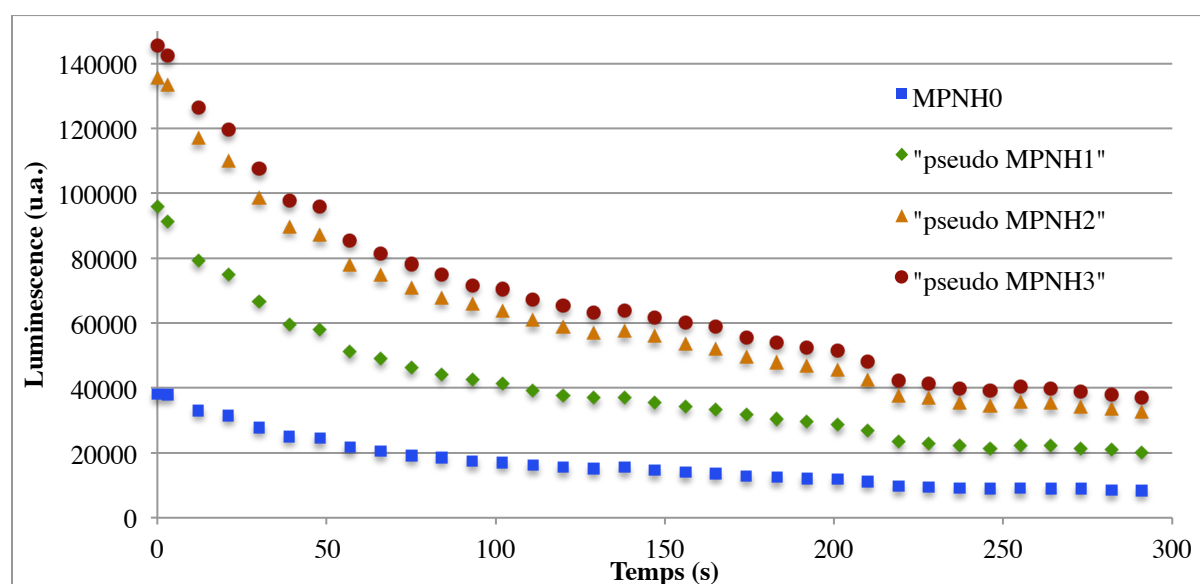
Nous pouvons aussi conjecturer que la diminution de la luminescence des poudres avec l'augmentation de la proportion d'USPIO est due à leur absorbance. Cependant les courbes d'absorbance des MPNH ne montrent pas de différence sauf pour les MPNH₃ qui possèdent une absorbance légèrement supérieure autour de 350 nm due aux USPIO (Graphique 6.7).



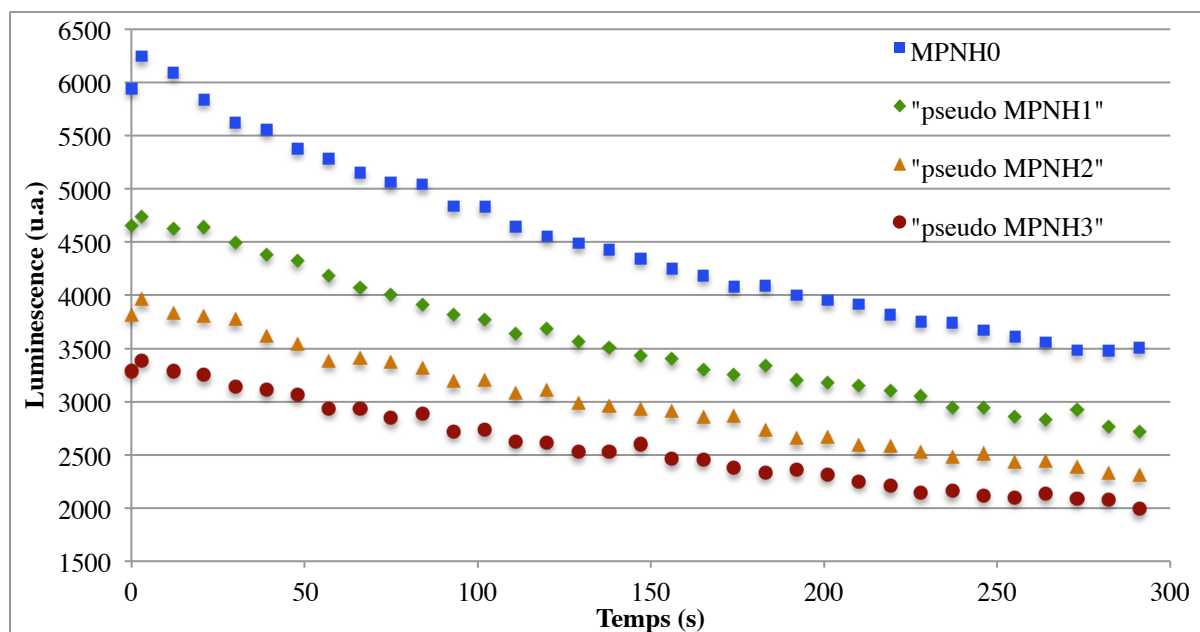
Graphique 6.7. Courbes d'absorptions normalisées des MPNH, ZGO et USPIO entre 200 et 800 nm. L'insert montre les spectres d'émissions normalisés des MPNH entre 550 et 850 nm.

Mais pour expliquer l'augmentation de la luminescence après illumination UV, il faut émettre une hypothèse supplémentaire : l'absorption des UV par les USPIO serait à l'origine de l'augmentation de la luminescence.

Une expérience a été réalisée en préparant des suspensions de MPNH₀-OH dans la soude auxquelles ont été ajoutées des quantités croissantes d'USPIO. Ces quantités ont été calculées afin de mimer les proportions des MPNH₁, MPNH₂ et MPNH₃. Ces solutions sont nommées "pseudo MPNH₁", "pseudo MPNH₂" et "pseudo MPNH₃". Dans cette expérience, les USPIO ne peuvent pas être aussi proches des ZGO que dans les MPNH. En effet, ils seront au mieux en contact avec la surface de la silice, à quelques nanomètres, voire dizaines de nanomètres des ZGO. Les déclin de luminescence ont été mesurés après illumination UV et visible (Graphiques 6.8 et 6.9).



Graphique 6.8. Déclin de luminescence de suspension dans NaOH 5 mM de MPNH₀-OH (1 mg.mL⁻¹) avec des quantités croissantes d'USPIO après illumination UV.



Graphique 6.9. Déclins de luminescence de suspension dans NaOH 5 mM de MPNH₀-OH (1 mg.mL⁻¹) avec des quantités croissantes d'USPIO après illumination visible.

Malgré cette distance plus importante entre les USPIO et les ZGO, on observe la même évolution de la luminescence que pour les MPNH : la luminescence est augmentée en présence d'USPIO après illumination UV (Graphique 6.8), tandis qu'elle est diminuée après illumination visible (Graphique 6.9). Il y a donc un effet de la présence des USPIO qui s'effectue à distance. Cela est compatible avec l'absorption des USPIO après illumination visible, mais n'explique pas les déclins observés après illumination UV.

Quelques publications montrent que les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent présenter une activité photocatalytique^{441, 442} ou entraîner la formation d'ERO⁴⁴³ lorsqu'elles sont illuminées avec des UV ou des rayonnements de longueur d'onde inférieure à 600 nm, des paires électron-trou apparaissant alors au sein de l'oxyde de fer.⁴⁴² De plus, nous avons vu que les ZGO avaient vraisemblablement des propriétés d'oxydoréduction³⁹¹ et que le fait de les illuminer avec des UV entraînait une transformation du réactif WST-8. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'absorption d'UV par les USPIO entraîne la création de paires électron-trou qui sont transmises aux ZGO, soit par contact, soit par création d'ERO. La dernière possibilité semble être la plus probable étant donné que ce phénomène n'est pas observé en l'absence de solvant et qu'il est observé même quand les USPIO sont à distance des ZGO. Il est donc probable que dans un solvant aqueux, des ERO telles que les radicaux hydroxyle ou superoxyde⁴⁴³ transfèrent des électrons des USPIO aux ZGO.

Pour confirmer cette hypothèse il faudrait mesurer la quantité d'ERO formées dans des solutions de MPNH illuminées à différentes longueurs d'ondes, ou mesurer la luminescence de solutions de ZGO mélangés à des photosensibilisateurs libérant des ERO lorsqu'ils sont illuminés.

⁴⁴¹ J. K. Leland & A. J. Bard. Photochemistry of colloidal semiconducting iron oxide polymorphs. J. Phys. Chem. 1987, 91, 5076.

⁴⁴² A. Duret & M. Grätzel. Visible light-induced water oxidation on mesoscopic α -Fe₂O₃ films made by ultrasonic spray pyrolysis. J. Phys. Chem. B. 2005, 109, 17184.

⁴⁴³ Y. Li et al. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. ACS Nano. 2012, 6 (6), 5164.

Tous les enregistrements de déclin de luminescence ont été réalisés dans la soude 5 mM sauf le premier présenté en Partie IV, qui a été réalisé dans le glucose 5 %. Or, aucun effet n'était observé dans le glucose. Cela suggère que ce phénomène dépend du milieu dans lequel est effectué la mesure. Il aurait été intéressant de réaliser des expériences complémentaires afin de mieux comprendre le rôle du milieu, ce qui n'a malheureusement pas été le cas.

d) Conclusion

Les MPNH sont des nanoparticules complexes, dont la toxicité et les propriétés physico-chimiques n'ont pu être totalement déterminées. De nombreux problèmes doivent encore être résolus afin d'envisager leur utilisation *in vivo*, notamment après injection intraveineuse ou en quantité plus importante que celle utilisée lors des expériences de vectorisation cellulaire. La toxicité doit aussi être déterminée aussi bien à court terme qu'à long terme, car la toxicité aigüe observée est difficilement corrélable à une toxicité chronique liée à la rémanence ou la dégradation des MPNH au sein des cellules dans lesquelles elles s'accumulent. Ces problématiques sont aujourd'hui au coeur du sujet de thèse de Thomas Lecuyer et de Jeanne Volatron sous la direction de Cyrille Richard et Florence Gazeau, dans le cadre d'un projet financé par l'ANR entre notre laboratoire et le MSC. Enfin, les variations de luminescence observées soulèvent des questions intéressantes dont l'étude devrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes fondamentaux de luminescence.

e) Section expérimentale

i. Dégradation des ZGO et des MPNH

Le tampon citrate initialement utilisé pour mimer le milieu lysosomal est constitué d'une solution aqueuse d'acide citrique 20 mM à pH 4,7. La composition du tampon ALF est détaillée dans une publication de M. Marques et al.⁴⁴⁴

Les MPNH₃ sont placées dans un tampon à la concentration de 10 mM en fer, ce qui correspond environ à 15 mg.mL⁻¹ en MPNH₃. L'incubation est réalisée à 37°C dans l'obscurité et des mesures physico-chimiques sont réalisées comme décrit ci-dessous.

ii. Mesures de luminescence persistante

Voir Partie IV, p. 135.

iii. Mesures de résonance paramagnétique électronique

Les mesures de RPE ont été réalisées avec un spectromètre E500 EPR opérant à 9,5 GHz. La dérivée première de l'absorbance $dW(B)/dB$ a été enregistrée en fonction du champ appliqué B dans la gamme de 0 à 10 kGauss, avec une puissance micro-onde de 1 mW. Le signal a été enregistré pour de faibles volumes (2 μ L) de suspensions de MPNH₃-OH à la concentration de 10 mM en fer, prélevés à l'aide de tubes capillaires Wiretrol II 1-5 μ L (VWR, France).

⁴⁴⁴ M. R. C. Marques et al. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. Dissol. Tech. 2011, 15.

iv. Microscopie électronique

Les images de microscopie électronique ont été réalisées en déposant une suspension aqueuse de nanoparticules sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film en carbone. Après 2 min, le liquide excédentaire est retiré par capillarité et les grilles sont observées sur un microscope à transmission électronique JEOL-JEM 100S opérant à 200 kV.

v. Toxicité *in vivo*

Environ 0,7 mL de sang des souris a été prélevé 24 h après injection de 2 mg de MPNH₃-COOH par voie intraveineuse. Ces prélèvements ont été réalisés avec des seringues héparinées par ponction intracardiaque. Les sangs récupérés sont ensuite placés dans des eppendorfs héparinés et centrifugés à 10³ g pendant 10 min. Les plasmas sont collectés et les analyses biologiques ont été réalisées par Nathalie Neveux Quenaux de l'unité de Biochimie générale et spécialisée du groupe hospitalier Cochin à Paris.

2) Pistes d'amélioration de la synthèse des ZGO

La voie de synthèse décrite initialement pour synthétiser le gallate de zinc dopé au chrome (III) (ZnGa₂O₄:Cr³⁺) reste contraignante bien qu'elle soit plus simple que celle de la première génération de nanoparticules luminescentes. Le ZGO peut être synthétisé en solution par voie hydrothermale en une journée, et nécessite ensuite une calcination. Ce chauffage qui permet d'obtenir une luminescence satisfaisante se fait à 750°C pendant 5 h, sans précaution particulière quant à l'atmosphère utilisée. Malgré la plus faible température du traitement thermique de ce matériau par rapport aux silicates, une calcination à 750°C entraîne tout de même un phénomène de frittage.

Ce dernier traitement thermique entraîne une augmentation non négligeable de la taille des grains et de leurs polydispersité. De plus, cela favorise l'obtention de morphologies très hétérogènes et les rendements d'extraction restent bas : la masse de nanoparticules dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à 80 nm représente moins de 20% de la masse de matériau obtenue. Ainsi il peut être intéressant d'explorer des voies de synthèses alternatives, permettant de former des nanoparticules de ZGO luminescentes, rapidement et sans calcination à haute température.

Le but de la recherche d'une nouvelle voie de synthèse est ainsi multiple :

- une diminution de la taille en conservant voire en augmentant la luminescence,
- une synthèse plus rapide et moins contraignante,
- une synthèse plus efficace pour l'obtention de nanoparticules et idéalement ne pas avoir à réaliser des extractions par centrifugation,
- une plus faible polydispersité et des morphologies mieux contrôlées.

La plupart de ces buts sont guidés par une recherche d'amélioration de la sonde d'imagerie que constituent les nanoparticules de ZGO. Une plus faible taille pourrait permettre une élimination des ZGO par les reins, une luminescence accrue permettrait d'utiliser de plus faibles quantités pour un même signal et le contrôle des morphologies et de la polydispersité permettrait d'éviter des variations de biodistribution *in vivo*. Seul le meilleur rendement s'éloigne un peu de ce but commun : s'il est, en premier lieu, guidé par une volonté de limiter les pertes et donc les coûts des synthèses (qui ne sont

pas très importants) il est en second lieu motivé par le caractère chronophage de l'étape d'extraction.

Plusieurs pistes ont été explorées : une synthèse assistée par micro-ondes, une synthèse par combustion et des modifications de la synthèse hydrothermale habituelle. Un travail détaillé a été réalisé sur la synthèse assistée par micro-ondes, en revanche, je me contenterai de donner quelques pistes de réflexion concernant les deux dernières possibilités, n'ayant pas réalisé d'études approfondies dans ces voies de recherche.

a) La voie de synthèse micro-ondes

i. Introduction

La synthèse de matériau nécessite un apport d'énergie important afin que les précurseurs s'assemblent pour obtenir la composition désirée. Cette énergie est généralement apportée via un traitement thermique, que les précurseurs soient à l'état solide (on parle alors de synthèse solide, et de solution solide) ou dissous dans un solvant (comme c'est le cas de la synthèse hydrothermale). Dans ce dernier cas, une quantité importante d'énergie peut être fournie au milieu différemment : un chauffage par micro-ondes est parfois beaucoup plus efficace. Ce type de synthèse nécessite de modifier quelque peu les conditions de réaction. Nous avons décrit la possibilité de synthétiser des ZGO de très petites tailles (USNPLP) en utilisant ce type de synthèse et ce travail réalisé en collaboration avec Yoann Lalatonne et Laurence Motte du CSPBAT (Paris XIII) a fait l'objet d'une communication.⁴⁴⁵



DOI: 10.1002/chem.201406599

CHEMISTRY
A European Journal
Communication

■ Luminescence Nanoparticles

Non-Aqueous Sol–Gel Synthesis of Ultra Small Persistent Luminescence Nanoparticles for Near-Infrared *In Vivo* Imaging



Elliott Teston,^[a] Sophie Richard,^[b] Thomas Maldiney,^[a] Nicole Lièvre,^[c]
Guillaume Yangshu Wang,^[d] Laurence Motte,^[b] Cyrille Richard,^[a] and Yoann Lalatonne^{✉[b]}

ii. Synthèse, composition et caractéristiques physicochimiques

Comme précisé plus haut, la synthèse hydrothermale est effectuée dans un autoclave à une température de 120°C pendant 24h. La synthèse assistée par micro-ondes permet d'obtenir des températures plus élevées sous pression, et est généralement utilisée en chimie organique pour augmenter la quantité d'énergie fournie au milieu réactionnel. Le choix des précurseurs et du solvant permet d'atteindre des températures plus élevées que la voie hydrothermale. Ainsi, nous avons utilisé des sels de zinc, de gallium et de chrome différents des habituels nitrates de la synthèse hydrothermale. Ces sels sont dérivés de "l'acétylacétone" : du monohydrate de Zinc(II)2,4-pentanedionate, du monohydrate de gallium(III)2,4-pentanedionate et du monohydrate de chrome(III)2,4-pentanedionate (Figure 6.4).

⁴⁴⁵ E. Teston et al. Non-aqueous sol-gel synthesis of ultra small persistent luminescence nanoparticles for near-infrared *in vivo* imaging. Chem. Eur. J. 2015, 21, 7350.

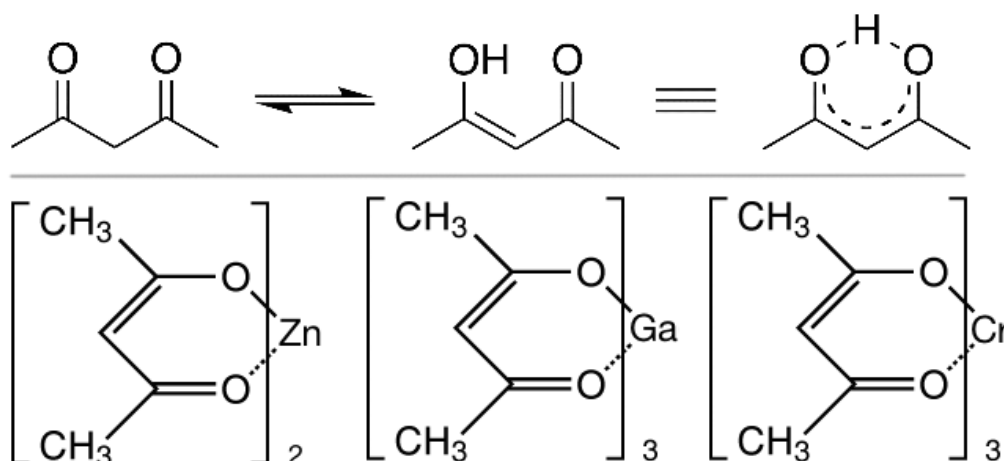


Figure 6.4. Sels utilisés pour la synthèse micro-ondes. Haut : tautomérie de l'acétylacétone. Bas : monohydrates de zinc(II), gallium(III) et chrome(III) 2,4-pentanedionate

Ces sels sont dissous dans de l'alcool benzylique et chauffés à 270°C pendant 30 min dans un réacteur à micro-ondes. Le précipité obtenu est lavé à l'éthanol afin d'éliminer le solvant et les ligands des métaux. Une simple redispersion dans une solution aqueuse contenant du PEG-phosphonate (1 mmol.L⁻¹) permet d'obtenir des nanoparticules stables, passivées en surface par du PEG.

On voit tout d'abord que cette synthèse monotope des nanoparticules est rapide et facile à mettre en oeuvre. Des expériences de MET, de diffraction électronique et des mesures de spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier ont permis de caractériser le matériau obtenu (Figure 6.5)

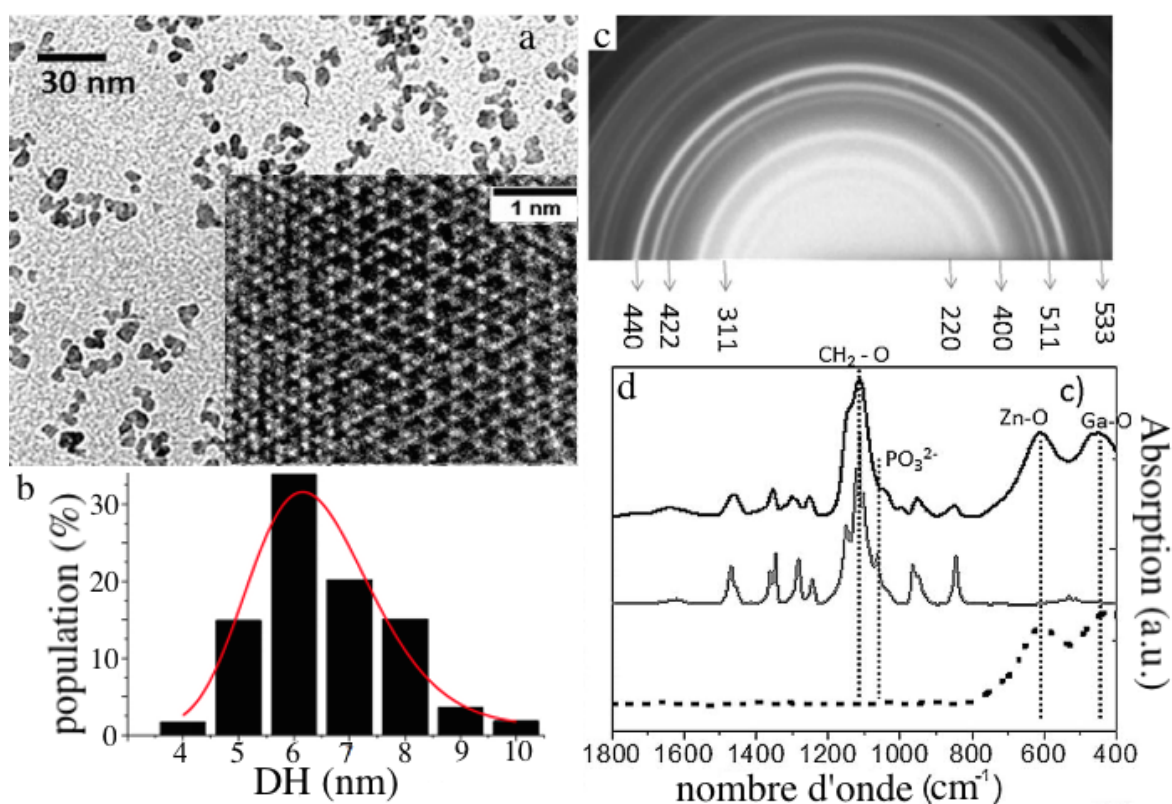


Figure 6.5. Caractérisations physiques des USNPLP. a) MET et MET à haute résolution (insert). b) Distribution de taille des USNPLP déterminée à partir des images de MET. c) Figure de diffraction des électrons des USNPLP. d) Spectroscopie infrarouge des USNPLP nues (courbe pointillée), de PO-PEG en solution (courbe gris intermédiaire) et de USNPLP recouverte de PO-PEG (courbe noire).

Les particules obtenues sont bien de taille nanométrique : l'analyse des images de MET (Figure 6.5.a) montre que les particules ont un diamètre moyen de $6,1 \pm 0,2$ nm (Figure 6.5.b). Des mesures de diffraction d'électrons (Figure 6.5.c) permettent de déterminer quels sont les plans cristallins du matériau et ainsi le type de maille obtenu : il s'agit bien d'un spinelle normal, la structure cristalline habituelle de ZnGa_2O_4 . La MET haute résolution (insert, Figure 6.5.a) prouve que les particules sont bien cristallisées. Cela est confirmé par la spectroscopie infrarouge (courbe pointillée, Figure 6.5.d) : on observe les bandes de vibration de Zn-O et Ga-O caractéristiques du ZGO cristallisé dans le groupe d'espace $Fd-3m$ (610 et 465 cm^{-1} , respectivement).⁴⁴⁶

La spectroscopie infrarouge (Figure 6.5.d) donne aussi les spectres d'absorption du PO-PEG (courbe grise intermédiaire) utilisé pour fonctionnaliser et stabiliser les particules. Le spectre d'absorption des particules fonctionnalisées (courbe noire supérieure) montre que le PO-PEG est bien présent en surface des USNPLP. La bande d'absorption intense à 1100 cm^{-1} est attribuable à l'oxide d'éthylène de la chaîne de PEG, celle à 1061 cm^{-1} correspond au groupe phosphonate.⁴⁴⁷ La courbe supérieure noire suggère un recouvrement des nanoparticules par le PO-PEG, notamment car la bande d'absorption du groupe phosphonate est plus large et légèrement déplacée vers le rouge en présence des ZGO (diminution du nombre d'onde vers 1042 cm^{-1}). Ceci peut être expliqué par une complexation de la surface des USNPLP par le PO-PEG via les groupes phosphonates. Des analyses thermogravimétriques ont été réalisées (Figure 6.6.a) afin de le vérifier, et de quantifier le nombre moyen de molécules de PO-PEG recouvrant chaque nanoparticule.

⁴⁴⁶ M. Yu et al. Citrate-gel synthesis and luminescent properties of ZnGa_2O_4 doped with Mn^{2+} and Eu^{3+} . *Mater. Lett.* 2002, 56, 1007.

⁴⁴⁷ B. L. Frey et al. Vibrational spectroscopic studies of the attachment chemistry for zirconium phosphonate multilayers at gold and germanium surfaces. *Langmuir.* 1993, 9, 1815.

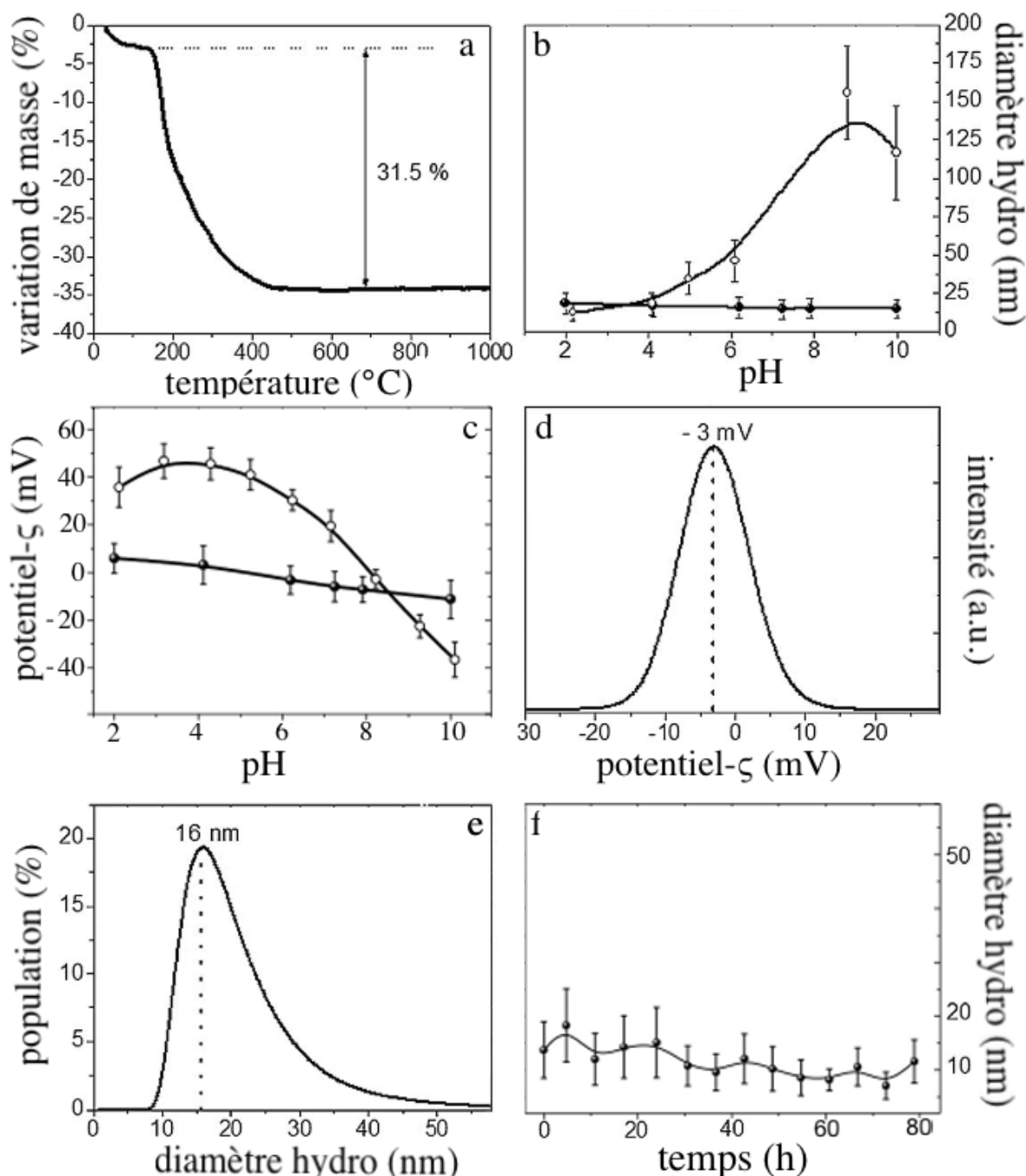


Figure 6.6. Caractérisations physico-chimiques des USNPLP. a) Analyse thermogravimétrique montrant la perte massique en fonction de la température. b-c) Analyse de DLS montrant l'évolution du diamètre hydrodynamique (b) ou du potentiel- ζ (c) moyen en fonction du pH pour les USNPLP nue (cercles vides) ou les USNPLP recouvertes de PO-PEG (cercles pleins). d-e) Distribution des potentiels- ζ (d) et des diamètres hydrodynamiques (e) des USNPLP recouvertes de PO-PEG sous conditions physiologiques ($T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$ et $[\text{Na}^+; \text{Cl}^-] = 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$). f) Stabilité à moyen-terme des USNPLP recouvertes de PO-PEG en conditions physiologiques, diamètre hydrodynamique en fonction du temps d'incubation.

Une perte de masse de 31,5% des USNPLP recouvertes de PO-PEG s'est avérée être attribuable aux groupes PO-PEG, ce qui correspond environ à 90 molécules par nanoparticule. Ce résultat est comparable à ce qui est décrit dans la littérature pour des USPIO de taille similaire.⁴⁴⁸ Ces résultats correspondent à une aire d'environ 79 \AA^2 par molécule de PO-PEG, soit 1,3 molécule par nm^2 .⁴⁴⁸ Cette haute densité en PEG peut être

⁴⁴⁸ T. J. Daou et al. Water soluble dendronized iron oxide nanoparticles. Dalton Trans. 2009, 4422.

utile pour une utilisation *in vivo* de ces nanoparticules si l'on veut éviter, ou du moins retarder, la capture par le système réticulo-endothélial.¹⁹⁸

Le diamètre hydrodynamique mesuré en fonction du pH montre l'intérêt de recouvrir les particules par du PO-PEG : celles-ci restent stables avec un diamètre hydrodynamique proche de 15 nm à tout pH, contrairement aux USNPLP nues (Figure 6.6.b). On observe le même effet de passivation et d'augmentation de la stabilité par recouvrement avec du PO-PEG en mesurant le potentiel- ζ en fonction du pH (Figure 6.6.c) : il reste proche de 0 mV (Figure 6.6.d) pour les particules recouvertes de PO-PEG. De plus, les USNPLP fonctionnalisées gardent un diamètre hydrodynamique stable autour de 16 nm dans des conditions physiologiques (Figure 6.6.e) pendant plusieurs dizaine d'heures (Figure 6.6.f) ce qui est un argument rassurant concernant leur utilisation dans des milieux biologiques.

iii. Propriétés de luminescence et utilisation *in vivo*

Les propriétés de luminescence des USNPLP ont tout d'abord été déterminées *in vitro* (Figure 6.7).

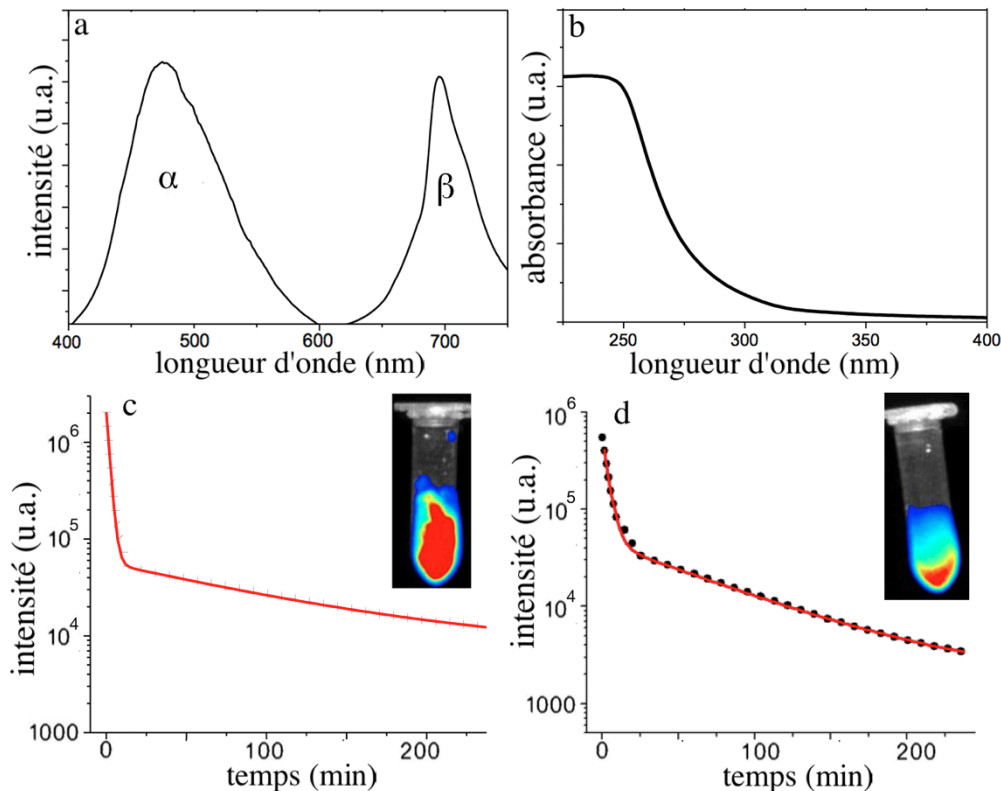


Figure 6.7. Propriétés optiques des USNPLP. a) Spectres d'émission d'USNPLP non dopées (courbe α) et dopées avec du chrome (III) (courbe β). b) Profil d'absorbance des USNPLP recouvertes de PO-PEG en solution. c-d) Déclins de luminescence des USNPLP sous forme de poudre (c) ou en solution, recouvertes de PO-PEG (d) après 2 min d'illumination UV (254 nm).

Les ZGO non dopés sont connus pour émettre dans le bleu (courbe α , Figure 6.7.a),⁴⁴⁹ tandis que le dopage avec du Cr³⁺ permet d'obtenir une émission dans la première fenêtre de transparence des tissus, autour de 700 nm (courbe β , Figure 6.7.a). Ils absorbent fortement dans les UV, via le gap du ZGO (Figure 6.7.b). Les Figures 6.7.c et 6.7.d présentent les déclins de luminescence des USNPLP nues sous la forme de poudres

⁴⁴⁹ T. Omata et al. New ultraviolet-transport electroconductive oxide, ZnGa₂O₄ spinel. Appl. Phys. Lett. 1994, 64, 1077.

ou recouvertes de PO-PEG et en solution, respectivement, après 2 min d'illumination UV. Les déclinés présentés dans les Figures 6.7.c et 6.7.d sont une superposition de deux cinétiques différentes, une qui est caractéristique d'une décroissance très rapide de la luminescence et une seconde qui correspond à un déclin plus lent. Nous avons observé cette luminescence pendant plusieurs heures, démontrant la possibilité de synthétiser des nanoparticules luminescentes de ZGO par synthèse micro-onde. Cependant, après illumination visible, la luminescence des USNPLP n'était pas détectable, ce qui est une limite importante à leur utilisation *in vivo* sans amélioration préalable.

Nous avons ensuite évalué la possibilité de suivre ces nanoparticules *in vivo* après illumination UV (Figure 6.8). Malheureusement, la luminescence des USNPLP recouvertes de PO-PEG après illumination visible n'était pas suffisante pour envisager une excitation *in vivo*. Une injection de 2 mg d'USNPLP n'a permis de suivre leur biodistribution en temps réel que pendant une dizaine de minute. Comme le montre les déclinés de luminescence de la Figure 6.7, la luminescence diminue très rapidement initialement. Si la lumière émise initialement est suffisante pour voir ces particules *in vivo*, elle devient rapidement trop peu intense pour être détectée plus d'une dizaine de minutes après l'injection.

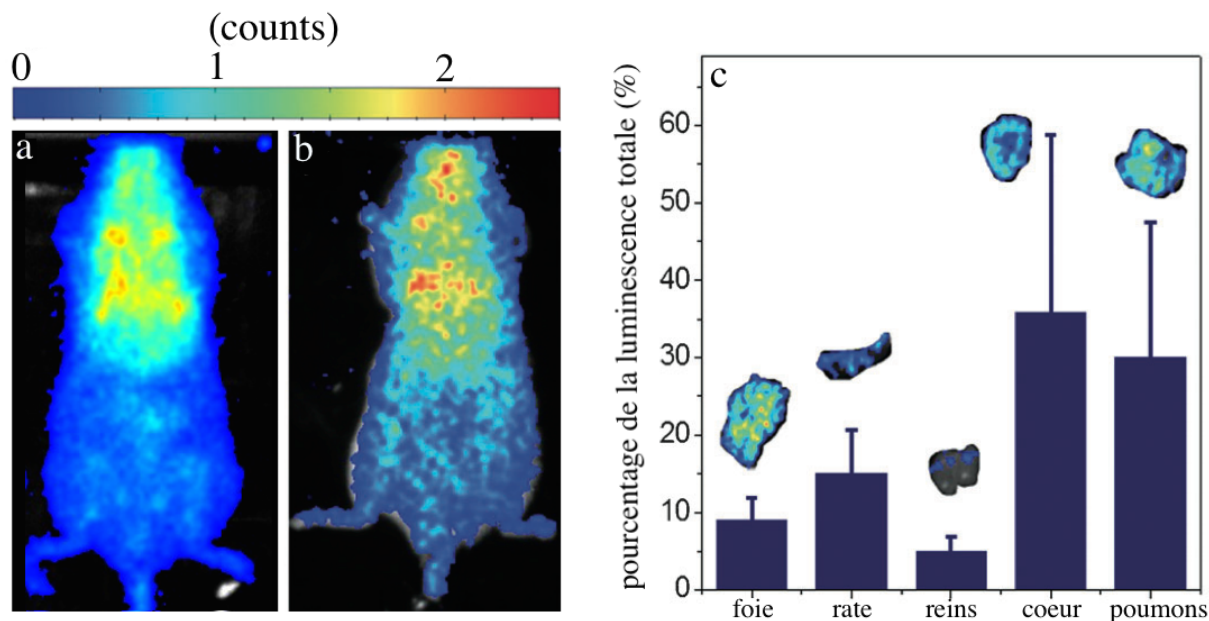


Figure 6.8. Imagerie *in vivo* des USNPLP recouvertes de PO-PEG. a-b) Luminescence *in vivo* indiquant la biodistribution typique de ZGO-PEG synthétisée par voie classique (hydrothermale + calcination) (a) ou d'USNPLP recouvertes de PO-PEG, juste après injection. c) Evaluation *ex vivo* de la biodistribution des USNPLP 6h après injection. La luminescence du foie, de la rate, des reins, du coeur et des poumons est normalisée par le poids de chaque organe et exprimée comme un pourcentage de la luminescence totale.

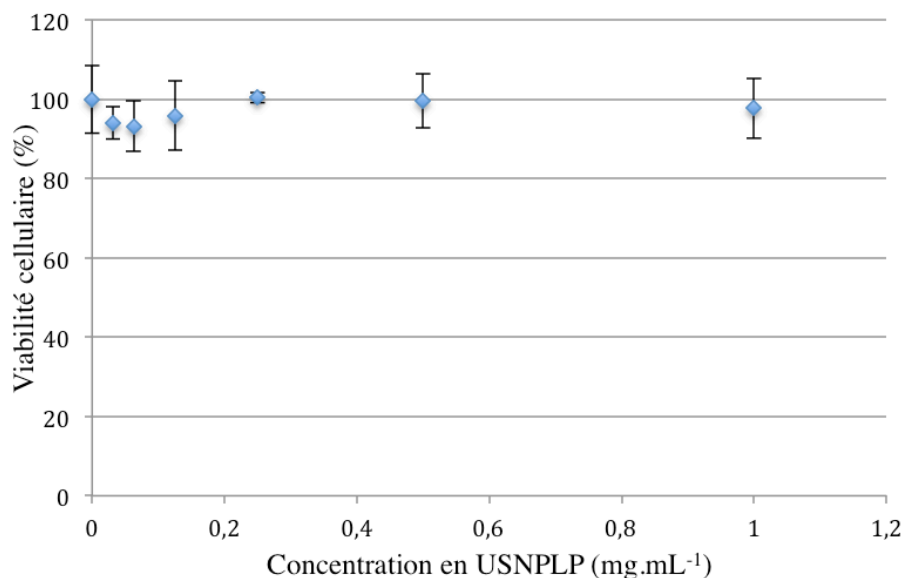
Durant les 10 min qui suivent l'injection des USNPLP, celles-ci ont une biodistribution similaire à celle des ZGO synthétisés par voie hydrothermale et calcination et fonctionnalisés avec du PEG.

Afin d'obtenir une information sur leur biodistribution à plus long-terme, il a fallu sacrifier les souris et illuminer les organes en utilisant une lampe UV, car l'illumination visible n'était pas efficace. Nous avons décidé de sacrifier les souris 6 h après injection, un temps qui correspond à peu près au temps de demi-vie des ZGO-PEG issus de la synthèse classique. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.8.c : on voit que

beaucoup de nanoparticules sont encore présentes dans le coeur, donc dans la circulation sanguine, suggérant une bonne furtivité et une capture hépatique et splénique limitée dans les premières heures qui suivent l'injection. Une limite de cette analyse est que les UV utilisés pour activer la luminescence des USNPLP ont une très faible capacité de pénétration dans les tissus vivants, car ils sont fortement absorbés. Or, le foie est un organe assez volumineux par rapport au coeur, il est plus dense et plus sombre que les poumons. A priori, cela limite fortement l'activation de la luminescence des USNPLP captées par le foie par rapport au coeur et aux poumons. La luminescence reçue du coeur, qui est représentative de celle du sang, nous permet donc uniquement de conclure qu'il reste des USNPLP recouvertes de PO-PEG dans la circulation sanguine 6h après injection.

iv. Toxicité

Une évaluation rapide de la toxicité de ces nanoparticules a été réalisée sur des cellules endothéliales de type EAHY pendant 24h (Graphique 6.10).



Graphique 6. 10. Test de cytotoxicité évalué avec le réactif MTT sur des cellules endothéliales EAHY incubées 24h avec différentes concentrations de USNPLP recouvertes de PO-PEG.

Les USNPLP recouvertes de PEG sont particulièrement stables en milieu physiologique et gardent une charge de surface proche de 0 mV, ce qui ne favorise pas leur internalisation par les cellules et peut expliquer l'absence de toxicité présentée dans le Graphique 6.10.

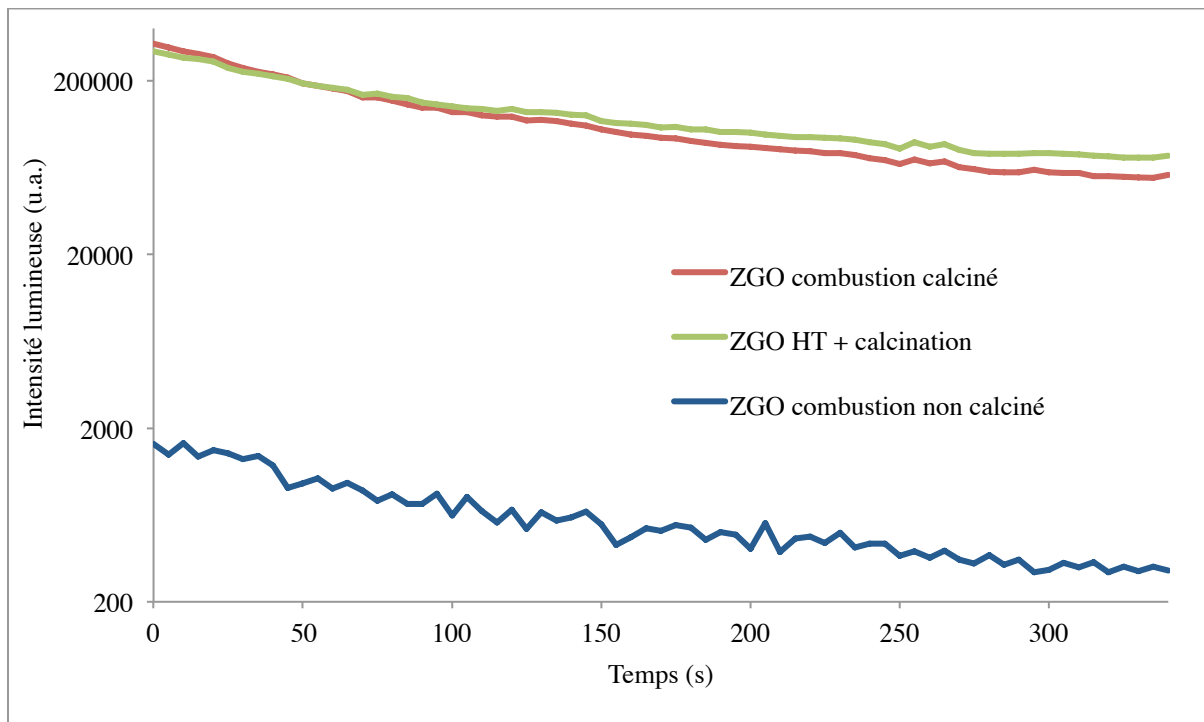
v. Conclusion

La synthèse non aqueuse de ZGO assistée par micro-ondes nous a bien permis d'obtenir en une étape rapide des nanoparticules à luminescence persistante avec une taille inférieure à 10 nm. Ces particules fonctionnalisées avec du PEG sont stables en solution favorisant leur utilisation *in vivo*. De plus, le spectre d'émission de luminescence persistante situé dans la première fenêtre de transparence des tissus est bien similaire à celui des ZGO synthétisés par voie classique, ce qui est nécessaire pour pouvoir faire de l'imagerie *in vivo*. En revanche, l'efficacité du phénomène de luminescence persistante ne permet pas de suivre les USNPLP aussi longtemps que les ZGO habituels, que ce soit après une illumination par rayonnements UV préalablement à l'injection, ou après une illumination visible.

b) Synthèse par combustion

Outre la synthèse assistée par micro-ondes, une voie de synthèse rapide, dite par combustion, est envisageable. Cette voie est déjà décrite dans la littérature, notamment pour la synthèse de nanoparticules d'oxydes luminescents.^{450,451} Une telle synthèse consiste à mélanger les réactifs dans un mélange d'eau et de comburant, les plus utilisés étant la carbohydrazide, la glycine ou l'urée. Un chauffage du mélange au bec bunsen permet d'obtenir une auto-ignition de la réaction et la formation d'un matériau à l'aspect mousseux.

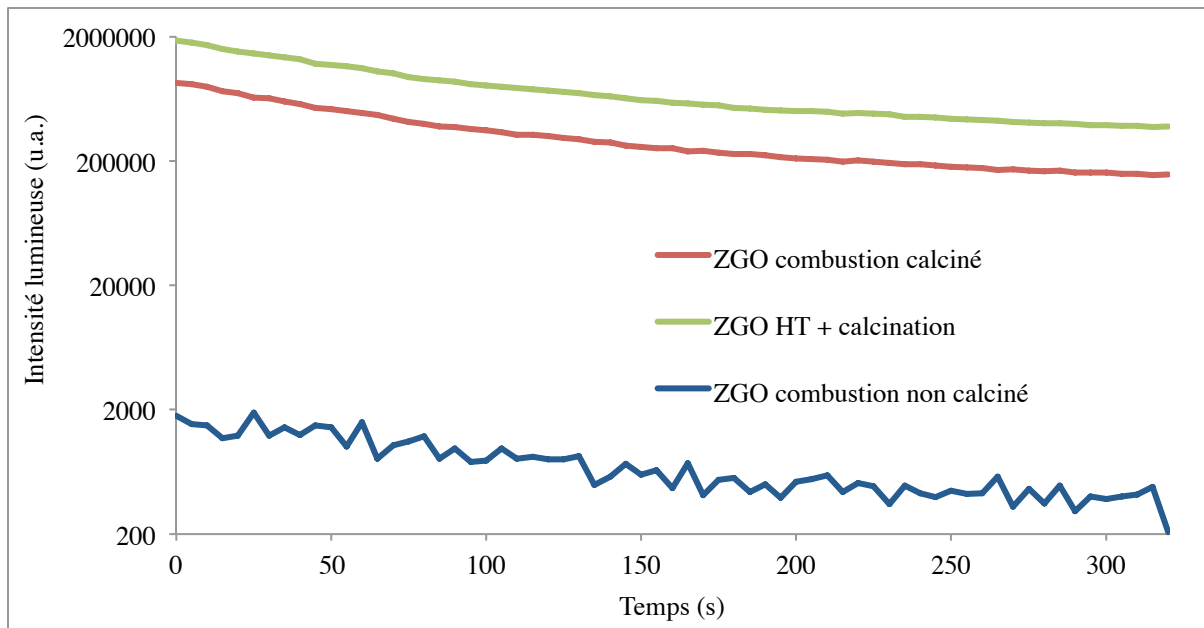
J'ai réalisé une telle synthèse en mélangeant des nitrates de zinc, de gallium et de chrome avec de la carbohydrazide avant de calciner la poudre obtenue pendant 5 h à 750°C, comme cela est réalisé après une synthèse hydrothermale classique. Les déclin de luminescence après illumination visible et UV sont donnés ci-dessous (Graphique 6.11 et 6.12, respectivement).



Graphique 6.11. Déclin de luminescence de ZGO synthétisé par différentes voies de synthèse. Synthèse par combustion, avant (courbe bleue) et après (courbe rouge) traitement thermique, comparés à celui de ZGO synthétisé par voie hydrothermale et calcination, après le même traitement thermique (ZGO HT + calcination, courbe verte). La luminescence a été activée par illumination avec une DEL orange.

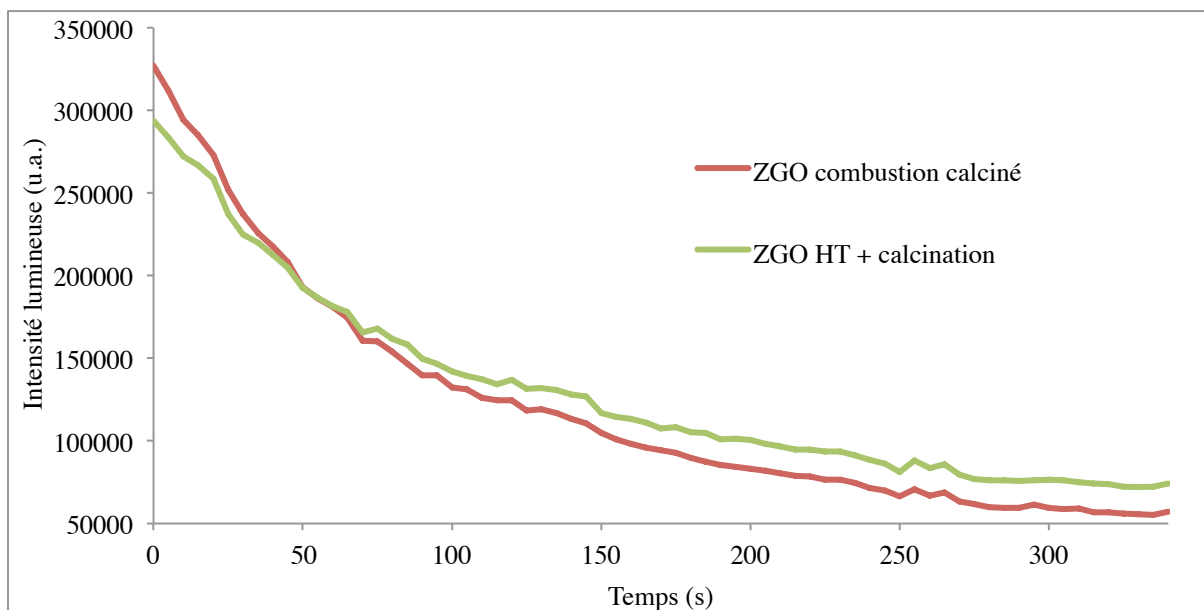
⁴⁵⁰ T. Ye et al. Combustion synthesis and photoluminescence of nanocrystalline Y2O3:Eu phosphors. Mater. Res. Bull. 1997, 32 (5), 501.

⁴⁵¹ J. McKittrick et al. The influence of processing parameters on luminescent oxides produced by combustion synthesis. Displays. 1999, 19, 169.



Graphique 6.12. Déclins de luminescence de ZGO synthétisé par différentes voies de synthèse. Synthèse par combustion, avant (courbe bleue) et après (courbe rouge) traitement thermique, comparés à celui de ZGO synthétisé par voie hydrothermale et calcination, après le même traitement thermique (ZGO HT + calcination, courbe verte). La luminescence a été activée par illumination UV.

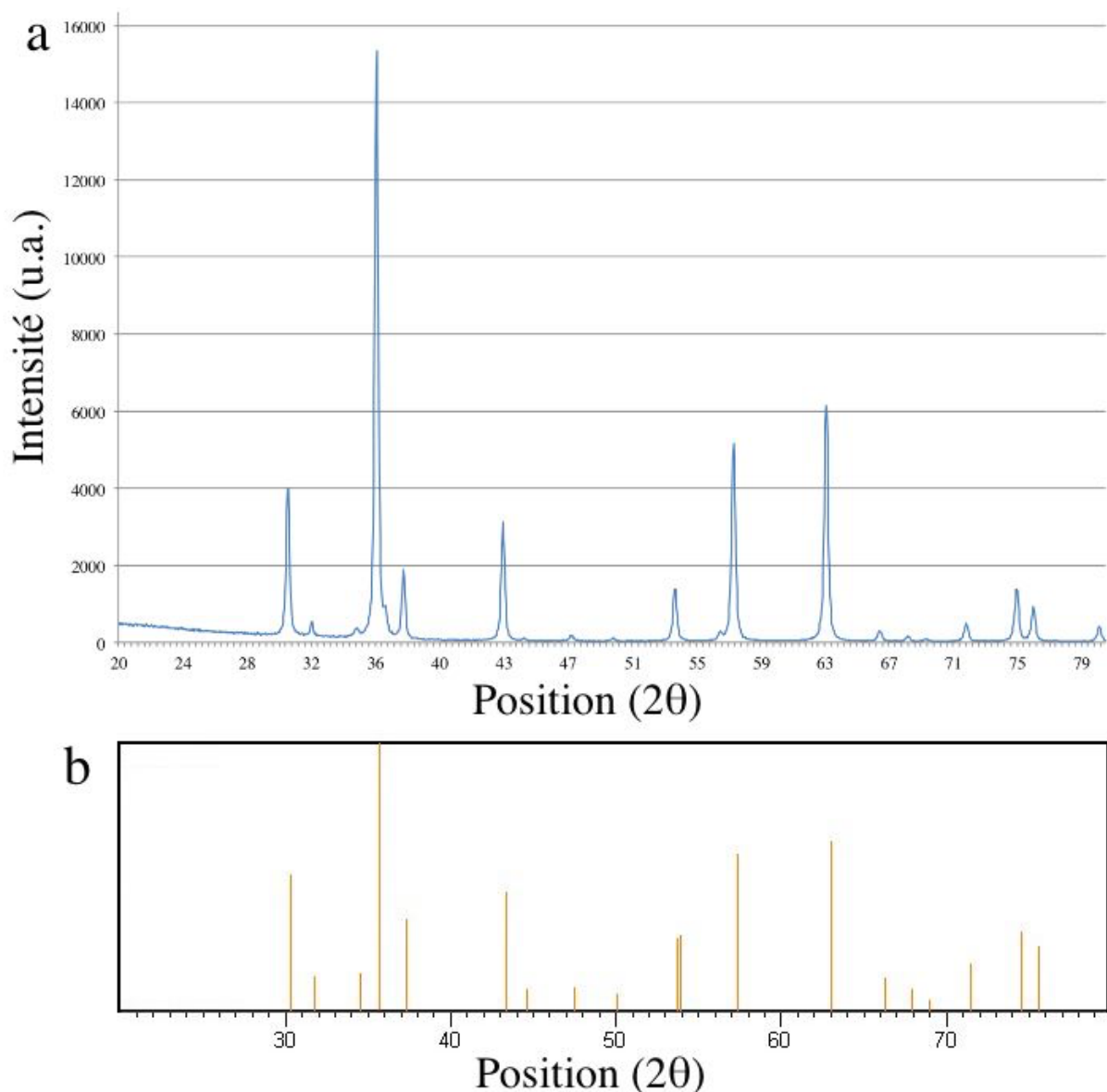
On voit que la luminescence du matériau obtenue après combustion est très faible (courbes bleues, Graphiques 6.11 et 6.12). En revanche, après un traitement thermique identique à celui réalisé après synthèse hydrothermal, la luminescence du ZGO synthétisé par combustion est proche de celle du matériau synthétisé par voie classique. S'il n'y a pas de différence de l'intensité de la luminescence persistante après illumination visible, celle du matériau obtenu par combustion est environ deux fois inférieure après illumination UV. De plus, une observation plus attentive des déclins de luminescence après illumination visible permet de remarquer une légère différence entre les deux voies de synthèse (Graphique 6.13).



Graphique 6.13. Déclins de luminescence de ZGO synthétisé par différentes voies de synthèse. Synthèse par voie hydrothermale et calcination (ZGO HT + calcination, courbe verte) ou par combustion (courbe rouge) après illumination visible.

Les déclin ne suivent pas la même cinétique, le ZGO synthétisé par combustion présente une luminescence qui décroît plus rapidement que celle du ZGO synthétisé par voie hydrothermale. Ce phénomène, associé à la différence de luminescence des deux matériaux après illumination UV, suggère que les populations de pièges responsables de la luminescence persistante ne sont pas identiques dans ces deux matériaux. Cela n'est pas surprenant, étant donné que deux voies de synthèses différentes vont probablement donner naissance à des distributions de défauts différentes dans la matrice cristalline obtenue.

Une expérience de diffractométrie de rayons X (DRX) a été réalisée afin de vérifier que le matériau synthétisé par combustion est bien de composition ZnGa_2O_4 , cristallisé sous la forme de spinelle normal (Graphique 6.14).



Graphique 6.14. Expérience de DRX. a) Diffractogramme expérimental du matériau obtenu après synthèse par combustion et traitement thermique. b) Diffractogramme théorique de ZnGa_2O_4 cristallisé en spinelle normal.

Le diffractogramme obtenu nous permet d'affirmer que cette synthèse par combustion a abouti à l'obtention d'un matériau similaire à celui obtenu par voie hydrothermale.

Ainsi, il est possible de synthétiser du ZGO luminescent en s'affranchissant de l'étape hydrothermale. Malgré ce gain de temps, il est nécessaire de réaliser un traitement thermique comme pour la synthèse classique. Il faut donc déterminer si cette voie de synthèse permet ou non d'obtenir des nanoparticules utilisables en suspension afin de réaliser de l'imagerie *in vivo*. Ces caractérisations n'ont malheureusement pas été réalisées, faute de temps.

c) Amélioration de la synthèse hydrothermale

Une troisième possibilité d'amélioration de la synthèse des ZGO concerne la modification de la voie de synthèse classique. Deux pistes ont été explorées : la modification des conditions de calcination des nanoparticules obtenue après l'étape hydrothermale et la modification des paramètres de l'étape hydrothermale.

i. Empêcher le frittage

L'étape de calcination est nécessaire à l'obtention de nanoparticules dont la luminescence est assez intense pour pouvoir être utilisées *in vivo*. Cependant, lors de cette étape se produit le phénomène de frittage qui lie les nanoparticules en contact les unes avec les autres. Or, avant calcination, les nanoparticules sont régulières, monodisperses et de petite taille tandis que cela aboutit à des nanoparticules plus grosses et irrégulières, rendant nécessaire la réalisation d'un broyage de la poudre obtenue suivi par une sélection des plus petites nanoparticules après centrifugation (Figure 6.9).

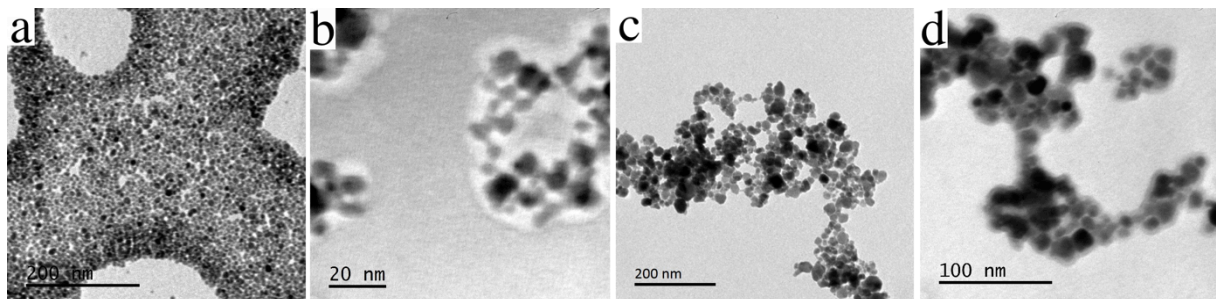


Figure 6.9. Images de MET de ZGO obtenus après traitement hydrothermal (a et b) ou après calcination et extraction (c et d), illustrant les différences de taille et de morphologie avant et après calcination.

Les zones floues autour des ZGO observés en MET à fort grossissement (Figure 6.9.b et d) sont dues à une instabilité du microscope ou à des effets de bords lors de l'observation. L'augmentation de taille en MET est corrélée à une augmentation du diamètre hydrodynamique moyen, évoluant de 16 à 50 nm suite au traitement hydrothermal (Graphique 8.11, Annexe III). Dans le but de réaliser une calcination en s'affranchissant du phénomène de frittage, l'équipe de Thierry Gacoin et Jean-Pierre Boilot du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée à Polytechnique a développé une méthode afin d'isoler les nanoparticules les unes des autres avant de procéder à un traitement thermique à haute température.^{452,453,454} Cette méthode consiste à figer les

⁴⁵² E. Allain et al. Transparent mesoporous nanocomposite films for self-cleaning applications. *Adv. Funct. Mater.* 2007, 17, 549.

⁴⁵³ G. Mialon et al. High temperature strategy for oxide nanoparticle synthesis. *ACS Nano.* 2008, 2 (12), 2505.

nanoparticules dans un gel de silice avant d'effectuer la calcination, puis de dissoudre le gel pour obtenir des nanoparticules ayant la même taille qu'avant inclusion dans la silice.

J'ai ainsi tenté d'adapter ce protocole à nos nanoparticules en réalisant cette synthèse de sol-gel avant calcination. J'ai bien obtenu un gel de silice contenant des nanoparticules de ZGO ($ZGO@SiO_2$) séparées les unes des autres (Figure 6.10.a) qui a subi deux traitements thermiques, un premier à $450^\circ C$ pendant 1 h afin d'éliminer le surfactant utilisé pour former la matrice mésoporeuse, et un second à $750^\circ C$ pendant 5 h.

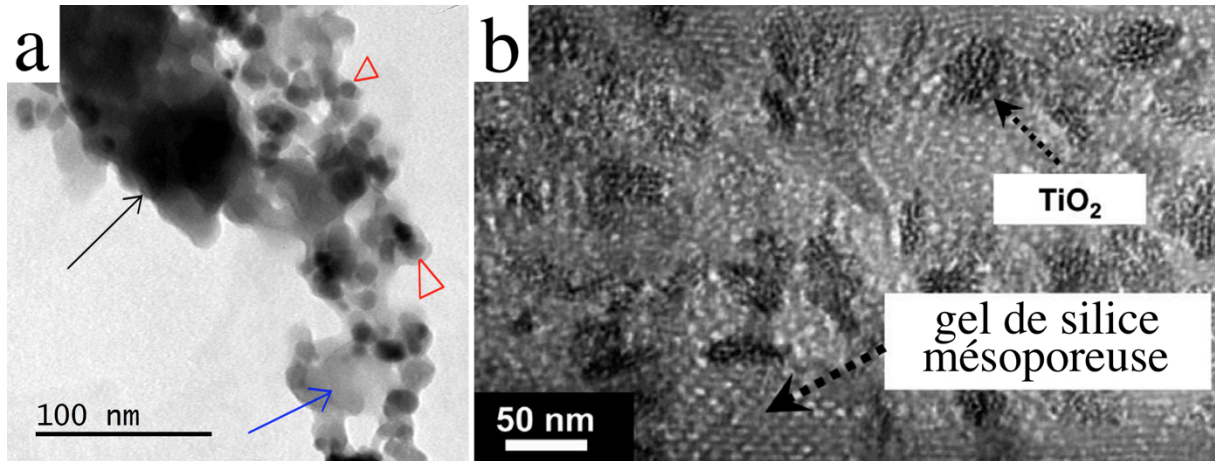
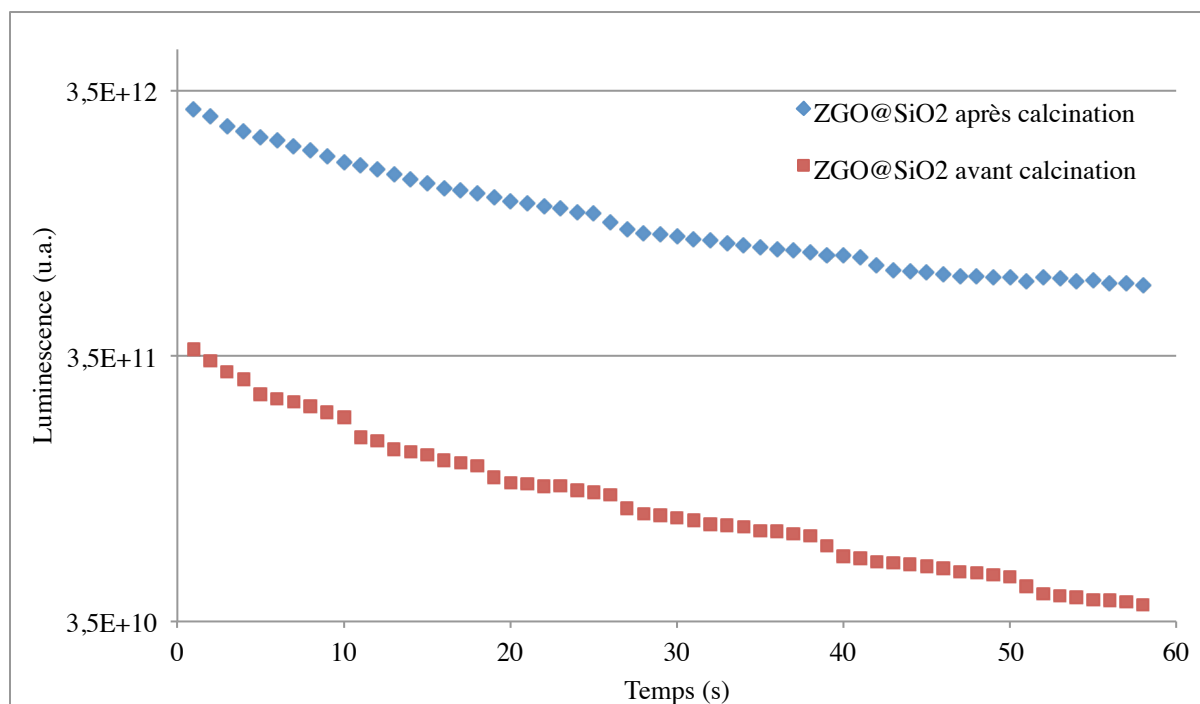


Figure 6.10. Nanoparticules incluses dans un gel de silice pour éviter le phénomène de frittage lors de la calcination. ZGO (a) et nanoparticules de TiO_2 (b) incluses dans la silice mésoporeuse suite à un procédé sol-gel et après calcination. (Adapté de 453)

On peut observer que le gel obtenu n'est pas aussi régulier que celui présenté dans la publication d'origine.⁴⁵² On peut observer des zones sans nanoparticules, avec uniquement de la silice (flèche bleue, Figure 6.10.a) ou des zones très sombres probablement issues d'aggrégats de ZGO (flèche noire, Figure 6.10.a). On distingue tout de même des nanoparticules isolées dans la silice après calcination (pointes de flèches rouges, Figure 6.10.a). La luminescence des $ZGO@SiO_2$ a été mesurée avant et après calcination afin de vérifier que ce traitement thermique permet bien d'obtenir des nanoparticules plus luminescentes (Graphique 6.15)

⁴⁵⁴ I. Maurin et al. A protected annealing process for the production of high quality colloidal oxide nanoparticles with optimized physical properties. J. Mater. Chem. C. 2013, 1, 13.



Graphique 6.15. Déclins de luminescence de ZGO@SiO₂ avant et après calcination 5 h à 750°C. Les déclins ont été enregistrés après 2 min d'illumination avec une DEL orange.

La luminescence augmente environ d'un facteur 10 suite à la calcination. Nous observons la même augmentation que lorsque nous calcinons une poudre de ZGO habituellement. Après cette étape, il est nécessaire de dissoudre sélectivement le gel de silice et d'obtenir des nanoparticules stables en solution. Le protocole utilisé par l'équipe de Thierry Gacoïn utilise de l'acide fluorhydrique concentré. Dans un premier temps, j'ai adapté ce protocole mais je n'ai jamais réussi à récupérer des nanoparticules luminescentes stables. Lorsque la réaction est réalisée pendant une durée trop importante, l'acide fluorhydrique semble dissoudre aussi les ZGO. J'ai tout d'abord tenté de redissoudre la silice en broyant le matériau dans de la soude à 5 mM et en laissant réagir à température ambiante pendant 24 h. Ces conditions sont celles habituellement utilisées avant de réaliser les extractions de ZGO. Mais la silice n'a pas pu être dissoute suite à cette étape (Figure 6.11.a et b). J'ai donc adapté un autre protocole consistant à broyer les ZGO@SiO₂ dans de la potasse à 1,8 mol.L⁻¹ avant de placer la suspension à 120°C pendant 12 h dans un réacteur en téflon (protocole obtenu au laboratoire Ressources et Matériaux pour une Monde Durable, à l'IRCP). Les particules obtenues ont été observées en MET (Figure 6.11.c).

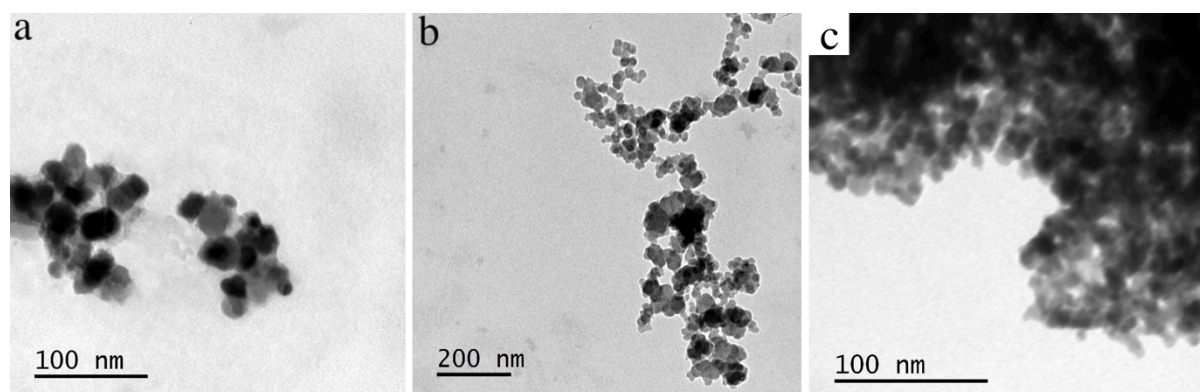


Figure 6.11. Images de MET de ZGO@SiO₂ traitées 24 h avec NaOH 5 mM à température ambiante (a et b) ou 12 h avec KOH 1,8 M à 120°C.

Le traitement dans NaOH 5 mM aboutit à des ZGO toujours liées les unes aux autres dans un gel de silice (Figure 6.11.a et b), tandis que la silice semble avoir disparu après traitement par KOH à 120°C (Figure 6.11.c). Cependant, dans ce dernier cas, il m'a été impossible d'observer des particules bien dispersées en dehors d'agrégat. Les mesures de diamètres hydrodynamiques ont confirmé ces observations car nous avons obtenu des valeurs moyennes de 296 et 376 nm pour les nanoparticules traitées avec NaOH 5 mM ou KOH 1,8 M, respectivement (Graphique 8.12, Annexe III) tandis que la synthèse habituelle suivie d'une extraction nous permet d'obtenir des valeurs proches de 80 nm.

Ainsi, bien que l'étape de gélification permettant de limiter le phénomène de frittage semble être facilement réalisable avec ces nanoparticules, je n'ai pas réussi à dissoudre sélectivement la silice pour obtenir des ZGO stables en suspension. Cette méthode reste tout de même intéressante et est d'ailleurs actuellement l'objet d'une thèse au Collège de France, sous la direction de Corinne Chanéac (du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris) dans le cadre d'un financement ANR.

ii. Optimiser les paramètres

Afin d'éviter le phénomène de frittage, il est envisageable de modifier les paramètres de l'étape hydrothermale afin de s'affranchir de l'étape de calcination. En effet, une publication récente a montré la possibilité d'améliorer la luminescence des ZGO en modifiant la synthèse hydrothermale que nous utilisons.⁴⁵⁵ Plusieurs paramètres sont différents dans leur cas : un excès de zinc est introduit initialement, le pH est ensuite ajusté à 9,5 au lieu de 7,5 et enfin l'étape hydrothermale est effectuée à 220°C au lieu de 120°C. Cela leur permet d'obtenir de petites nanoparticules dont les morphologies sont contrôlées par le ratio Zn/Ga (Figure 6.12) et dont la luminescence est a priori supérieure à celle des ZGO synthétisés selon notre voie de synthèse.

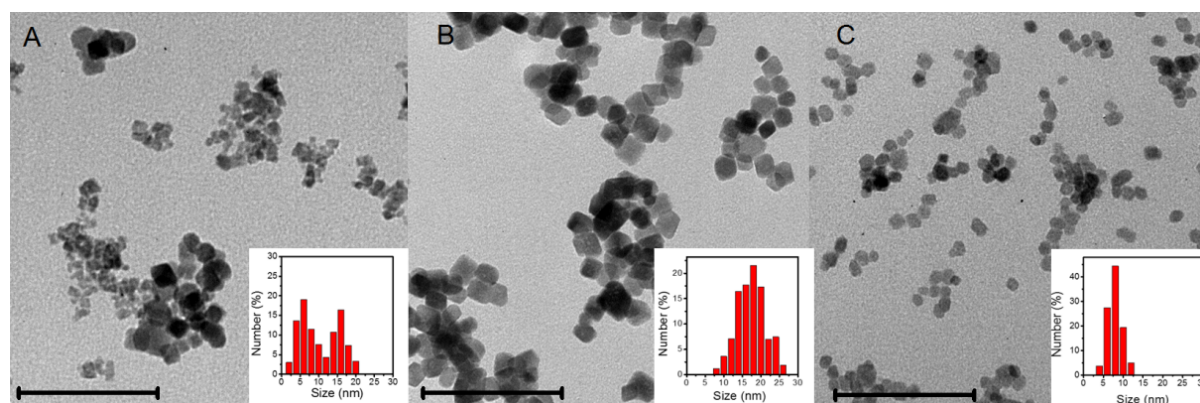


Figure 6.12. Perles lumineuses de ZGO avec différentes morphologies obtenues en faisant varier le rapport molaire Zn/Ga. Celui-ci a été fixé à 0,7/2 (A), 1/2 (B) et 2/2 (C) dans différentes expériences. (Adapté de 455)

Dans le cadre du stage de Master 2 de Maxime Rémond en 2015, nous avons réalisé des synthèses à 220°C en faisant varier le pH et la durée de l'étape hydrothermale. Les conditions testées sont résumées dans le tableau ci-dessous. Cependant, nous n'avons pas réalisé ces synthèses dans des conditions exactement identiques. Nous mélangeons par exemple les sels de zinc et de gallium dans de l'acide nitrique issue de l'attaque acide d'oxyde de gallium, tandis qu'ils lavent le nitrate de gallium afin d'éliminer l'excès d'acide nitrique.

⁴⁵⁵ Z. Li et al. Direct aqueous-phase synthesis of sub-10 nm "luminous pearls" with enhanced *in vivo* renewable near-infrared persistent luminescence. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137 (16), 5304.

Synthèse	pH	Zn/Ga	Durée	Taille en MET (nm)	Luminescence	
					Visible	UV
a	9,5	1	16 h	~20	=	=
b	9,5	2	16 h	~10	<<	<
c	9,5	2	24 h	~10	<	<
d	9,5	2	10 h	5-10	<<	<
e	10,5	2	10 h	10 et 50	=	<

Tableau 6.1. Résumé des synthèses réalisées en faisant varier les conditions de l'étape d'hydrothermale. La luminescence des nanoparticules obtenues après hydrothermale est comparée à celle des ZGO utilisés habituellement *in vivo*.

Globalement les nanoparticules obtenues sont moins luminescentes que celles que nous utilisons habituellement (les déclin de luminescence sont donnés dans les Graphiques 8.13 et 8.14 en Annexe III). Les images de MET permettent d'apprécier les différences morphologiques et de dispersité existant entre chaque synthèse (Figure 6.13)

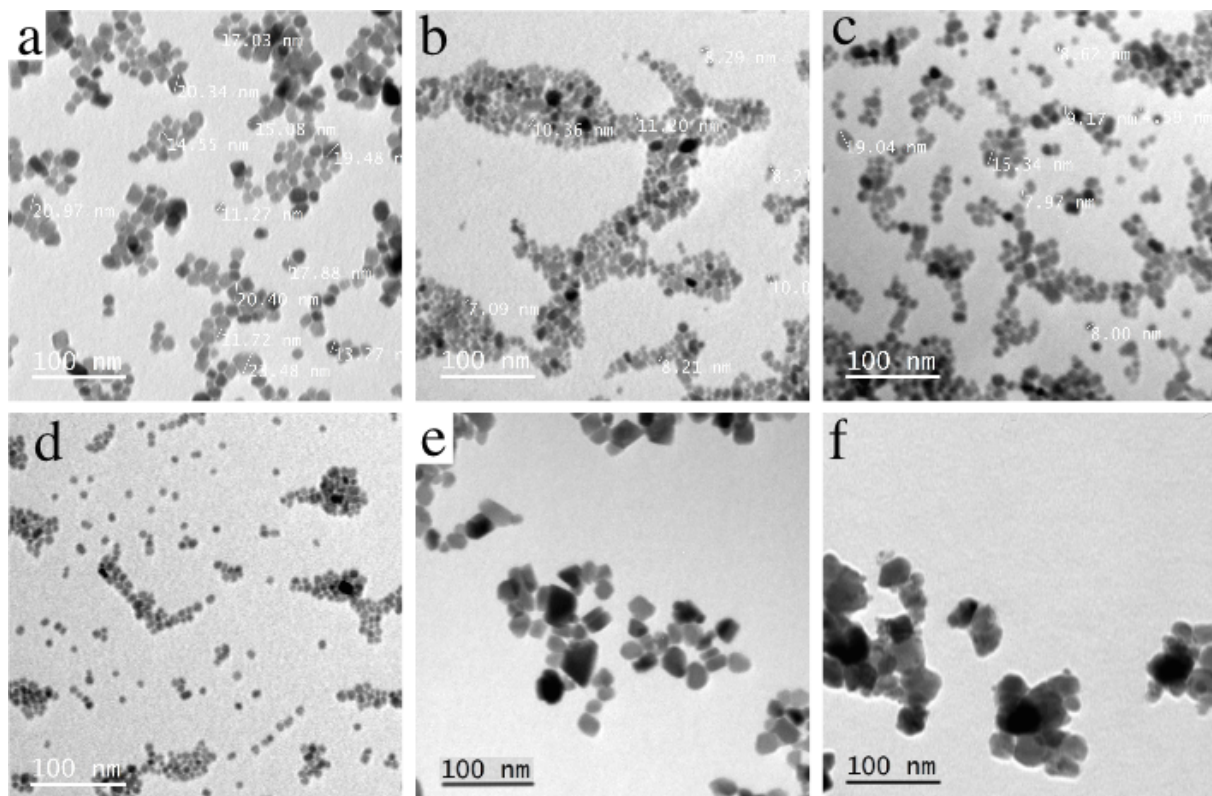


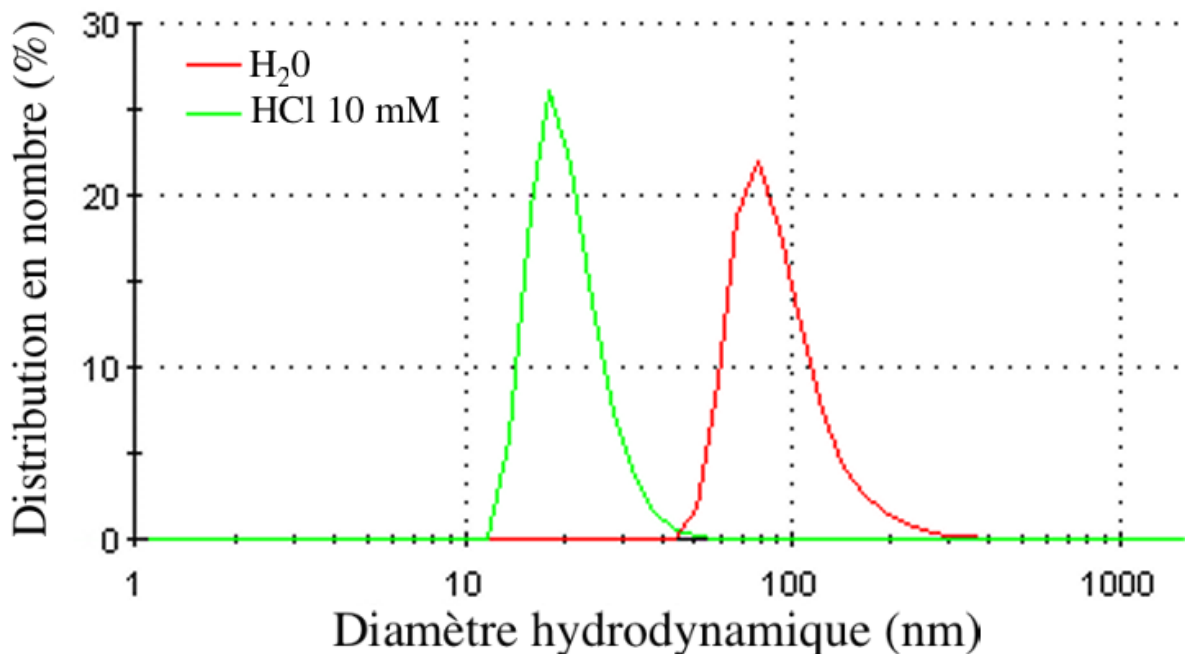
Figure 6.13. Images de MET de ZGO synthétisés avec différents paramètres lors du traitement hydrothermal. a-e) Les conditions de synthèse correspondent au données du Tableau 6.1. Ces ZGO sont observées en MET juste après l'étape d'hydrothermale. f) ZGO obtenus après traitement hydrothermal habituel, calcination à 750°C pendant 5 h et extraction des plus petites nanoparticules par centrifugation.

Pour les synthèses "a" à "d" (Tableau 6.1 et Figure 6.13.a, b, c et d), les ZGO obtenus sont de petites tailles et assez monodisperses. En revanche, la synthèse "e" (Figure 6.13.e) aboutit à des nanoparticules se rapprochant plus de ce que l'on obtient habituellement après broyage et extraction de ZGO calcinés 5 h à 750°C (Figure 6.13.f). Le seul paramètre qui change entre les synthèses "d" et "e" est le pH (respectivement 9,5 et 10,5).

On remarque aussi que les seules ZGO qui ont une luminescence proche des ZGO classiques sont ceux dont les tailles sont les plus élevées. Dans un cas, cela est dû au pH

(synthèse "e"), dans l'autre, le paramètre qui est modifié est le rapport Zn/Ga (synthèse "a"). Un excès de zinc semble donc en faveur de l'obtention de plus petites particules, mais celles-ci sont aussi moins luminescentes, contrairement aux résultats présentés dans la publication citée. De plus, des nanoparticules issues de la synthèse e ont une bonne luminescence après illumination visible mais une luminescence assez faible après illumination UV. Cela n'est pas dérangeant pour leur utilisation *in vivo* étant donné que c'est l'illumination visible qui est utilisée dans ce cas.

De plus, bien que les nanoparticules obtenues aient des diamètres proches de ceux de la publication en MET, les diamètres hydrodynamiques que nous avons obtenus sont bien supérieurs aux leurs dans des conditions identiques (Graphique 6.16).



Graphique 6.16. Distribution de tailles par mesures de DLS des ZGO obtenus en réalisant la synthèse "d", dont les conditions de l'étape hydrothermale sont identiques à celles de la publication 455. Ces mesures sont effectuées dans l'eau mQ (courbe rouge, H₂O) ou l'acide chlorhydrique 10 mM (courbe verte, HCl 10 mM).

Contrairement aux résultats de la publication citée, qui indiquent un diamètre hydrodynamique moyen de 9,3 nm en réalisant la mesure dans l'eau, nous obtenons un diamètre moyen de 93,2 nm dans l'eau, et ce n'est que dans l'acide chlorhydrique 10 mM que nous obtenons un diamètre hydrodynamique moyen de 20,7 nm.

Malgré ces difficultés à reproduire le travail publié par Li et al, une synthèse hydrothermale optimisée devrait peut-être nous permettre d'obtenir des nanoparticules de ZGO luminescentes, monodisperses et de faibles tailles en nous affranchissant des étapes de broyage et d'extraction. D'après les auteurs de cette publication, l'augmentation de la luminescence est principalement due au fait de ne pas avoir à réaliser de broyage du matériau, aboutissant à des nanoparticules irrégulières avec de nombreux défauts de surface pouvant atténuer la luminescence persistante (Figure 6.14).

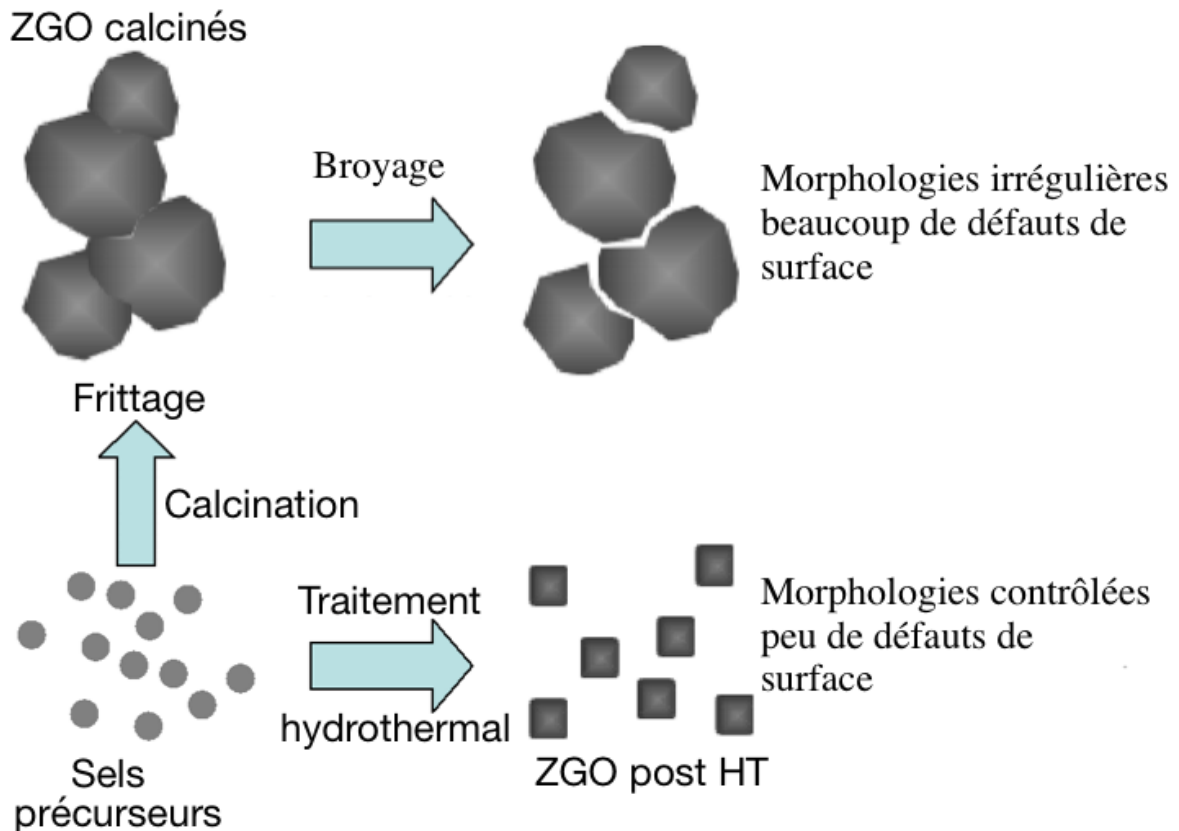


Figure 6.14. Représentation schématique des différences entre une synthèse uniquement hydrothermale et une synthèse effectuant un traitement thermique. (Adapté de 455)

d) Conclusion

De nombreuses pistes d'améliorations de la synthèse des ZGO utilisés ont été abordées, aussi bien pour changer radicalement de synthèse que pour améliorer la synthèse actuelle. Bien que la synthèse utilisée dans notre laboratoire reste aujourd'hui la synthèse initiale, de nouvelles synthèses sont en cours de développement selon une adaptation des résultats présentés ci-dessus en collaboration avec le LCMCP. En effet, dans le cadre de la thèse de Morgane Pellerin sous la direction de Corinne Chanéac, les nanoparticules sont synthétisées en utilisant une synthèse micro-ondes, suivie par un enrobage des NPLP obtenues dans de la silice avant calcination. Cela permet de faire varier plus facilement d'autres paramètres tels que les ions dopants utilisés dans le but d'augmenter la luminescence des matériaux obtenus. Une optimisation de la synthèse des ZGO devrait permettre d'aboutir à une synthèse plus rapide et plus pratique, présentant de meilleurs rendements, des nanoparticules plus luminescentes et dont les tailles et les morphologies sont mieux contrôlées. Enfin, les possibilités de contrôler la taille pour une même morphologie et inversement sont des opportunités supplémentaires pour mieux comprendre les mécanismes responsables de la luminescence persistante dans ces nanoparticules.

e) Section expérimentale

i. Synthèse des nanoparticules

Synthèse assistée par micro-ondes : les USNPLP sont synthétisés sous assistance micro-onde. 1,5 mmol de monohydrate de zinc(II)2,4-pentanedionate, 3 mmol de monohydrate de gallium(III)2,4-pentanedionate et $1,5 \cdot 10^{-2}$ mmol de monohydrate de chrome(III)2,4-pentanedionate sont dissous dans 15 mL d'alcool benzylique. Le tout est chauffé pendant 30 mn à 270°C dans un réacteur à micro-ondes (Monowave 300, Anton Paar, France). La suspension obtenue est centrifugée et le précipité est lavé à l'éthanol. Il est ensuite fonctionnalisé en le redispersant dans une solution aqueuse de PO-PEG (1 mmol.L⁻¹), puis le PO-PEG en excès est éliminé par ultrafiltration (Amicon 30kDa, Merck Millipore).

Synthèse par combustion : 672,4 mg de sulfate de gallium ($\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), 266,8 mg de nitrate de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1,79 mg de nitrate de chrome ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) et 608,9 mg de carbohydrazide ($\text{CH}_6\text{N}_4\text{O}$) sont dissous dans 2,5 mL d'eau mQ. La solution est placée à l'aide d'un bec bunsen pendant environ une minute. Après évaporation de l'eau, un mélange mousseux se forme et entre en combustion pendant quelques secondes, formant une substance blanchâtre très légère. Cette substance est ensuite calcinée pendant 5 h à 750°C.

Synthèse hydrothermale : les synthèses hydrothermales modifiées suivent le même protocole que celui que nous utilisons, en modifiant les proportions de réactifs initialement introduits, le pH obtenu avant l'étape d'hydrothermale et en réalisant cette étape à 220°C pendant des durées variables.

ii. Synthèse et calcination des gels de silice

Les gels de silice sont synthétisés en adaptant un protocole de la littérature.⁴⁵³ Typiquement une des ZGO issus de l'étape hydrothermale correspondant à 0,56 mmol de zinc, dispersés dans 2 mL d'eau mQ sont mélangés à une solution d'acide polyacrylique (PAA, masse moléculaire 1800 g.mol⁻¹) dans 0,1 mL d'une solution aqueuse d'ammoniac à 0,03 % (50,4 mg soit 28 μmol de PAA) afin d'obtenir un ratio molaire final Zn:PAA de 1:0,05. Parallèlement, un mélange de 3,13 mL d'acide chlorhydrique 0,1 M, 625 μL de TEOS et 2,37 mL d'éthanol absolu est réalisé et placé 1 h à 60°C. Ces proportions sont calculées afin d'obtenir un ratio final Zn:Si de 1:5. Une solution d'acide pluronique F-127 à 40,4 g.L⁻¹ dans l'éthanol est préparée afin que le ratio final Zn:F-127 soit de 1:0,05. La solution de TEOS est ajoutée à celle contenant les nanoparticules, puis la solution de F-127 est ajoutée. Après homogénéisation, le tout est placé à 90°C pendant 5 h afin d'obtenir un gel de silice. Ce gel est calciné une première fois 1 h à 450°C puis 5 h à 750°C.

iii. Caractérisation des nanoparticules

Les spectres FTIR sont enregistrés sur des tablettes de KBr (Nicolet 380 FTIR, Thermo Fisher Scientific, USA), l'absorption est donnée en fonction du nombre d'onde (cm⁻¹). Les diamètres hydrodynamiques et potentiels ζ des particules obtenues ont été déterminés par DLS sur un appareil Nano-ZS (Red Badge, ZEN 3600, Malvern Instruments, UK). Les images de MET sont réalisées en utilisant un microscope FEI CM10 (Philips), celles de MET haute résolution sur un microscope à transmission JEOL ARM 200F équipé avec un correcteur d'aberration Cs pour l'objectif et d'un FEG froid. La quantification des molécules recouvrant les nanoparticules est réalisée par analyse thermogravimétrique sur un appareil LabsSys evo TG-DTA-DSC 16000 (Setaram Instrumentation, France). La

fluorescence est mesurée sur un spectrofluorimètre SpexFluoroMax (HORIBA Jobin-Yvon, France) équipé avec un photomultiplicateur Hamamatsu 928.

iii. Déclins de luminescence

Voir Partie IV, p. 135.

iv. Acquisitions de luminescence *in vivo*

Voir Partie IV, p. 137.

v. Etudes *ex vivo*

Différents organes (foie, rate, reins, coeur, poumons) ont été prélevés après euthanasie des souris (n=3) par dislocation cervicale, 6h après injection des nanoparticules. Deux minutes d'illumination UV ont permis d'activer les particules et d'enregistrer un signal et de quantifier la luminescence de chaque organe. Celle-ci est normalisée par le poids de l'organe et exprimée en pourcentage de la luminescence totale (1 coup = $1,2 \cdot 10^6$ ph.s⁻¹.cm⁻².sr⁻¹). La semi-quantification a été réalisée à l'aide du logiciel M3Vision (Biospace Lab, France).

vi. Tests de cytotoxicité

La lignée cellulaire ayant servi aux tests de cytotoxicité est celle de cellules endothéliales murines EAHY, cultivées dans du DMEM complété avec du sérum de veau foetal (10% en volume) et 1% de pénicilline/streptomycine, dans une atmosphère à 5% en CO₂ et à 37°C. Les cellules sont déposées sur des plaques 96 puits (Falcon, Strasbourg, France) à une densité de $3 \cdot 10^4$ cellules par puits dans du milieu complet pendant 24 h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu complet contenant des concentrations croissantes d'USNPLP et 24 h plus tard celui-ci est enlevé et du milieu complet contenant 0,5 mg.mL⁻¹ de MTT est ajouté pendant à 37°C pendant toute la nuit. Le milieu est de nouveau enlevé et les cristaux de formazan sont dissous par ajout de DMSO. Enfin après 15 min les surnageants sont transférés dans une plaque propre pour éviter la perturbation du test par la présence de nanoparticules au fond des puits. L'absorbance lue à 562 nm en utilisant un lecteur de plaque Infinite F2000 Pro (TECAN Instruments, Suisse) a permis de déterminer la viabilité cellulaire dans chacune des conditions.

VII. CONCLUSION GENERALE

Le travail présenté dans cette thèse fait suite à deux thèses réalisées au sein du laboratoire, pendant lesquelles de nouvelles sondes d'imagerie optique ont pu être développées. Grâce à leur propriété de luminescence persistante activable dans la première fenêtre de transparence des tissus, il est possible de suivre ces sondes en temps réel et à long terme *in vivo* avec une bonne sensibilité.

Dans le cadre d'une collaboration avec trois autres laboratoires, le projet ODICEO avait pour but de développer de nouvelles nanoparticules pouvant être utilisées comme marqueurs biologiques multimodaux associant imagerie optique et IRM. Ces marqueurs devaient nous permettre de suivre un recrutement cellulaire en vue de mieux comprendre le rôle et le comportement de cellules ayant un potentiel thérapeutique dans des modèles d'ischémie des membres inférieurs ou du myocarde. Le travail effectué pour le projet ODICEO a pris une place importante dans mon travail de thèse que nous pouvons résumer en trois parties :

- la synthèse d'une gamme de nanohybrides superparamagnétiques à luminescence persistante et leur caractérisation physico-chimique.

- la compréhension des biais rencontrés lors de l'évaluation de la toxicité avec des tests couramment utilisés, suivie de la détermination de conditions permettant de vectoriser des cellules à potentiel thérapeutique avec les nanohybrides précédemment décrits.

- l'exploration de nouvelles pistes de réflexion dans le but d'améliorer les matériaux utilisés et afin de tenter de répondre à certains phénomènes surprenants observés lors des travaux décrits ci-dessus.

La première partie de cette thèse a donc été consacrée à la description de nouveaux hybrides associant des nanoparticules à luminescence persistante à des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dans une matrice de silice mésoporeuse. Suite à une caractérisation complète de leurs propriétés physico-chimiques en solution, leurs propriétés de luminescence, de porosité et de magnétisme, une preuve de concept de leur utilisation *in vivo* a été réalisée. Ces hybrides peuvent ainsi être suivis en imagerie optique en temps réel et en IRM avec une haute résolution spatiale. Cette preuve de concept n'a été réalisée qu'en observant l'accumulation de ces hybrides dans le foie et la rate.

Il serait intéressant d'évaluer la possibilité de cibler d'autres organes ou des zones d'intérêt telles que des tumeurs en fonctionnalisant ces nanohybrides avec des ligands ciblant des cellules cancéreuses tels que des peptides RGD ou de l'acide folique. Une perspective pourrait être de tenter de modifier leur biodistribution *in vivo* avec un aimant afin d'évaluer, par exemple, la possibilité d'augmenter leur accumulation passive ou active dans des tumeurs.

Ces premiers résultats ont permis d'envisager l'utilisation de ces nanohybrides afin de marquer et suivre des cellules ayant un intérêt thérapeutique. Mais, dans un premier

temps, il a été nécessaire de démontrer la possibilité de marquer des cellules avec nos nanoparticules. Puis, un protocole permettant d'évaluer la viabilité cellulaire après un tel marquage a dû être décrit en évitant l'écueil que représente la présence de nanoparticules lors des tests utilisés. Nous avons pu constater que plusieurs tests de viabilité cellulaire ont donné des résultats très différents. Cependant, nous avons formulé des hypothèses afin d'expliquer ces différences et de valider une condition de marquage efficace pour le suivi des cellules utilisées en imagerie.

Ces conditions ont ensuite permis de réaliser de la vectorisation cellulaire magnétique suivie en temps réel chez la souris. La biodistribution de cellules a été significativement modifiée en quelques minutes après injection intra-péritonéale. Le suivi en temps-réel n'a été réalisé qu'en imagerie optique et pour une quantité de cellules donnée ainsi qu'un seul type d'aimant. Il serait intéressant d'observer le site d'accumulation des cellules marquées après accumulation à proximité de l'aimant en IRM et de suivre ces cellules à plus long terme. De plus, utiliser un aimant plus puissant devrait permettre de modifier la distance efficace de vectorisation magnétique. Ces résultats ouvrent des perspectives concernant la possibilité de contrôler la biodistribution de cellules ayant un effet thérapeutique. Il serait intéressant d'évaluer l'impact d'une telle vectorisation sur l'efficacité d'une thérapie cellulaire.

Les résultats obtenus *in vivo* ont soulevé des questions, les premières concernant le devenir à long-terme des particules injectées. Des expériences permettant de montrer que les hybrides synthétisés se dégradent dans des modèles de milieux biologiques sont une première étape vers une meilleure compréhension de l'interaction de nanoparticules hybrides avec le milieu intracellulaire et les risques de toxicité chronique. De plus, ces questions concernant la toxicité chronique sont à étudier parallèlement à leur toxicité aiguë. Nous avons vu que certains problèmes vraisemblablement liés à la taille ou la stabilité colloïdale des nanohybrides pouvaient provoquer une toxicité aiguë majeure après injection intraveineuse.

Plus éloignée des applications biologiques, l'étude des propriétés de luminescence de ces nanohybrides s'est avérée complexe et représente une piste de réflexion non négligeable dans le but de mieux contrôler ces phénomènes de luminescence persistante.

Enfin, des perspectives concernant la synthèse de nanoparticules à luminescence persistante plus lumineuses, plus petites ou aux morphologies mieux contrôlées ont été données en présentant d'autres voies de synthèses : la synthèse micro-ondes, la synthèse par combustion ou une synthèse hydrothermale modifiée. Il est envisageable qu'une synthèse optimisée aboutisse à l'obtention de nanoparticules très lumineuses dont le diamètre serait assez faible pour observer une clairance rénale. De plus, on peut envisager que de petites nanoparticules lumineuses permettraient de synthétiser des nanohybrides plus petits, n'entraînant pas la toxicité aiguë observée.

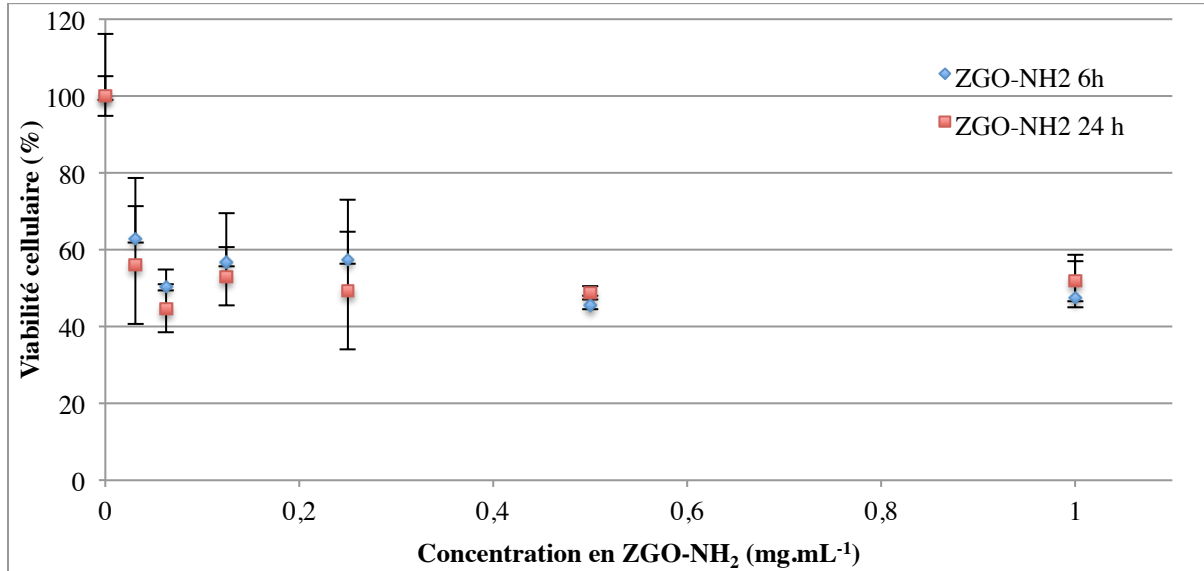
Les modifications des nanoparticules lumineuses utilisées peuvent aussi s'étendre à la composition du matériau. Cela peut être une optimisation des dopants utilisés afin d'augmenter l'intensité de la luminescence ou même un changement de matrice afin d'utiliser un matériau biocompatible, potentiellement moins toxique. Nous avons aussi cité quelques travaux utilisant des nanoparticules pour faire de l'imagerie optique dans la seconde fenêtre de transparence des tissus, avec une résolution spatiale bien supérieure à celle obtenue dans la première fenêtre. Le développement de nanoparticules à luminescence persistante émettant dans la seconde fenêtre me

semblerait être une avancée prometteuse pour l'utilisation de la modalité optique en imagerie préclinique.

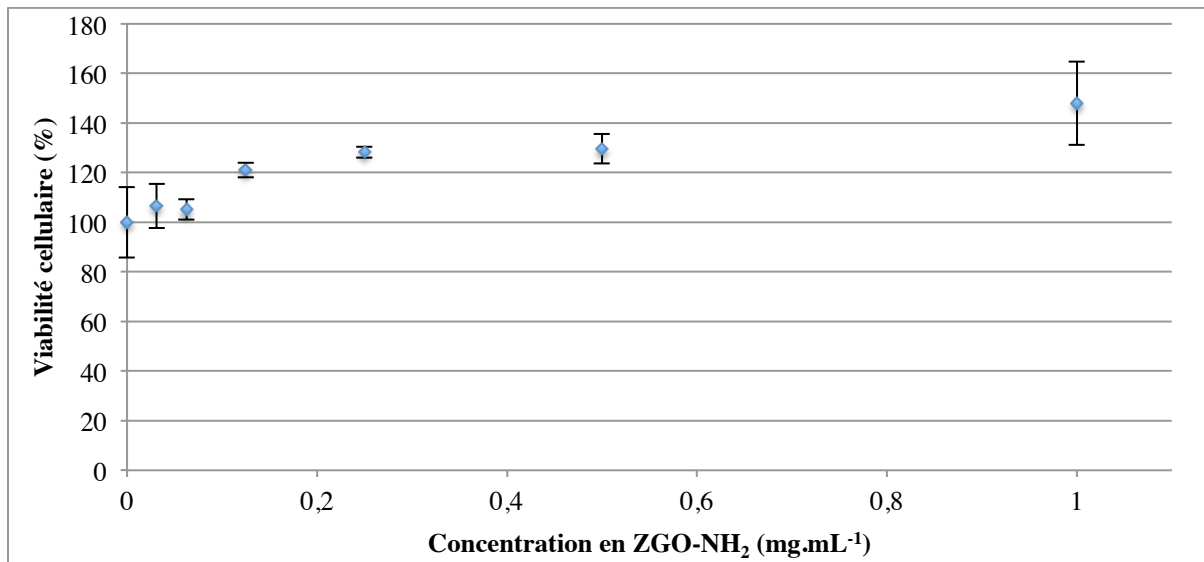
Les domaines abordés au cours de ce travail de recherche initialement basé sur l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistante ont nécessité de faire appel à des disciplines scientifiques variées. Cette pluridisciplinarité très souvent présente en nanosciences, où la chimie et la physique des matériaux peuvent rencontrer la biologie et la recherche préclinique, me semble être un atout important pour aller vers une meilleure compréhension de phénomènes complexes étudiés dans toutes ces disciplines.

VIII. ANNEXES

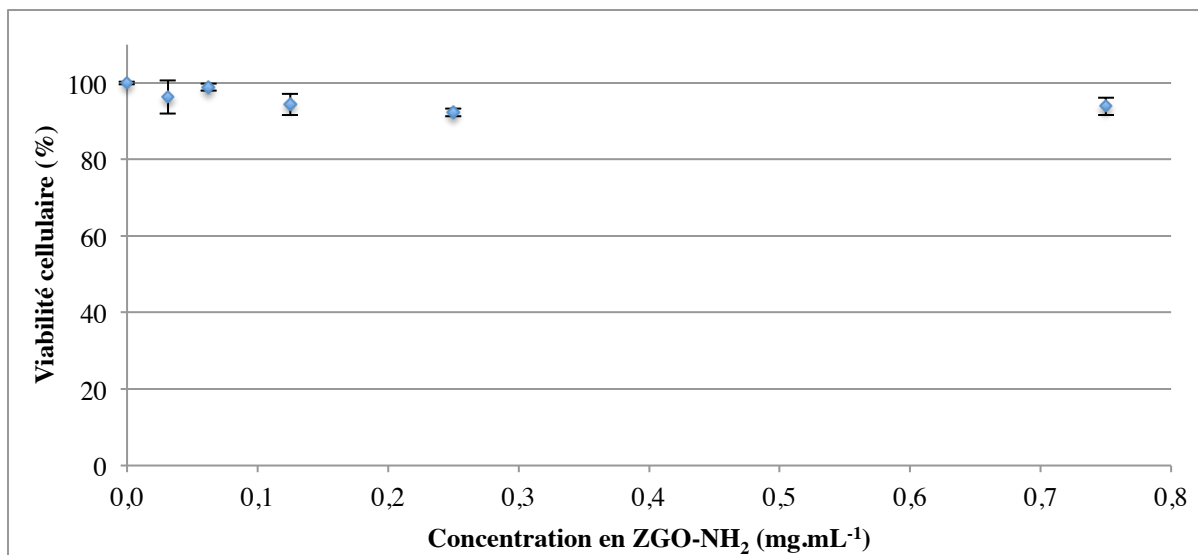
Annexe I : tests de toxicité



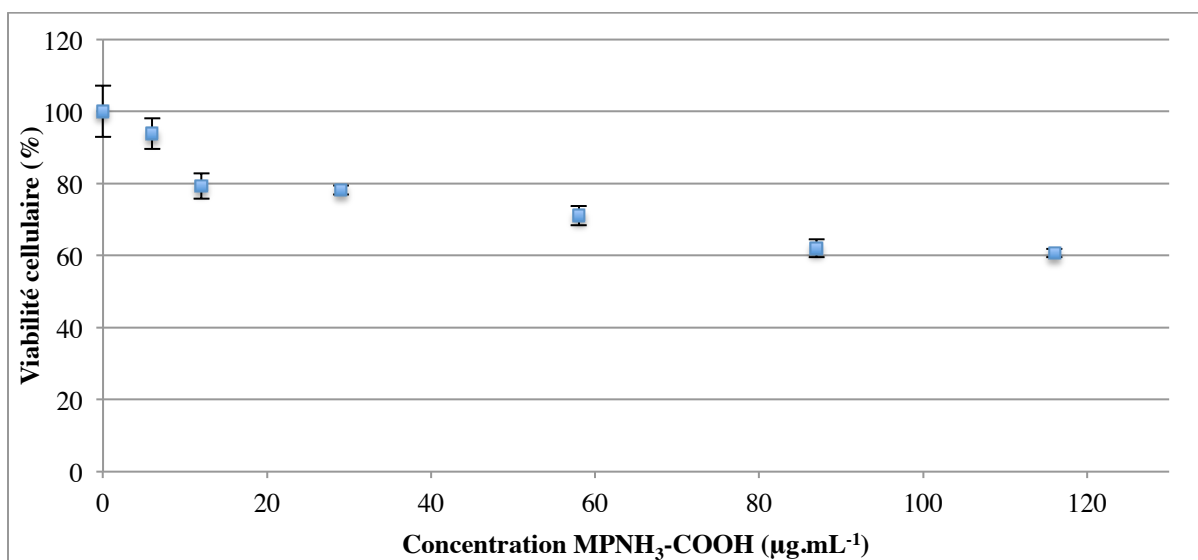
Graphique 8.1. Tests MTT réalisés sur des CSM ayant incubé 6 ou 24 h avec des ZGO-NH₂. La lecture de l'absorbance a été réalisée en prélevant la moitié du surnageant et en le transférant dans une plaque propre.



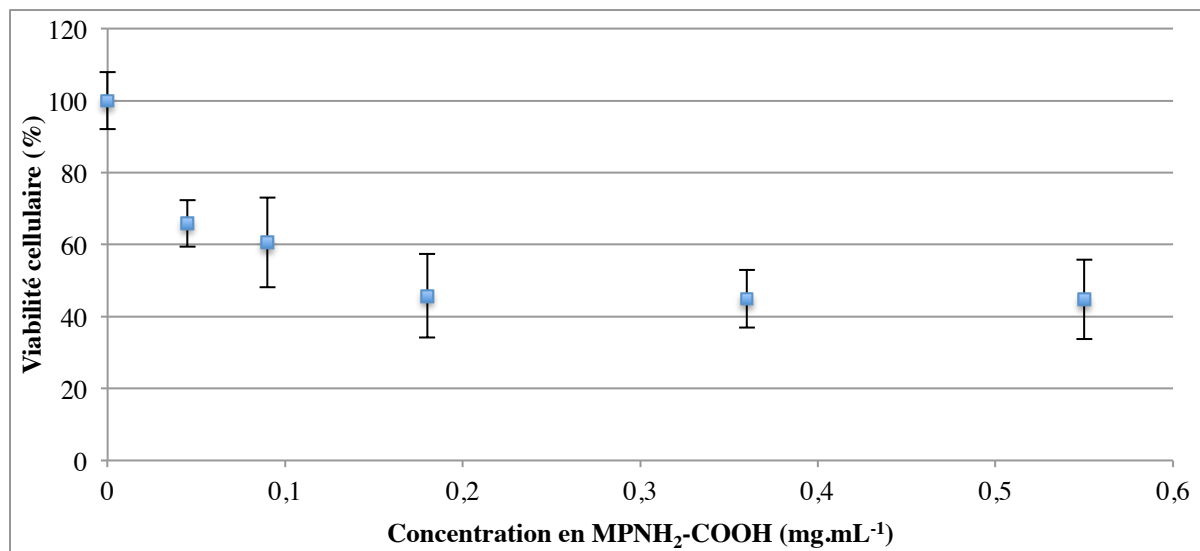
Graphique 8.2. Test WST-8 réalisé sur des CSM ayant incubé 6 h avec des ZGO-NH₂. La lecture de l'absorbance a été réalisée en prélevant la moitié du surnageant et en le transférant dans une plaque propre.



Graphique 8.3. Tests AB réalisés sur 10⁴ CSM ayant incubé 24 h avec des ZGO-NH₂. La mesure de la fluorescence a été réalisée 4 h après dépôt du réactif AB dans les puits.

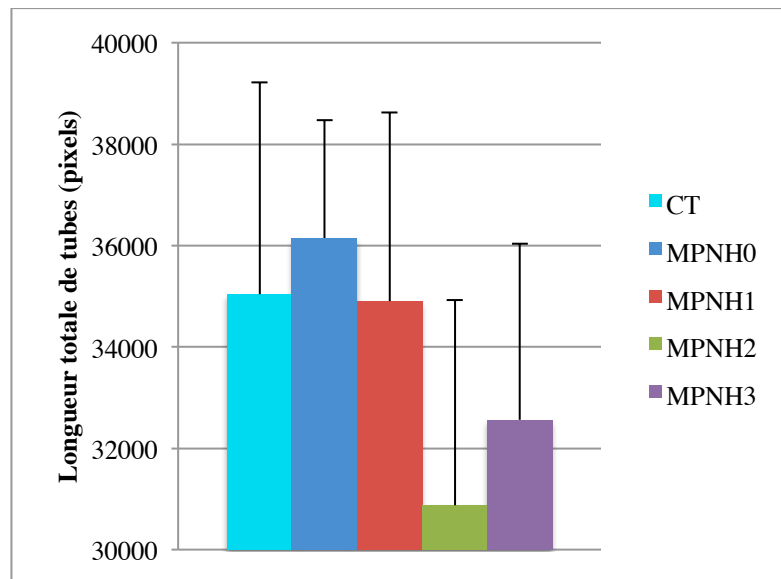


Graphique 8.4. Tests MTT réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 h avec de faibles concentrations de MPNH₃-COOH (n = 2).

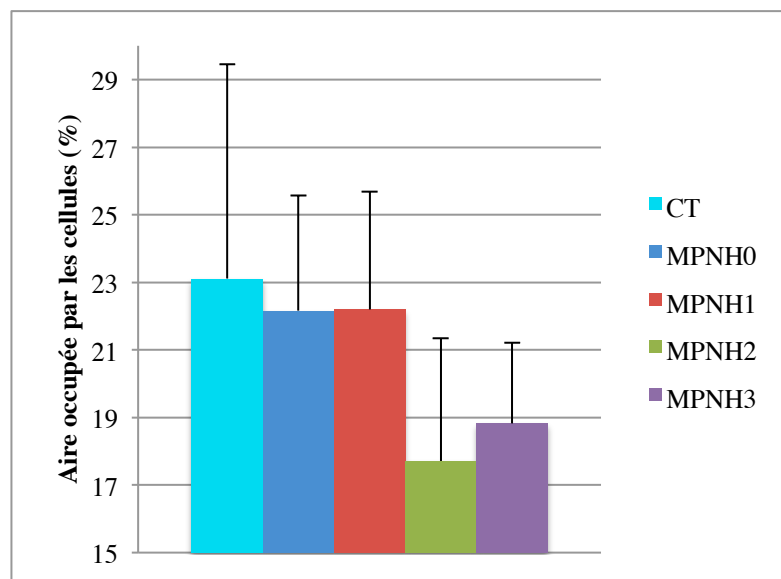


Graphique 8.5. Tests MTT réalisés sur des ECFC ayant incubé 6 h avec des MPNH₂-COOH (n = 2).

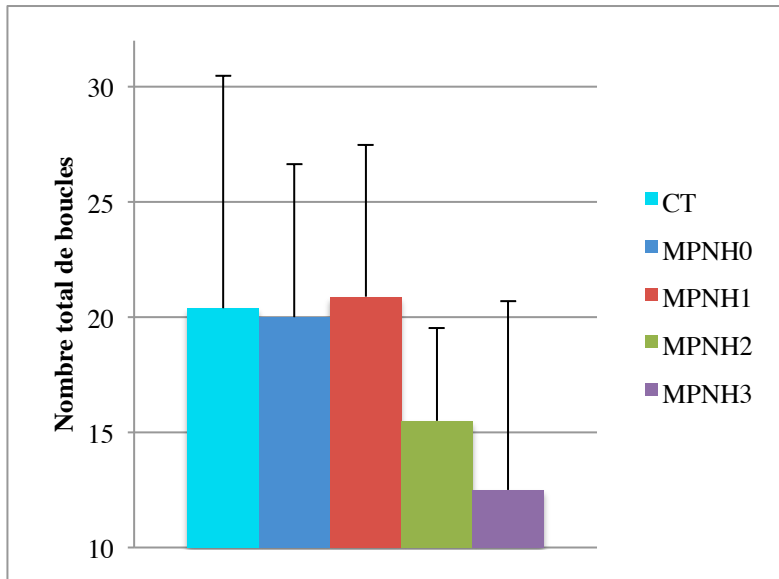
Annexe II : caractérisation des ébauches vasculaires



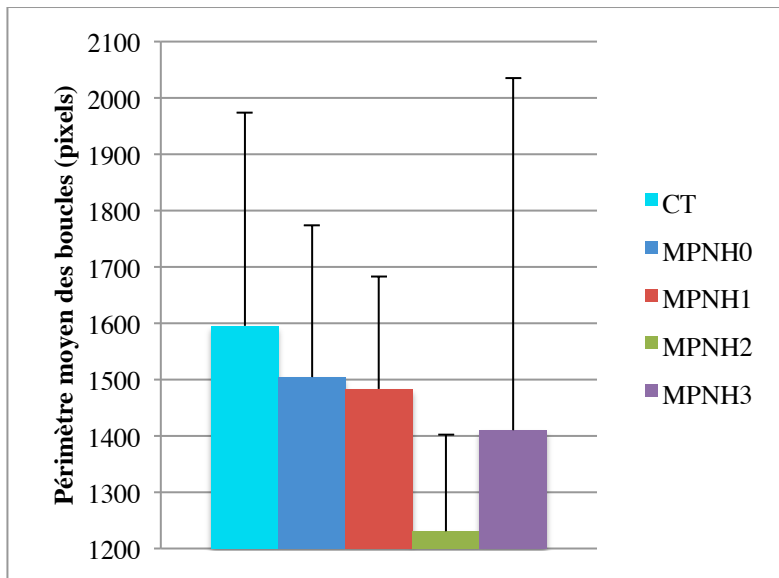
Graphique 8.6. Longueur totale des tubes formés par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH déposées sur du matrigel.



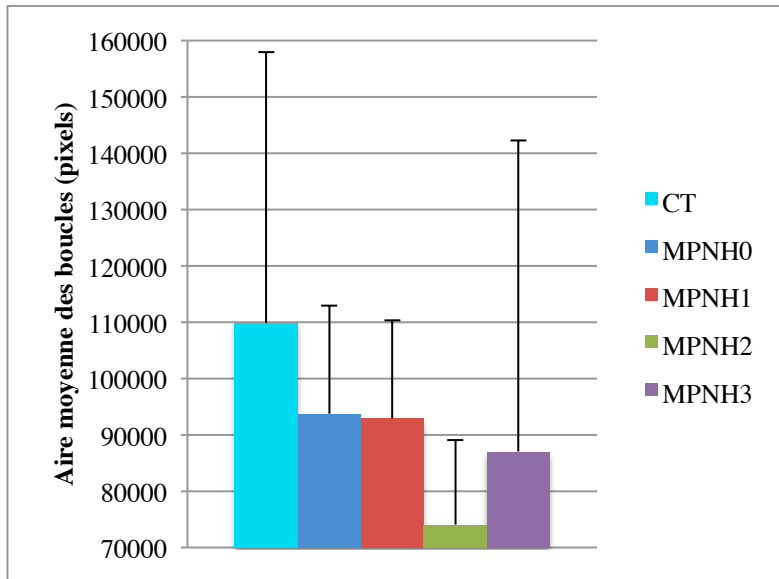
Graphique 8.7. Aire occupée par les ébauches vasculaires formées par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH déposées sur du matrigel.



Graphique 8.8. Nombre moyen de boucles formées par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH déposées sur du matrigel.

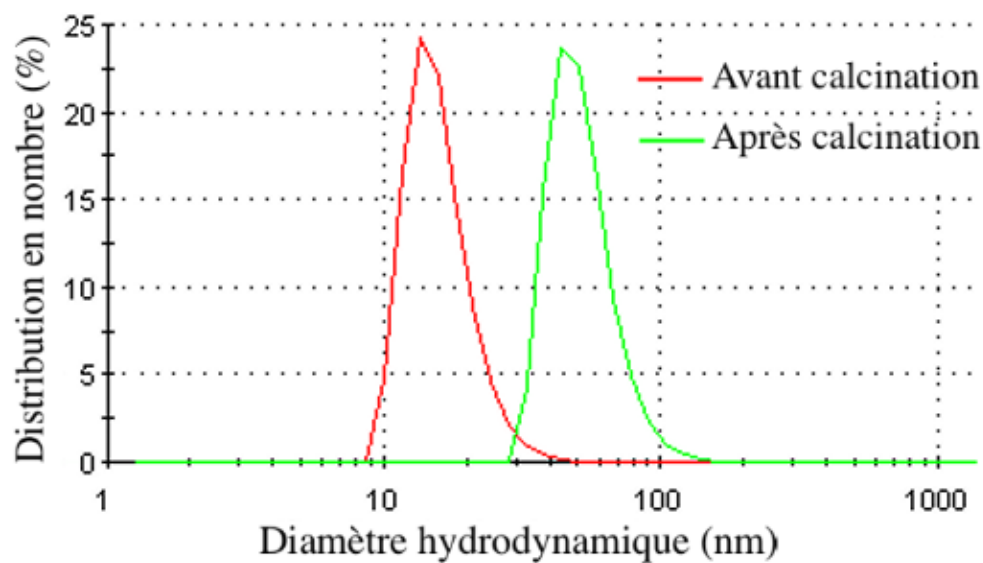


Graphique 8.9. Périmètres moyens de boucles formées par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH déposées sur du matrigel.

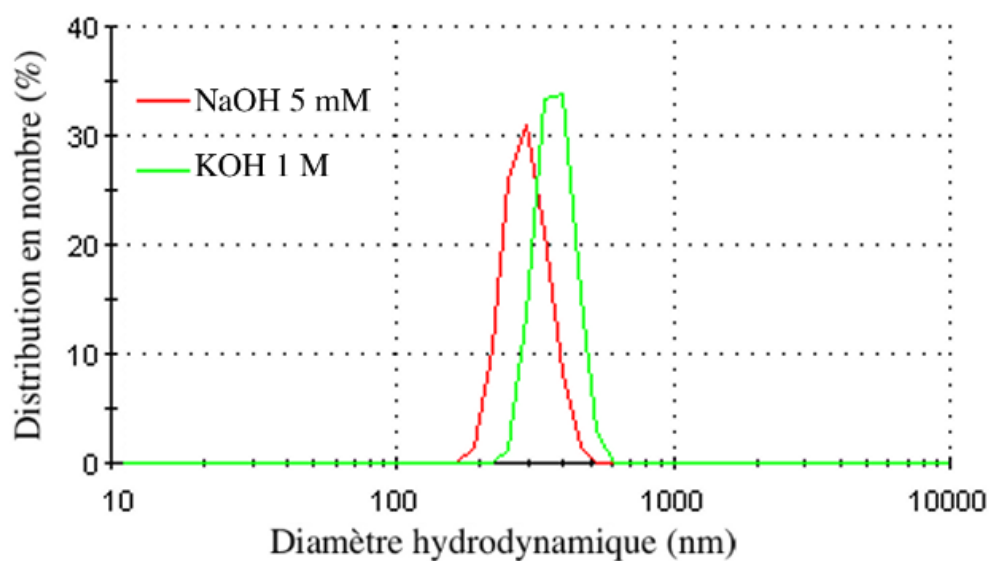


Graphique 8.10. Aires moyennes de boucles formées par des ECFC marquées avec des MPNH-COOH déposées sur du matrigel.

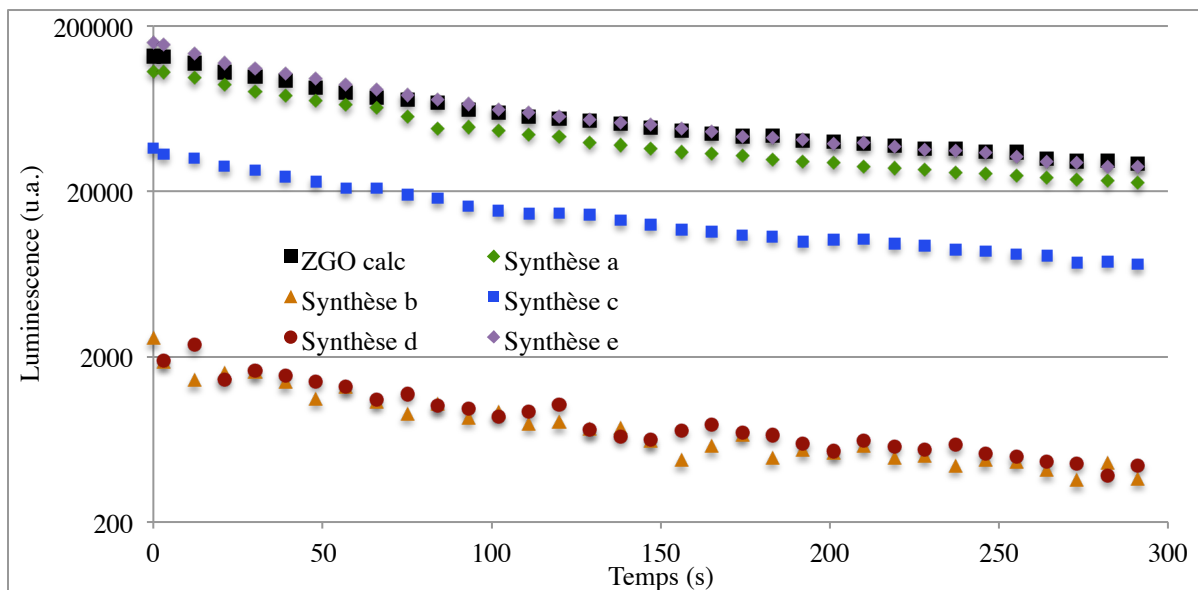
Annexe III : optimisation de la synthèse hydrothermale



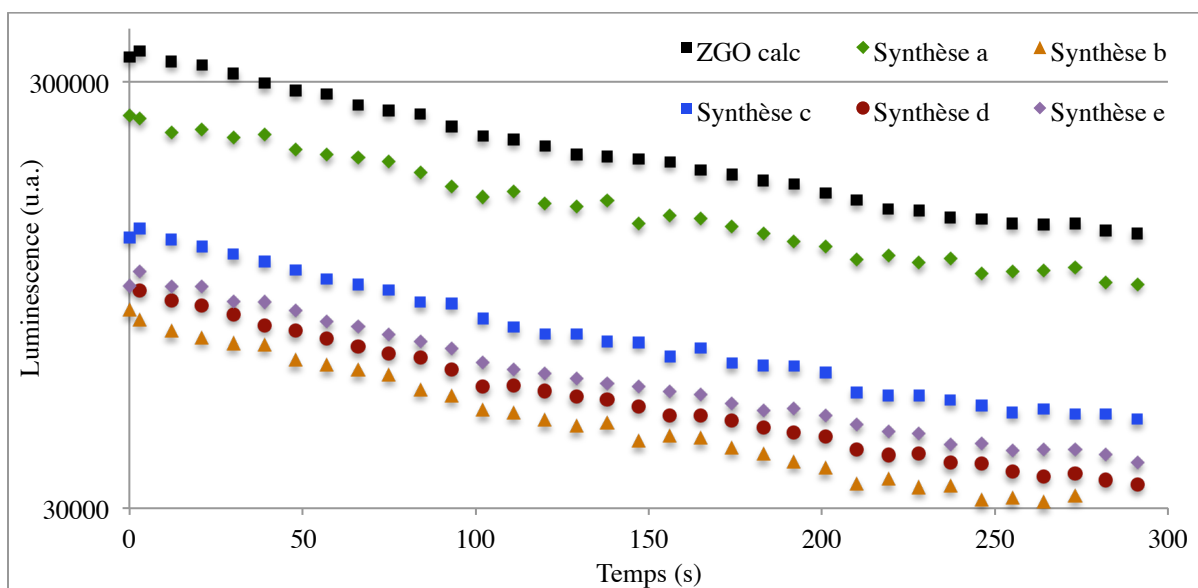
Graphique 8.11. Evolution de la distribution du diamètre hydrodynamique des ZGO avant (courge rouge) et après (courge verte) calcination à 750°C pendant 5 h.



Graphique 8.12. Distribution du diamètre hydrodynamique des ZGO@SiO₂ après un traitement de 24 h dans NaOH 5 mM à température ambiante (courge rouge) ou de 12 h dans KOH 1 M à 12°C après (courge verte) afin de tenter de dissoudre sélectivement la silice.



Graphique 8.13. Comparaison de la luminescence des ZGO synthétisés par voie hydrothermale modifiée. Déclins de luminescence de ZGO synthétisés par voie hydrothermale (Synthèses a, b, c, d, e) comparés au déclin de ZGO obtenus après extraction d'une poudre calcinée 5 h à 750°C. Ces déclins ont été enregistrés après une illumination visible de 2 min.



Graphique 8.14. Comparaison de la luminescence des ZGO synthétisés par voie hydrothermale modifiée. Déclins de luminescence de ZGO synthétisés par voie hydrothermale (Synthèses a, b, c, d, e) comparés au déclin de ZGO obtenus après extraction d'une poudre calcinée 5 h à 750°C. Ces déclins ont été enregistrés après une illumination UV de 30 s.