



# Nanoparticules fluorescentes à base de Pluronic : application à l'imagerie intravitale de la vascularisation par microscopie à deux photons et au transport de molécules

Mathieu Maurin

## ► To cite this version:

Mathieu Maurin. Nanoparticules fluorescentes à base de Pluronic : application à l'imagerie intravitale de la vascularisation par microscopie à deux photons et au transport de molécules. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENY006 . tel-00593468

**HAL Id: tel-00593468**

**<https://theses.hal.science/tel-00593468>**

Submitted on 16 May 2011

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les sciences du vivants**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Mathieu Maurin**

Thèse dirigée par **Patrice Baldeck** et  
codirigée par **Boudewijn van der Sanden**

préparée au sein du **Laboratoire de Spectrométrie Physique**  
dans l'**École Doctorale de Physique**

# Nanoparticules fluorescentes à base de Pluronic : Application à l'imagerie intravitale de la vascularisation par microscopie à deux photons et au transport de molécules

Thèse soutenue publiquement le **21 Janvier 2011**,  
devant le jury composé de :

**Mme Celine Fiorini**

Directeur de recherche au CEA Saclay, Rapporteur

**Mr Stéphane Parola**

Professeur à l'université Lyon 1, Rapporteur

**Mr François Berger**

Professeur à l'université Joseph Fourier (Grenoble), Président

**Mr Patrice Baldeck**

Directeur de recherche au Laboratoire de Spectrométrie Physique  
(Grenoble), Membre





## **Résumé :**

La microscopie de fluorescence à deux photons et ses applications en biologie requièrent le développement de nouvelles stratégies de marquage à base de chromophores efficaces, spécialement synthétisés. Ces molécules sont souvent très hydrophobes et ne sont pas utilisables directement pour les applications en biologie. Nous avons développé un procédé permettant de solubiliser ces molécules dans des micelles de copolymère biocompatible, le Pluronic. La solubilisation d'un dérivé de distryl benzène très absorbant à deux photons dans les micelles permet d'imager efficacement la vascularisation cérébrale après injection intraveineuse. Les marqueurs obtenus de cette façon ont aussi permis d'imager la vascularisation tumorale, perméable, sans être gêné par la diffusion du colorant dans les tissus environnants. Dans un second temps, les micelles de Pluronic ont servi à transporter un photosensibilisateur à forte section efficace d'absorption à deux photons dans des cellules. Elles ont permis l'accumulation du photosensibilisateur dans le cytoplasme de différents types de cellules et des essais de photothérapie à un photon ont été réalisés.

## **Mots clés :**

Microscopie à deux photons in vivo ; Microémulsion ; Micelles de Pluronic ; Vascularisation; Chromophores ultra sensibles; Photothérapie dynamique

## **Lieu de la thèse:**

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Spectrométrie Physique (LSP)

140 Avenue de la Physique - BP 87  
38402 Saint Martin d'Hères – France

# **Fluorescent Pluronic micelles for in vivo two-photon imaging of the vasculature and active molecule delivery**

## **Abstract :**

Classic fluorescent dyes are not necessary efficient in two-photon absorption. Their low two-photon absorption efficiency often requires high laser power and important dye concentrations. Therefore, new dyes and other administration strategies need to be developed specifically for intravital two-photon microscopy. In collaboration with chemists, specialized in the synthesis of molecules with a high two-photon absorption cross-section, different dyes have been synthesized. Most of these dyes are hydrophobic and not directly suitable for biological applications. The work presented in this thesis consisted of encapsulating hydrophobic molecules in biocompatible Pluronic block copolymers. In water, Pluronic unimers with hydrophobic and hydrophilic blocks self-assembled in hydrophilic micelles forming a hydrophobic core around the molecules. This strategy has been used already for the transport and delivery of different hydrophobic molecules in living organism. In the present study, this strategy has been transposed to transport ultra sensitive two-photon dyes in the blood plasma for deep vascular imaging in vivo.

## **Keywords :**

Two photon microscopy in vivo; Microemulsion; Pluronic micelles; Vascularization; Ultrasensitive chromophores; Photodynamic therapy

# Sommaire

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>Introduction générale.....</b> | <b>p9</b> |
|-----------------------------------|-----------|

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre I. Les marqueurs fluorescents.....</b> | <b>p11</b> |
|----------------------------------------------------|------------|

|                                                   |            |
|---------------------------------------------------|------------|
| <b>I.1. Principe de la photoluminescence.....</b> | <b>p11</b> |
|---------------------------------------------------|------------|

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.2. Propriétés des molécules fluorescentes.....</b> | <b>p13</b> |
|---------------------------------------------------------|------------|

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| I.2.1. La durée de vie de fluorescence..... | p13 |
|---------------------------------------------|-----|

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| I.2.2. Le rendement quantique de fluorescence..... | p15 |
|----------------------------------------------------|-----|

|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| I.2.3. Le coefficient d'absorption molaire..... | p16 |
|-------------------------------------------------|-----|

|                                                 |     |
|-------------------------------------------------|-----|
| I.2.4. Spectres d'absorption et d'émission..... | p17 |
|-------------------------------------------------|-----|

|                                                        |            |
|--------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.3. Paramètres influençant ces propriétés.....</b> | <b>p18</b> |
|--------------------------------------------------------|------------|

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| I.3.1. Effet du solvant, du pH et des ions en solutions..... | p18 |
|--------------------------------------------------------------|-----|

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| I.3.2. Le quenching dynamique..... | p19 |
|------------------------------------|-----|

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| I.3.3. La photodégradation..... | p19 |
|---------------------------------|-----|

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| I.3.4. Effet de la concentration et de l'agrégation..... | p20 |
|----------------------------------------------------------|-----|

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.4. Les marqueurs fluorescents en biologie.....</b> | <b>p20</b> |
|---------------------------------------------------------|------------|

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| I.4.1. Les molécules organiques fluorescentes..... | p21 |
|----------------------------------------------------|-----|

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| I.4.2. L'immunofluorescence..... | p22 |
|----------------------------------|-----|

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| I.4.3. Les protéines fluorescentes..... | p23 |
|-----------------------------------------|-----|

|                                              |     |
|----------------------------------------------|-----|
| I.4.4. Les nanoparticules fluorescentes..... | p24 |
|----------------------------------------------|-----|

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| I.4.5. L'auto fluorescence..... | p25 |
|---------------------------------|-----|

|                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre II. La microscopie de fluorescence à deux photons.....</b> | <b>p26</b> |
|------------------------------------------------------------------------|------------|

|                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>II.1. Microscopie de fluorescence classique et confocale.....</b> | <b>p26</b> |
|----------------------------------------------------------------------|------------|

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| II.1.1. La microscopie de fluorescence classique..... | p26 |
|-------------------------------------------------------|-----|

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| II.1.2. La microscopie confocale à balayage laser..... | p28 |
|--------------------------------------------------------|-----|

|                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| <b>II.2. Le microscope de fluorescence à deux photons.....</b> | <b>p30</b> |
|----------------------------------------------------------------|------------|

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| II.2.1. Principe et description..... | p30 |
|--------------------------------------|-----|

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| II.2.2. Les marqueurs en microscopie à deux photons..... | p33 |
|----------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                            |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>II.3. Utilisation en imagerie intravitale</b>                                           | <b>p35</b>     |
| II.3.1. Les différentes techniques d'imagerie intravitale                                  | p36            |
| II.3.2. Profondeur d'observation en microscopie à deux photons                             | p38            |
| II.3.2.1. Optimisation de l'excitation                                                     | p39            |
| II.3.2.2. Optimisation de la détection                                                     | p39            |
| II.3.3. Imagerie cérébrale                                                                 | p40            |
| II.3.3.1. Le cortex cérébral                                                               | p40            |
| II.3.3.2. Marquage et modélisation animale                                                 | p43            |
| II.3.4. Imagerie des tumeurs                                                               | p45            |
| II.3.4.1. Modélisation animale                                                             | p45            |
| II.3.4.2. Exemples d'applications                                                          | p46            |
| <br><b>Chapitre III. Les marqueurs intravasculaires pour la microscopie à deux photons</b> | <br><b>p47</b> |
| <b>III.1. Contraintes liées à l'environnement</b>                                          | <b>p47</b>     |
| III.1.1. Le sang                                                                           | p47            |
| III.1.2. La vascularisation                                                                | p48            |
| III.1.3. L'élimination par le sang                                                         | p50            |
| III.1.4. Résumé                                                                            | p51            |
| <b>III.2. Intérêt de l'imagerie de la vascularisation en microscopie à deux photons</b>    | <b>p51</b>     |
| III.2.1. La vascularisation cérébrale                                                      | p52            |
| III.2.2. La vascularisation tumorale                                                       | p52            |
| <b>III.3. Marqueurs existants</b>                                                          | <b>p53</b>     |
| <br><b>Chapitre IV. Les nanoparticules pour la médecine</b>                                | <br><b>p54</b> |
| <b>IV.1. Description générale et intérêt</b>                                               | <b>p54</b>     |
| <b>IV.2. Les différents types de nanoparticules</b>                                        | <b>p56</b>     |
| IV.2.1. Les nanoparticules organiques                                                      | p57            |
| IV.2.2. Les nanoparticules inorganiques                                                    | p60            |
| <b>IV.3. Utilisations en médecine</b>                                                      | <b>p61</b>     |
| <b>IV.4. Toxicité des nanoparticules</b>                                                   | <b>p62</b>     |

|                                                                                                       |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Chapitre V. Synthèse de nanoparticules fluorescentes à base de Pluronic</b>                        | <b>p63</b> |
| <b>V.1. Procédé de micro-émulsion</b>                                                                 | <b>p63</b> |
| V.1.1. Principe et description                                                                        | p63        |
| V.1.2. Utilisation du Pluronic comme surfactant                                                       | p65        |
| V.1.3. Influence du composé hydrophobe sur l'efficacité du procédé                                    | p68        |
| V.1.4. Caractérisation des marqueurs par diffusion de la lumière                                      | p69        |
| <b>V.2. Choix du chromophore et caractérisations spectroscopiques</b>                                 | <b>p70</b> |
| V.2.1. Chromophores à forte section efficace d'absorption à deux photons                              | p70        |
| V.2.2. Influence sur les propriétés de fluorescence des chromophores                                  | p72        |
| V.2.3. Choix du dérivé de di-styryl benzène                                                           | p76        |
| <b>V.3. Résumé</b>                                                                                    | <b>p76</b> |
| <b>Chapitre VI. Utilisation en imagerie du petit animal, comparaison aux Dextrans fonctionnalisés</b> | <b>p78</b> |
| <b>V.1. Imagerie profonde dans le cerveau sain</b>                                                    | <b>p78</b> |
| VI.1.1. Protocole expérimental                                                                        | p79        |
| VI.1.2. Efficacité des marqueurs in-vivo                                                              | p80        |
| VI.1.3. Evolution du marquage dans le temps                                                           | p82        |
| VI.1.4. Mesures du volume sanguin                                                                     | p83        |
| <b>VI.2. Imagerie en environnement tumoral</b>                                                        | <b>p85</b> |
| VI.2.1. Imagerie de l'environnement tumoral ex-vivo                                                   | p85        |
| VI.2.1.1. Protocole expérimental                                                                      | p85        |
| VI.2.1.2. Résultats et discussion                                                                     | p86        |
| VI.2.2. Imagerie de la vascularisation tumorale en fenêtre dorsale                                    | p87        |
| VI.2.2.1. Préparation du modèle animal                                                                | p87        |
| VI.2.2.2. Résultats                                                                                   | p88        |
| <b>VI.3. Toxicité et excrétion</b>                                                                    | <b>p89</b> |
| VI.3.1. Toxicité des marqueurs in-vitro                                                               | p89        |
| VI.3.2. Excrétion du colorant                                                                         | p90        |
| <b>VI.4. Résumé et discussion</b>                                                                     | <b>p92</b> |

**Chapitre VII. Application au transport de principes actifs .....p93**

**VII.1. Une molécule pour la photothérapie dynamique à deux photons ..p93**

**VII.2. Transport dans les cellules et photothérapie .....p97**

**VII.2.1. Captation par les cellules .....p97**

**VII.2.1.1. Protocoles expérimentaux .....p97**

**VII.2.1.2. Résultats .....p99**

**VII.2.2. Photothérapie dynamique .....p102**

**VII.2.3. Résumé .....p103**

**Chapitre VIII. Perspectives, Vectorisation des nanoparticulesp104**

**VIII.1. Fonctionnalisation des nanoparticules .....p104**

**VIII.1.1. Oxydation des fonctions –OH des Pluronic .....p105**

**VIII.1.2. Purification du produit .....p108**

**VIII.1.3. Dosage des fonctions aldéhydes .....p109**

**VIII.2. Type de vectorisation envisagée .....p111**

**Conclusions générale et perspectives .....p112**

***Références bibliographiques .....p113***

## Introduction générale

Les chromophores classiques ne sont pas toujours efficaces en absorption à deux photons. Leur faible efficacité nécessite l'utilisation de fortes puissances laser et de grandes concentrations en colorants. Dans ce sens, la microscopie à deux photons *in vivo* requiert le développement de nouvelles stratégies de marquage utilisant des chromophores spécialement dédiés à la microscopie à deux photons. Dans le cadre de collaborations avec des chimistes spécialisés dans la synthèse de molécules à forte section efficace d'absorption à deux photons (groupe de Chantal Andraud, ENS Lyon, groupe de Seth Marder, Georgia Institute of Technology), différents chromophores ont été synthétisés. Ces molécules organiques sont hydrophobes et ne sont pas utilisables directement pour les applications en biologie. Le travail effectué ici a consisté à encapsuler ces molécules dans des micelles de copolymères biocompatibles, les Pluronic. Les Pluronic sont des matériaux pouvant s'auto assembler en milieu aqueux sous forme de micelles et peuvent permettre de solubiliser des composés hydrophobes. Cette stratégie, notamment déjà utilisée pour permettre de transporter différents composés hydrophobes dans les organismes vivants a été employée ici pour véhiculer des chromophores ultrasensibles à deux photons dans le sang de manière à imager la vascularisation *in vivo*.

Au cours de cette thèse, un procédé de microémulsion déjà mis au point au laboratoire<sup>1</sup> a été transposé pour solubiliser efficacement des molécules hydrophobes dans des micelles de Pluronic. L'influence du procédé sur les propriétés de fluorescence des molécules encapsulées a été étudiée. La forte brillance à deux photons des marqueurs obtenus en utilisant un dérivé de distyryl benzène à forte section efficace d'absorption à deux photons (1800 GM) a permis une application *in vivo* en imagerie de la vascularisation. Le comportement des marqueurs a été étudié dans différents environnements et comparé aux Dextrans fonctionnalisés couramment utilisés pour ces applications. Les micelles de Pluronic permettent d'imager la vascularisation avec une efficacité comparable (jusqu'à des profondeurs de 600  $\mu\text{m}$  dans le cerveau) et un signal stable dans le temps en injectant dix fois moins de matière dans la circulation sanguine. De manière plus intéressante, aucune fuite de chromophores n'a été observée en environnement tumoral à la vascularisation plus perméable sur environ 1 heure. Pour comparaison, des Dextrans fonctionnalisés de 70 kDa s'accumulent dans les tissus de la tumeur en quelques minutes. Le caractère non diffusible du chromophore observé dans les

vaisseaux sanguins de la tumeur peut permettre de réaliser un suivi longitudinal de la vascularisation tumorale sans être gêné par la perte de contraste due à la diffusion dans les tissus.

Les micelles de Pluronic ont également été employées pour transporter des photosensibilisateurs hydrophobes très absorbants à deux photons (600 GM) à l'intérieur de cellules dans le but de réaliser des essais de photothérapie dynamique in vitro. L'aptitude des micelles de Pluronic à transporter le composé à l'intérieur des cellules a été étudié. Les micelles de Pluronic permettent au composé hydrophobe de s'accumuler dans le cytoplasme de différentes cellules en quelques heures. La mort cellulaire de gliomes peut alors être déclenchée en irradiant le photosensibilisateur à l'intérieur des cellules.

Enfin, dans le but d'améliorer l'affinité des micelles de Pluronic pour certaines cellules pathologiques, il est important de pouvoir fonctionnaliser les micelles par un agent de ciblage. Une dernière partie de la thèse a consisté à modifier les terminaisons des Pluronic en fonction aldéhydes de façon à pouvoir lier un agent de ciblage aux micelles par l'intermédiaire d'une fonction amine. Le taux de conversions des terminaisons de Pluronic en aldéhydes a été quantifié et la réaction de fonction amine sur les aldéhydes terminaux des Pluronic a été étudiée.

# Chapitre I. Les marqueurs fluorescents

Les premières observations de molécules fluorescentes ont été publiées à la fin du 16ème siècle par Monardes (Emission de lumière par une infusion de bois Lignum Nephriticum). Au cours du 19ème, les chercheurs se sont intéressés de plus en plus à l'émission de lumière de certains composés fluorescents (Brewster, 1833, étude de la chlorophylle). En 1842, Becquerel E. démontra le fait que la lumière émise correspondait à des longueurs d'onde plus grandes que la lumière incidente en étudiant l'émission de lumière du sulfure de cadmium sous excitation UV. Ensuite, Stokes réalisa de nouvelles études et a introduisit le terme de fluorescence en 1853. Ensuite, de nombreuses molécules fluorescentes ont été identifiées ou synthétisées comme la fluorescéine (1858 Von Baeyer), la rhodamine ou l'acridine orange. Après l'apparition de la microscopie de fluorescence au début des années 1920, de nouveaux champs de recherche se sont ouverts avec de nombreuses applications en biologie, comme l'étude des structures et la compréhension des métabolismes cellulaires.

Ce chapitre abordera dans un premier temps le phénomène physique à l'origine de la fluorescence. Il abordera ensuite les différentes caractéristiques relatives aux molécules fluorescentes. Enfin des exemples de marqueurs fluorescents ayant été développés pour les applications en biologie seront énumérés.

## I.1. Principe de la photoluminescence

La photoluminescence correspond à l'émission de lumière ayant lieu après l'absorption d'un photon par une molécule. Suite à cette absorption, la molécule passe dans un état excité (de plus haute énergie), caractérisé par le changement d'orbitale d'un électron. Après ce phénomène très rapide, de l'ordre de la fs, cette molécule va retourner dans son état fondamental (relaxation). Ce retour fait intervenir deux types de processus (figure I-1) :

- Les processus de désexcitation radiative :

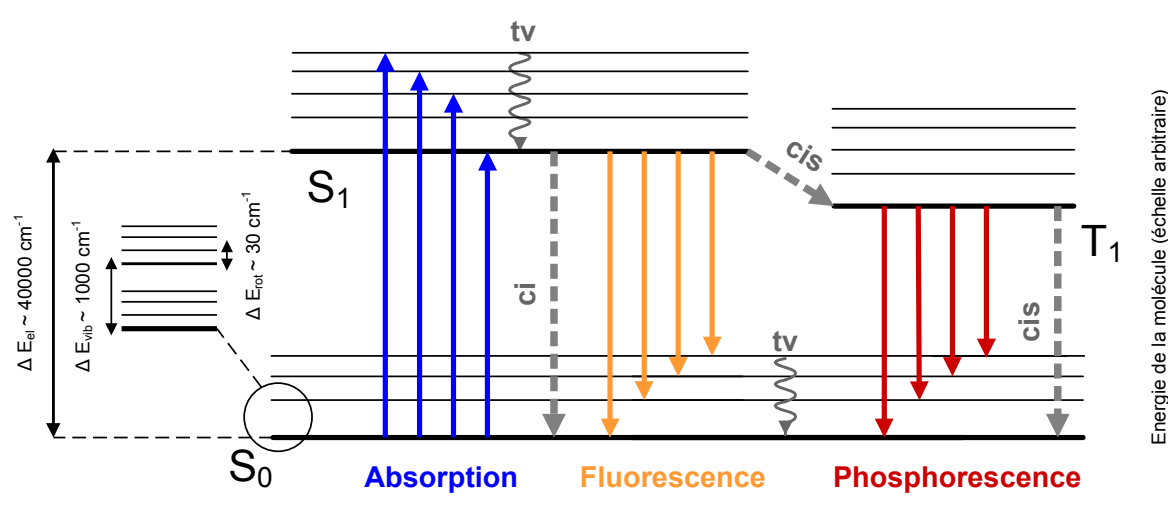
La molécule va passer de son état excité d'énergie  $E_n$  à un état d'énergie plus faible  $E_{n-1}$  en émettant un photon de longueur d'onde  $\lambda = h.c / (E_n - E_{n-1})$ . On distingue alors les transitions entre état de même spin ( $S_1 \rightarrow S_0, \Delta S = 0$ ) mises en jeux dans la fluorescence et les transitions entre états de spin différents ( $T_1 \rightarrow S_0, \Delta S \neq 0$ ) mises en jeux dans la phosphorescence.

- Les processus de désexcitation non radiative :

La molécule redescend vers des états d'énergie plus faibles sans émettre de photons. L'énergie est alors dissipée sous forme de chaleur ou transférée par la molécule à son environnement. Pour un changement d'état électronique, on distingue les transitions non radiatives entre états de mêmes spins (conversion interne) ou de spins différents (croisement inter-système). Il existe également des processus de désexcitation non radiative à l'intérieur d'un même état électronique, ce sont les transitions vibrationnelles.

| Processus                   | Temps caractéristique          |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Absorption                  | $\sim 10^{-15}$ s              |
| Fluorescence                | $\sim 10^{-10}$ à $10^{-7}$ s  |
| Phosphorescence             | $\sim 10^{-6}$ à 1 s           |
| Conversion interne          | $\sim 10^{-11}$ à $10^{-9}$ s  |
| Croisement inter-système    | $\sim 10^{-10}$ à $10^{-8}$ s  |
| Transitions vibrationnelles | $\sim 10^{-12}$ à $10^{-10}$ s |

**Table I-1.** Temps caractéristiques des différents processus mis en jeu dans la photoluminescence



**Figure I-1.** Diagramme de Jablonski représentant les différents processus de désexcitation d'une molécule après absorption d'un photon. Les flèches en trait plein représentent les différentes transitions impliquant l'absorption ou l'émission d'un photon. Les flèches grises représentent les différentes voies de désexcitation non-radiatives : les conversions internes (ci), les croisements inter-système (cis) et les transitions vibrationnelles (tv). A noter que l'échelle des énergies entre les niveaux n'est pas respectée. A gauche un ordre de grandeur des différences d'énergie entre les différents niveaux.

Dans le cas des molécules fluorescentes ou phosphorescentes, les processus de désexcitation radiative seront plus probables que les processus de désexcitation non radiative. La table I-1 montre les temps caractéristiques relatifs à ces différents processus. On peut voir que l'absorption est un phénomène quasi instantané au regard des processus de désexcitation. Les temps mis en jeu dans la phosphorescence sont les plus longs, souvent de l'ordre de la milliseconde. La fluorescence, bien plus rapide (de l'ordre de la nanoseconde), est plus utilisée en imagerie. Dans la suite de ce chapitre, on s'intéressera uniquement aux propriétés de fluorescence des molécules.

*Remarque :*

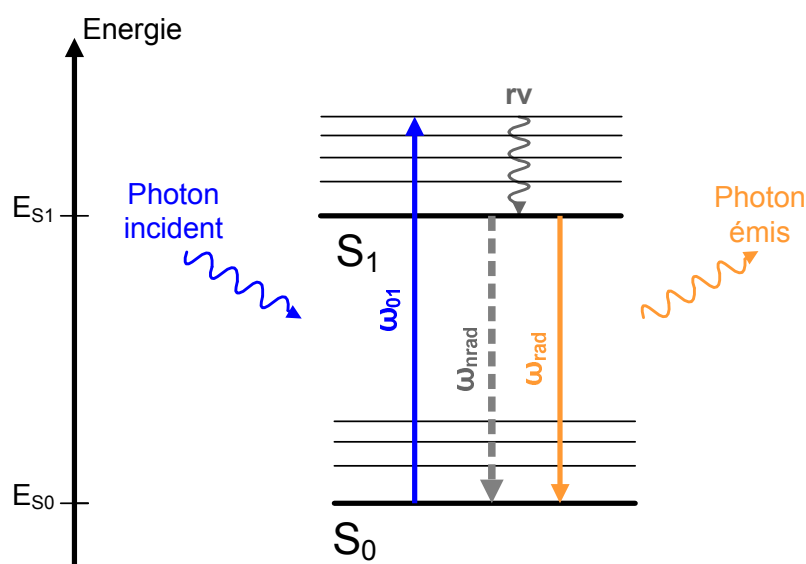
Toutes les molécules ne sont pas fluorescentes. Pour émettre de la fluorescence, les molécules doivent posséder un système d'électrons dont les mouvements de rotation interne ne sont pas possibles. Les molécules fluorescentes ou fluorophores sont donc des molécules polyatomiques composées de noyaux aromatiques conjugués et/ou de plusieurs liaisons  $\pi$  (double ou triple liaisons entre atome de carbones). Les représentations des niveaux d'énergie pour ces molécules polyatomiques sont bien plus complexes que celle de la figure 1.

## **I.2. Propriétés des molécules fluorescentes**

### **I.2.1. La durée de vie de fluorescence**

Une première caractéristique importante pour une molécule fluorescente est la durée de vie de fluorescence. Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. C'est le temps moyen qui sépare l'absorption d'un photon par une molécule de la fluorescence. Cette durée est généralement de l'ordre de la nanoseconde. Une durée de vie courte augmentera la sensibilité de la molécule en lui permettant de retourner plus vite dans son état fondamental et donc d'effectuer un plus grand nombre de cycles de fluorescence.

Prenons le cas le plus simple pour des molécules fluorescentes (figure I-2). Lorsqu'on éclaire ces molécules avec des photons d'énergie suffisante ( $\lambda_{0 \rightarrow 1} \geq h.c / (E_{S1} - E_{S0})$ ), certaines vont passer dans leur état excité avec une probabilité de transition  $\omega_{01}$  (en  $s^{-1}$ ). Après un réarrangement vibrationnel, les molécules excitées vont retourner dans leur état fondamental soit de manière radiative, avec une probabilité  $\omega_{rad}$  (en  $s^{-1}$ ), ou soit de manière non radiative, avec une probabilité  $\omega_{nrad}$  (en  $s^{-1}$ ).



**Figure I-2.** Diagramme de Jablonski pour une molécule fluorescente simple.  $\omega_{01}$  (en  $s^{-1}$ ) la probabilité par unité de temps pour la molécule d'absorber un photon d'énergie  $E \geq E_{S1}-E_{S0}$ .  $\omega_{rad}$  (en  $s^{-1}$ ) la probabilité par unité de temps pour une molécule excitée de se désexciter de manière radiative.  $\omega_{nrad}$  (en  $s^{-1}$ ) la probabilité par unité de temps pour une molécule excitée de se désexciter de manière non radiative.

On introduit la durée de vie de fluorescence,  $\tau$ , à l'aide des probabilités de désexcitation radiative et non radiative :

En éclairant des molécules fluorescentes avec un flash de lumière à  $t = 0$ , on va se retrouver avec  $N_{exc}$  molécules à l'état excité. A partir des probabilités de désexcitation des molécules, on peut mettre en équation la variation de cette population au cours du temps :

$$\frac{dN_{exc}}{dt} = -(\omega_{nrad} + \omega_{rad})N_{exc}$$

La population à l'état excité au cours du temps est donc de la forme :

$$N_{exc}(t) = N_{exc}(t=0)e^{-(\omega_{nrad} + \omega_{rad})t} = N_{exc}(t=0)e^{-t/\tau}$$

On définit ainsi la durée de vie de fluorescence  $\tau = 1/(\omega_{rad} + \omega_{nrad})$  qui correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité.

En pratique on mesure ces durées de vie grâce à des dispositifs de comptage de photons résolus temporellement. On excite les molécules fluorescentes à l'aide d'une impulsion lumineuse très courte (de l'ordre de  $10^{-10}$  s). Une photodiode collecte alors les photons de fluorescences émis et enregistre leur temps d'arrivée après l'impulsion. On trace ensuite la courbe correspondant au nombre de photons de fluorescence collectés en fonction du temps

attendu après l'impulsion. En réalisant un fit en  $e^{-t/\tau}$  on peut alors obtenir une mesure expérimentale la durée de vie de fluorescence.

### I.2.2. Le rendement quantique de fluorescence

L'autre caractéristique importante des ces molécules est leur rendement quantique de fluorescence,  $\eta$ . Il correspond à l'efficacité de ces molécules à restituer sous forme lumineuse les photons qu'elles ont absorbés.

On peut également l'exprimer à l'aide des probabilités de désexcitation radiative et non radiative et du modèle précédent :

$\eta$  est défini comme le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis ( $N_e$ ) et le nombre de photons absorbés ( $N_a$ ).

Or, par définition,  $N_e(t) = \omega_{rad} N_{exc}(t) = \omega_{rad} N_{exc}(t=0) e^{-t/\tau}$

Soit le nombre total de photon émis :

$$N_e = \int_0^\infty \omega_{rad} N_{exc}(t) dt = \omega_{rad} \tau N_{exc}(t=0)$$

Comme la population à l'état excité à l'instant  $t = 0$  correspond au nombre de photons absorbés, on en déduit le rendement quantique de fluorescence :

$$\eta = \frac{N_e}{N_a} = \frac{\omega_{rad}}{\omega_{rad} + \omega_{nrad}}$$

En pratique, les mesures absolues de rendement quantique de fluorescence sont difficiles à réaliser. On les détermine généralement de manière relative par rapport à des standards de rendements déjà connus et souvent proches de 1. Pour deux molécules différentes absorbant la même quantité d'énergie lumineuse, le rapport des intensités lumineuses émises sera égal au rapport des rendements quantiques de fluorescence.

### I.2.3. Le coefficient d'absorption molaire

En théorie, l'efficacité d'absorption d'un photon de longueur d'onde  $\lambda_{0 \rightarrow 1} \geq h.c / (E_{S1} - E_{S0})$  par une molécule est reliée à la probabilité de transition  $\omega_{01}$  (en  $s^{-1}$ ). Cette probabilité dépend de la densité de photon incident de fréquence  $\nu_{0 \rightarrow 1}$  ( $\rho(\nu_{0 \rightarrow 1})$ ) et du coefficient d'Einstein  $B_{0 \rightarrow 1}$  :

$$\omega_{0 \rightarrow 1} = \rho(\nu_{0 \rightarrow 1}) B_{0 \rightarrow 1}$$

$B_{0 \rightarrow 1}$  provient du calcul en mécanique quantique du moment de transition entre les états 0 et 1 :

$$B_{0 \rightarrow 1} = \frac{2\pi}{(4\pi\epsilon_0)3\hbar^2} \left| \langle 0 | \hat{\mu} | 1 \rangle \right|^2$$

Ce moment de transition permet également de distinguer les transitions permises (entre états de même spin) des transitions interdites (entre états de spin différents).

En pratique, on relie cette probabilité de transition au coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{(\lambda)}$  introduit par la loi de Beer-Lambert. Lorsqu'un rayonnement monochromatique à la longueur d'onde  $\lambda$  d'intensité  $I_{\lambda}^0$  traverse un échantillon, on définit son absorbance comme étant :

$$A_{\lambda} = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}$$

Or,  $I_{\lambda}$  décroît de manière exponentielle avec la longueur d'échantillon traversée :

$$I_{\lambda} = I_{\lambda}^0 e^{-k_{\lambda} l}$$

Avec  $k_{\lambda}$  le coefficient d'absorption à la longueur d'onde  $\lambda$  (en  $m^{-1}$ ). En posant :

$$k_{\lambda} = \frac{1}{\log(e)} \frac{\epsilon_{\lambda}}{c}$$

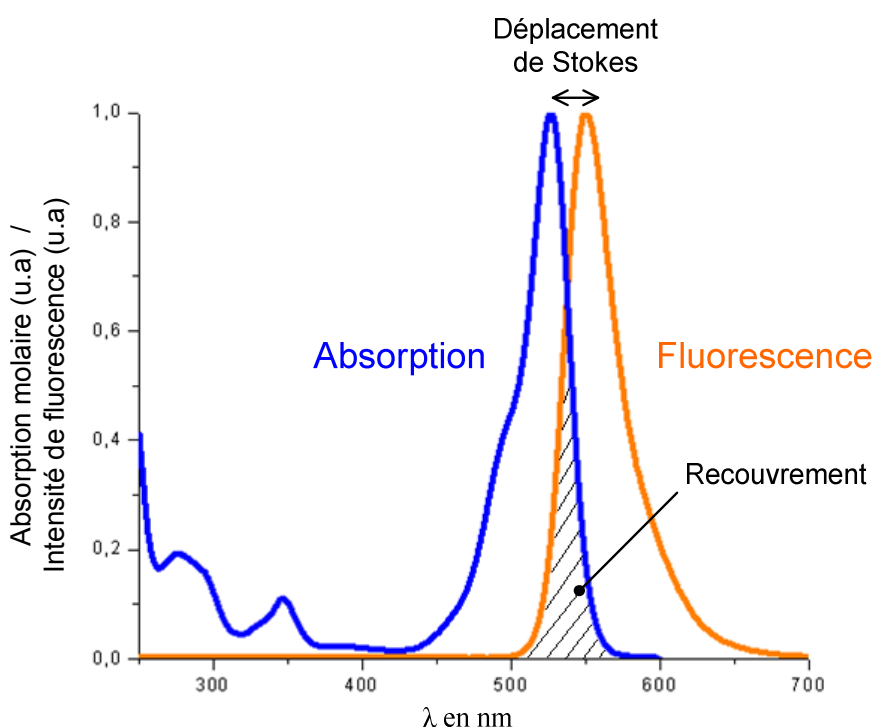
On obtient :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

Avec  $\epsilon_{\lambda}$  le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde  $\lambda$  (en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ). Ce coefficient est une mesure directe de la probabilité d'absorber un photon de longueur d'onde  $\lambda$  pour une molécule.

### I.2.4. Spectres d'absorption et d'émission

Pour caractériser une molécule fluorescente, en plus de sa durée de vie et de son rendement, on représente souvent son spectre d'absorption et d'émission de fluorescence. Le spectre d'absorption correspond à la représentation graphique du coefficient d'absorption molaire en fonction de la longueur d'onde. Le spectre d'émission de fluorescence correspond lui à la répartition spectrale de la lumière de fluorescence émise lorsqu'on excite la molécule. Ils reflètent la distribution de probabilités des transitions énergétiques et représentent la signature de la structure électronique de la molécule dans un environnement donné. Généralement, quand la structure moléculaire de l'état excité est proche de celle du fondamental, le spectre d'émission est une image inversée du spectre d'absorption.



**Figure I-3.** Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence pour la Rhodamine 6G dans l'eau.

Après avoir absorbé un photon, la molécule subit une relaxation vibrationnelle en perdant un peu d'énergie sous forme vibration ou de chaleur. Le photon de fluorescence émis est donc d'énergie inférieure au photon absorbé. Cette perte d'énergie se traduit par un décalage entre les maxima d'excitation et d'émission. Ce décalage est appelé déplacement de Stokes. La figure I-3 montre un exemple de spectres pour une molécule fluorescente, la

Rhodamine 6G. Pour les applications en microscopie il est nécessaire d'avoir des déplacements de Stokes assez importants ( $>20$  nm) pour des raisons pratiques qui seront expliquées dans le chapitre II. Ces spectres constituent des données importantes pour anticiper les longueurs d'ondes auxquelles on pourra exciter le chromophore et détecter sa fluorescence. On peut également constater sur la figure I-3 qu'un faible déplacement de Stokes engendre un important recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission. Ce phénomène de recouvrement pourra induire des phénomènes de réabsorption de la lumière émise entre des molécules fluorescentes proches ou dans des solutions très concentrées.

### **I.3. Paramètres influençant ces propriétés**

En conditions expérimentales, les molécules fluorescentes sont dans un environnement complexe. Cet environnement local va grandement influencer sur leurs propriétés de fluorescence. Il peut favoriser les désexcitations non radiatives et donc diminuer la fluorescence. Il va également modifier les niveaux d'énergie de la molécule et ses spectres. Les propriétés de fluorescence d'une molécule sont donc toujours relatives à un environnement précis (solvant, pH, nature et concentration des autres espèces en solution...).

#### **I.3.1. Effet du solvant, du pH et des ions en solutions**

La manière avec laquelle la molécule est solvatée va modifier les spectres et les propriétés de fluorescence de la molécule. La polarité du solvant va influencer sur la stabilité des formes moléculaires à l'état fondamental et à l'état excité. Il va ainsi modifier les niveaux d'énergie de la molécule et les probabilités de transition.

Les molécules contenant des fonctions acides ou basiques seront-elles sensibles au pH. Elles seront présentes sous différentes formes en fonction du pH. En fonction de la protonation ou de la déprotonation de la molécule, les niveaux d'énergie et les propriétés de fluorescence seront souvent modifiés.

Enfin, certaines molécules fluorescentes seront sensibles aux ions présents en solution. En complexant, leurs structures moléculaires et leurs propriétés de fluorescence seront changées.

### **I.3.2. Le quenching dynamique**

En solution, les molécules fluorescentes ne sont pas isolées. Une fois dans leur état excité, elles peuvent entrer en collision avec d'autres molécules. Dans le cas des collisions, l'énergie électronique sera convertie en énergie cinétique et en énergie de vibrations, c'est le quenching dynamique. Ainsi, une augmentation de la température ou de la concentration des espèces en solution va faire diminuer la fluorescence en augmentant les probabilités de collisions.

### **I.3.3. La photodégradation**

Une fois dans son état excité, la molécule peut également réagir chimiquement avec son environnement (polymérisations, oxydations, dissociations, isomérisations, liaisons avec d'autres molécules) et de perdre ses propriétés de fluorescence. Le plus souvent, les molécules réagissent avec l'oxygène (sous forme de radicaux libres). Ce phénomène, appelé photoblanchiment (ou photodestruction), est gênant en microscopie de fluorescence. Lorsqu'on excite des molécules fluorescentes de manière continue, on en détruit une partie et ainsi l'intensité de fluorescence décroît. La résistance au photoblanchiment (ou photostabilité) correspond au nombre moyen d'excitations que peut subir une molécule avant d'être dégradée. Une bonne photostabilité sera nécessaire pour les applications en imagerie de fluorescence. A noter que ce phénomène peut être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou de FLIP (Perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local).

De plus, l'excitation de molécules par un rayonnement est à l'origine d'effets thermiques. Les différents processus de conversion interne mis en jeu dans leur désexcitation conduisent à des échauffements. Lors d'une excitation continue, l'augmentation locale de la température peut ainsi conduire à la dégradation des molécules et de leur environnement.

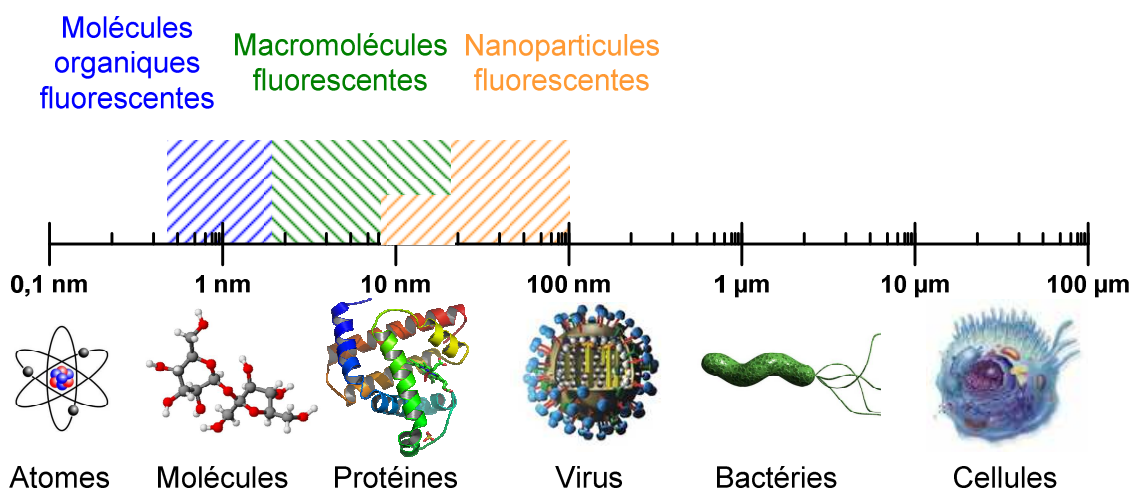
Au final, l'excitation de molécules fluorescentes par une radiation lumineuse conduit à une dégradation progressive de ces molécules et de leur environnement local. Ces processus de photo-dégradation dépendent des densités d'énergie incidente, de la durée d'irradiation mais aussi de la nature des fluorophores utilisés.

### I.3.4. Effet de la concentration et de l'agrégation

En présence de forte concentration de molécules fluorescentes ayant un faible déplacement de Stokes, l'efficacité apparente du fluorophore va baisser. Cette baisse est due aux effets de recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission. Une partie du rayonnement de fluorescence émis est réabsorbé par les autres molécules en solution. De plus les fortes concentrations vont augmenter les collisions et donner lieu à des phénomènes de dimérisation ou d'agrégation. Ces phénomènes vont très largement modifier les propriétés spectrales et l'efficacité des molécules fluorescentes.

## I.4. Les marqueurs fluorescents en biologie

Il existe une grande variété de marqueurs utilisables en biologie. On les différencie par leurs propriétés physicochimiques et leurs affinités pour un environnement donné. Leur taille va aussi différer (figure I-4). La plus-part des applications en biologie cellulaire nécessitent de petites molécules capables de pénétrer les membranes cellulaires. Cependant, d'autres applications nécessitent des marqueurs de plus grosse taille, pouvant aller jusqu'à 100 nm.

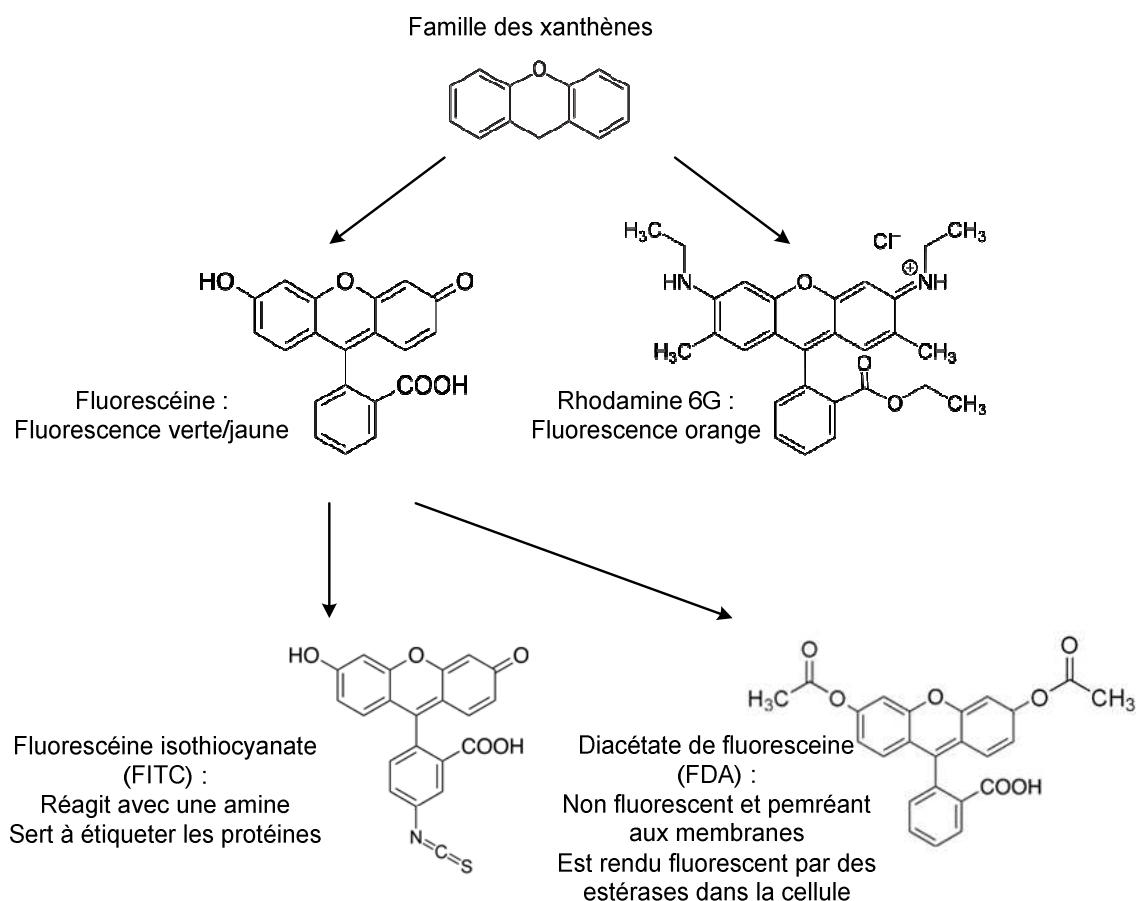


**Figure I-4.** Taille des marqueurs fluorescents en comparaison aux principales structures biologiques

#### **I.4.1. Les molécules organiques fluorescentes.**

La plus-part des sondes fluorescentes utilisées en biologie sont des molécules organiques dérivées de quelques familles de fluorophores. Une des plus couramment utilisées, la famille des xanthenes, regroupe entre autres les dérivés de fluorescéine ou de rhodamine. Comme l'illustre la figure I-5, en fonction des groupements chimiques greffés autour du cœur fluorescent de la molécule, on va obtenir des molécules aux propriétés différentes (propriétés de fluorescence, longueurs d'onde d'excitation et d'émission...). Avec certains groupements chimiques, ces dérivés pourront avoir une affinité pour une structure ou fonction biologique et pourront être utilisés comme sondes. Généralement, on ajoute à la molécule des groupements permettant de modifier ces propriétés physicochimiques. La plus importante est la lipophilicité de la molécule. Un fluorophore lipophile aura tendance à s'accumuler dans les membranes (constituées de lipides). Une sonde amphiphile pourra pénétrer à l'intérieur de la cellule avant de se concentrer dans certains compartiments cellulaires (ex : Hoechst). Le pKa est un paramètre également important pour la sonde. Une base faible s'accumulera ensuite dans un compartiment acide de la cellule (ex : Rouge neutre) alors qu'un acide faible s'accumulera dans un compartiment alcalin (ex : Fluoresceine cytosolique). Une autre stratégie consiste à rajouter des dérivés estérifiés, pour rendre une molécule assez lipophile pour traverser une membrane (ex : Diacétate de fluorescéine). Une fois à l'intérieur de la cellule, des enzymes (les estérases) vont couper les fonctions ester pour libérer la forme acide de la molécule (fluorescente). On peut alors utiliser ces sondes, en fonction de leurs affinités, pour venir marquer de manière spécifique une structure biologique.

On peut également exploiter la sensibilité de certaines molécules fluorescentes à leur environnement physicochimique pour réaliser des capteurs. On peut par exemple utiliser des fluorophores dont l'efficacité varie en présence d'ions ou du pH. De cette manière, des sondes fluorescentes pour estimer l'activité de divers ions, comme  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , ou des sondes sensibles au pH ont été développées<sup>2</sup>. Généralement il en existe plusieurs dérivés avec des affinités pour divers environnement biologiques. Des sondes pour mesurer les potentiels membranaires ont également été développées. Ce sont des molécules lipophiles polaires qui vont avoir une affinité pour un certain type de membrane cellulaire et dont la durée de vie de fluorescence va varier en fonction du potentiel membranaire<sup>3</sup>. Ces sondes permettant de réaliser des mesures in situ sont très utiles pour l'étude de nombreux phénomènes en biologie.



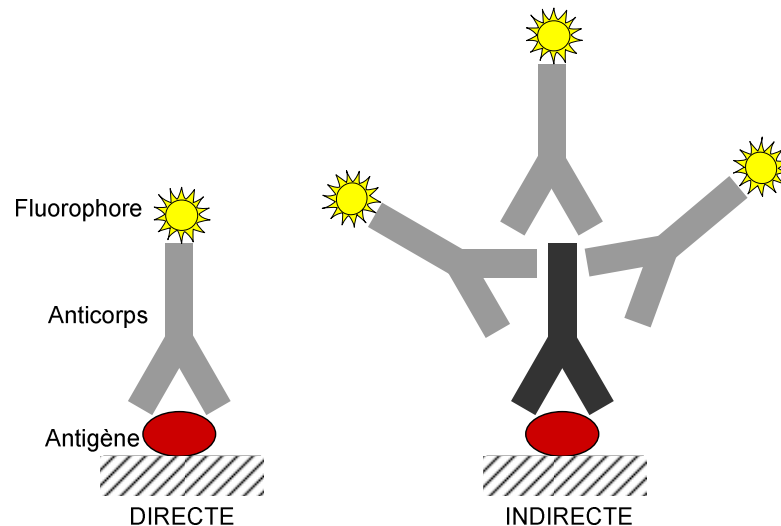
**Figure I-5.** Structure moléculaire de différentes sondes de la famille des Xanthènes

De manière générale, chaque fonction ou structure biologique est caractéristique d'un environnement physicochimique particulier. Une sonde devra avoir une affinité pour cette structure et/ou cette fonction en gardant de bonnes propriétés de fluorescence.

#### I.4.2. L'immunofluorescence

Au début des années 40, Albert Coons a mis au point une technique pour greffer des molécules fluorescentes à des anticorps. Ces travaux ont donné lieu au développement de l'immunofluorescence. On peut fabriquer des anticorps susceptibles de reconnaître une molécule souhaitée (l'antigène). En les couplant à un fluorochrome, on obtient des marqueurs fluorescents avec une très bonne affinité pour l'antigène. C'est le cas de l'immunofluorescence directe. Pour augmenter le contraste du marquage, on utilise deux anticorps différents. Un premier est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour le

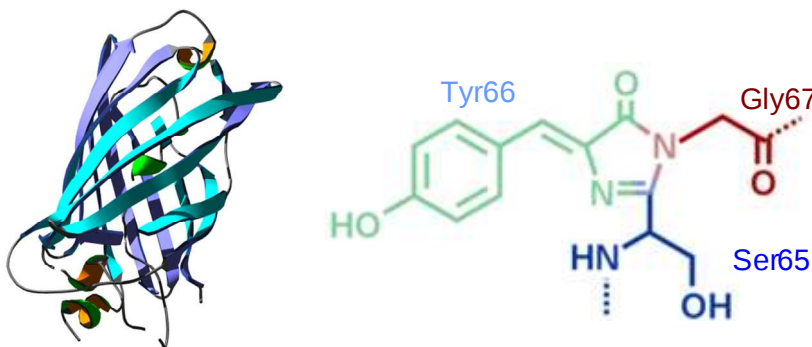
premier anticorps. Comme plusieurs anticorps secondaires vont pouvoir se fixer à l'anticorps primaire, on aura une meilleure sensibilité (figure I-6). Il existe à l'heure actuelle un large spectre d'anticorps permettant de marquer la plupart des structures biologiques. On peut greffer à leurs surfaces une large variété de molécules fluorescentes permettant des marquages multiples.



**Figure I-6.** Principe de l'immunofluorescence directe et indirecte

#### I.4.3. Les protéines fluorescentes

La protéine fluorescente verte (souvent abrégé GFP, de l'anglais Green Fluorescent Protein) a été décrite pour la première fois en 1962. Issue d'une méduse (*Aequorea victoria*), cette protéine est naturellement fluorescente. Elle est constituée de 238 acides aminés pour une masse moléculaire d'environ 27 kDa ( $27000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Le centre actif responsable de la fluorescence est constitué par les chaînes latérales d'une glycine, une tyrosine et une sérine (figure I-7).



**Figure I-7.** Structure de la GFP (à gauche) et enchainement d'acide aminé responsable sa fluorescence (à droite).

Avec l'explosion des techniques de génie génétique, au début des années 1990, le gène codant pour la GFP a été séquencé. Ensuite, il a été possible de faire fusionner ce gène avec un autre gène codant pour une autre protéine<sup>4</sup>. De cette façon, on obtient un gène codant pour une protéine constituée des deux protéines reliées entre elles. Ce gène peut ensuite être réintroduit dans des cellules ou un embryon, qui vont alors synthétiser la protéine de fusion, qui sera fluorescente. Ainsi, on peut réaliser des modèles transgéniques dont la fluorescence proviendra de la protéine choisie.

#### **I.4.4. Les nanoparticules fluorescentes**

Plus récemment, on a vu émerger le développement de nanoparticules fluorescentes. On reviendra plus en détail sur les différents types de nanoparticules et leur multitude d'applications en biologie dans les Chapitres III et IV. D'une taille allant de quelques nanomètres à 100 nm, elles possèdent généralement une très grande brillance et l'avantage d'avoir une grande surface fonctionnelle (possibilité de greffer chimiquement d'autres fonctions). Les plus connues, les Quantum dots sont des nano cristaux fluorescents dont les propriétés de fluorescence peuvent être ajustées en changeant leur forme ou leur taille (de 2 à 10 nm) ou leur composition<sup>5</sup>.

Les Quantum dots sont environ 20 fois plus brillants et 100 fois plus stables que les marqueurs fluorescents traditionnels<sup>6</sup>. Ils peuvent être greffés à des anticorps ou à d'autres ligands pour venir imager de manière spécifique certaines protéines ou cellules. Outre leur très grande sensibilité en imagerie, leur grande stabilité permet de réaliser le suivi en temps réel de la fluorescence sur des longues périodes<sup>7</sup>. Cependant ils peuvent se révéler toxiques lorsqu'on les éclaire en lumière UV. L'énergie des photons étant proche de l'énergie de liaison entre les atomes des nanocristaux, il en résulte une dissolution des cristaux. Les ions ainsi libérés sont très toxiques en milieu biologique. En les excitant à des plus grandes longueurs d'onde et avec un traitement de surface adapté, on peut s'affranchir de cette toxicité<sup>8</sup>.

#### **I.4.5. L'auto fluorescence**

Certains composants des milieux biologiques sont naturellement fluorescents. On retrouve par exemple des acides aminés aromatiques (Tryptophane, Phenylalanine et Tyrosine) présents dans de nombreuses protéines ou le NADPH présent dans les mitochondries. Cette fluorescence naturelle, ou fluorescence endogène permet l'observation de certains échantillons sans marquage. Elle peut être utilisée pour certaines applications en biologie. C'est le cas d'une substance fluorescente appelée lipofuscine qui est présente dans les vésicules cytoplasmiques des cellules musculaires et des cellules nerveuses. La concentration en lipofuscine va augmenter avec l'âge ou avec certaines pathologies comme Alzheimer ou Parkinson.

Pour résumer, on dispose déjà d'un large choix de marqueurs fluorescents. Cependant, le nombre important de problématiques en biologie demande sans cesse la création de nouvelles stratégies de marquage. Pour développer un marqueur, il faudra bien connaître ses caractéristiques physico-chimiques et être vigilant aux conditions de l'environnement biologique final qui pourrait éventuellement les modifier.

## **Chapitre II. La microscopie de fluorescence à deux photons**

Classiquement la microscopie optique permet de former une image en détectant la lumière réfléchie ou transmise à travers un échantillon. En microscopie de fluorescence, on va utiliser la lumière de fluorescence émise par l'échantillon pour créer un contraste. On peut ainsi observer les parties naturellement fluorescentes d'un échantillon ou celles marquées par des molécules fluorescentes. Depuis sa création au début du 20<sup>ème</sup> siècle, la microscopie de fluorescence s'est beaucoup développée. Dans les années 1980, le développement des lasers a apporté de nouveaux progrès. Tout d'abord l'apparition du microscope confocale à balayage laser a permis d'améliorer la qualité des images obtenues. Ensuite, au début des années 1990, Denk, Strickler et Webb ont inventé un nouveau type de microscopie de fluorescence basé sur la théorie de l'absorption à deux photons<sup>9</sup>. Cette technique permettant de réaliser des images tridimensionnelles dans des tissus vivants a été rendue possible par l'apparition des lasers impulsionnels émettant dans l'infra rouge. La microscopie de fluorescence à deux photons a depuis ouvert le champ à de nombreuses études en biologie.

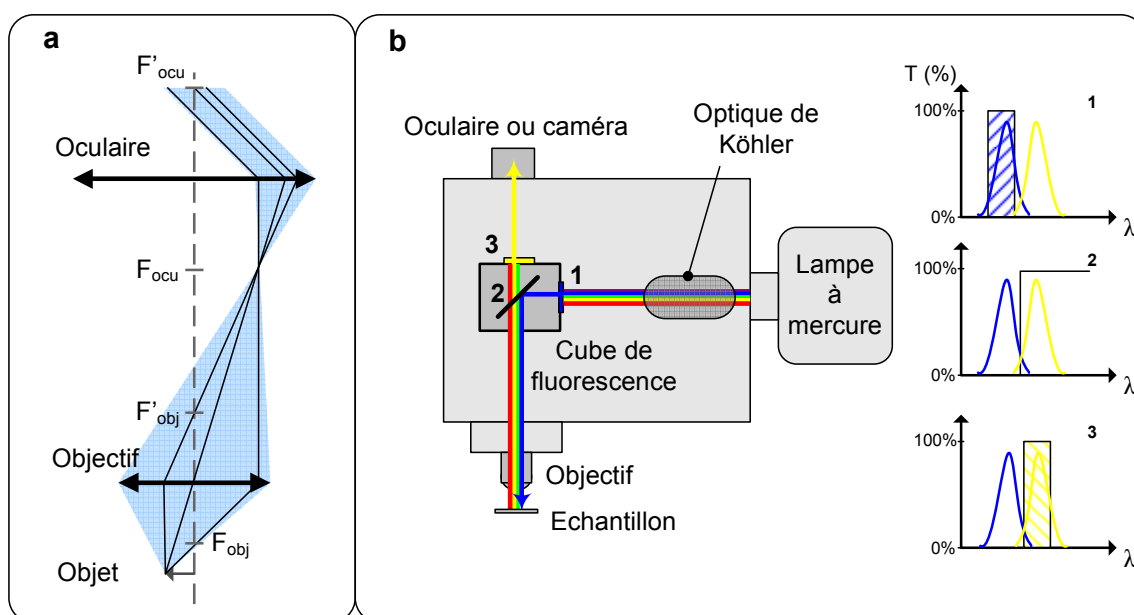
Dans ce chapitre, on abordera dans un premier temps le fonctionnement de la microscopie de fluorescence classique et confocale. Ensuite, le principe et le fonctionnement de la microscopie à deux photons seront expliqués. Enfin, les avantages de cette technique en imagerie intravitale et des exemples d'utilisation seront détaillés.

### **II.1. La microscopie de fluorescence classique et confocale**

#### **II.1.1. La microscopie de fluorescence classique**

On peut tirer profit du phénomène de fluorescence avec un microscope optique (figure II-1a). Classiquement on utilise la lumière réfléchie, transmise ou diffusée de l'échantillon pour former une image. En microscopie de fluorescence on réalise un marquage spécifique de certaines structures ou on utilise la fluorescence naturelle de celles-ci. En éclairant aux bonnes longueurs d'onde l'échantillon à travers l'objectif d'un microscope, les structures marquées ou auto-fluorescentes vont émettre de la lumière de fluorescence. Une partie de cette lumière, émise dans toutes les directions, sera collectée par l'objectif pour former une image de la structure. La principale difficulté consiste à séparer cette lumière de fluorescence, assez faible, de la lumière d'excitation réfléchie très intense. Pour cela on utilise des miroirs

dichroïques (figure II-1b) permettant de réfléchir ou transmettre la lumière en fonction de sa longueur d'onde.



**Figure II-1 a.** Fonctionnement simplifié du microscope optique. **b.** Représentation simplifiée d'un microscope de fluorescence. A droite le profil de transmission des différents éléments qui composent le cube de fluorescence. 1 le filtre d'excitation, 2 le miroir dichroïque et 3 le filtre d'émission.

D'une manière plus générale, la lumière d'excitation provient de lampes à vapeur de mercure ou de lampe capables de générer d'importantes quantités de lumière dans des gammes spectrales allant des UV au visible. Cette lumière est condensée par un dispositif optique (le dispositif de Köhler) avant de passer dans un filtre permettant de sélectionner la gamme spectrale pour l'excitation. La lumière est alors réfléchiée par le miroir dichroïque avant d'être focalisée sur l'échantillon à travers l'objectif. La fluorescence émise par l'échantillon et la lumière d'excitation réfléchiée sont ensuite collectées par ce même objectif. Le miroir dichroïque va alors transmettre la lumière de longueur d'onde supérieure à la lumière d'excitation et ne laisser passer ainsi que la fluorescence. Cette lumière est ensuite refiltrée une dernière fois pour ne garder que la fluorescence provenant de la molécule souhaitée avant d'être dirigée vers un oculaire ou une caméra. Le miroir dichroïque et les filtres permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'excitation et de détection sont généralement montés sur un cube appelé cube de fluorescence. On peut voir sur la figure II-1b, les caractéristiques de transmission des divers éléments d'un cube de fluorescence (le filtre d'excitation, le miroir dichroïque et le filtre d'émission) par rapport aux spectres d'absorption et d'émission du marqueur à imager. Le marqueur devra avoir un fort déplacement de Stokes pour que l'on

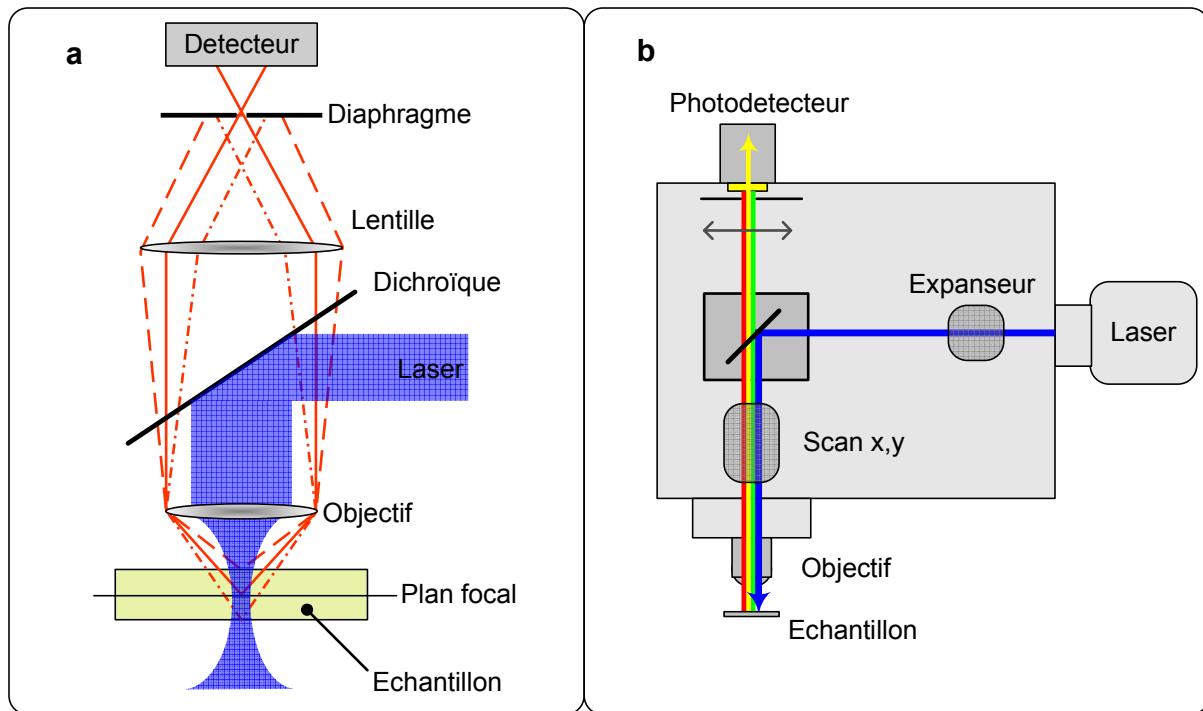
puisse séparer confortablement les lumières d'excitation et d'émission. De plus, avec des marqueurs adaptés, on va pouvoir imager plusieurs structures marquées différemment sur le même échantillon. En choisissant des marqueurs dont les gammes spectrales d'émission et/ou d'absorption ne se recouvrent pas on pourra les imager séparément.

En imagerie de fluorescence, on obtiendra donc des images à fort contraste où seules les structures d'intérêt apparaîtront. On aura également la possibilité de réaliser plusieurs marquages sur un même échantillon. Cependant, cette technique est limitée par les contraintes liées aux marqueurs. La photo-destruction des molécules lors de l'excitation rend difficile les études sur les temps longs. D'éventuels produits de cette photo-destruction peuvent même s'avérer toxiques et venir parasiter l'expérience.

Comme en microscopie classique, la résolution dans le plan imagé va dépendre de l'objectif et de la longueur d'onde observée. On ne pourra pas séparer deux sources d'où provient une lumière de longueur d'onde  $\lambda$  si elles ne sont pas écartées d'une distance supérieure à  $d = 0,61 \lambda / ON$ , avec  $ON$  l'ouverture numérique du microscope. Typiquement, avec un objectif d'ouverture numérique 1 et une longueur d'onde à 500 nm, la résolution théorique sera de 300 nm. Cependant, l'excitation des molécules n'a pas lieu que dans le plan focal de l'objectif et la fluorescence collectée est parasitée par l'excitation d'autres molécules fluorescentes sur le trajet d'excitation. Les échantillons biologiques sont souvent épais (plusieurs dizaines de  $\mu m$ ), il en résulte un flou sur les images et donc une perte de résolution. Cette contrainte limite l'utilisation de la microscopie de fluorescence à quelques échantillons biologiques (souvent des couches très fines) et nécessite souvent un traitement d'image important pour obtenir une image correcte. La microscopie confocale a permis de s'affranchir des photons de fluorescence générés le long du trajet de la lumière d'excitation améliorant ainsi la qualité des images. Avec l'apparition des lasers et le développement de la microscopie à balayage laser on peut maintenant réaliser des images dont la fluorescence provient d'une section assez fine de l'échantillon. Cette technique s'est révélée un outil indispensable en biologie cellulaire et a ouvert la voie à l'utilisation de la microscopie pour l'imagerie intravivale.

### **II.1.2. La microscopie confocale à balayage laser**

Comme le montre la figure II-2a, la microscopie confocale permet de s'affranchir de la lumière de fluorescence parasite en collectant uniquement les photons de fluorescence provenant du plan focal en utilisant un diaphragme conjugué à ce plan.



**Figure II-2 a.** Principe de la microscopie confocale. **b.** anatomie simplifiée d'un microscope confocal à balayage laser.

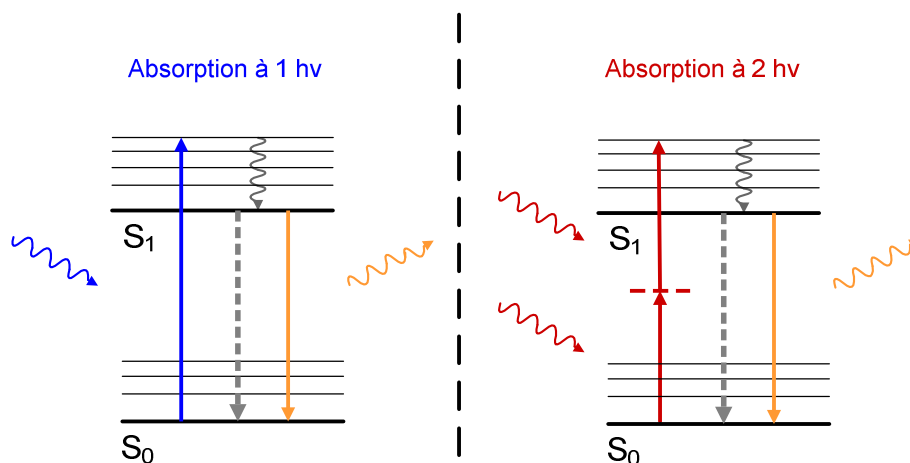
La figure II-2b illustre l'anatomie simplifiée d'un microscope confocal à balayage laser. Le faisceau laser (parallèle) va être réfléchi par un miroir dichroïque. Ensuite, il va être dirigé par des miroirs de scan lui permettant d'arriver sur l'objectif avec différents angles d'incidence. Ainsi, le faisceau laser va pouvoir être focalisé en différents points du plan focal de l'objectif. Pour chaque position des miroirs de scan, la fluorescence émise repasse par les miroirs de scan et est transmise à travers le miroir dichroïque. La lumière est ensuite focalisée sur un photo-détecteur. Un diaphragme placé dans le plan conjugué du plan focal de l'objectif permet alors de ne collecter que la fluorescence émise du point focal. On va pouvoir de cette façon réaliser des images du plan focal point par point. Les images ainsi obtenues peuvent avoir une très bonne résolution. La résolution latérale ne change pas de celle que l'on peut obtenir en microscopie classique mais on obtient des images très nettes car provenant d'une couche très fine. L'épaisseur de cette tranche va dépendre de l'ouverture du diaphragme. En fermant le diaphragme on améliore la finesse de la tranche. Cependant, au-delà d'une limite due à la diffraction la fermeture du diaphragme n'augmentera plus la résolution. La résolution axiale maximale, correspondant à la tranche la plus fine que l'on puisse réaliser va dépendre de l'ouverture numérique de l'objectif (ON), de l'indice de réfraction du milieu (n) sous l'objectif et de la longueur d'onde. Elle est donnée par la formule  $R_{axiale} = 1,4 n \lambda / ON^2$ . Cette résolution reste moins bonne que la résolution dans le plan de l'image mais permet de

distinguer deux plans espacés de  $1\mu\text{m}$ . En faisant varier la profondeur d'observation dans les tissus par translation de l'objectif ou de l'échantillon, on peut obtenir une image tridimensionnelle. Avec un microscope confocal, des observations ont pu être faites jusqu'à  $200\mu\text{m}$  de profondeur dans le cerveau<sup>10</sup>. Cependant, au-delà de cette profondeur, l'épaisseur de tissus traversée ne permet plus d'exciter suffisamment de fluorescence pour pouvoir la détecter. Les tissus biologiques étant très diffusants, une partie de la lumière excitatrice et émise est perdue en traversant l'échantillon. Le développement de la microscopie de fluorescence à deux photons a permis d'améliorer la profondeur d'observation dans les tissus et ainsi de couvrir un plus grand nombre d'applications en imagerie in-vivo.

## II.2. Le Microscope de fluorescence à deux photons

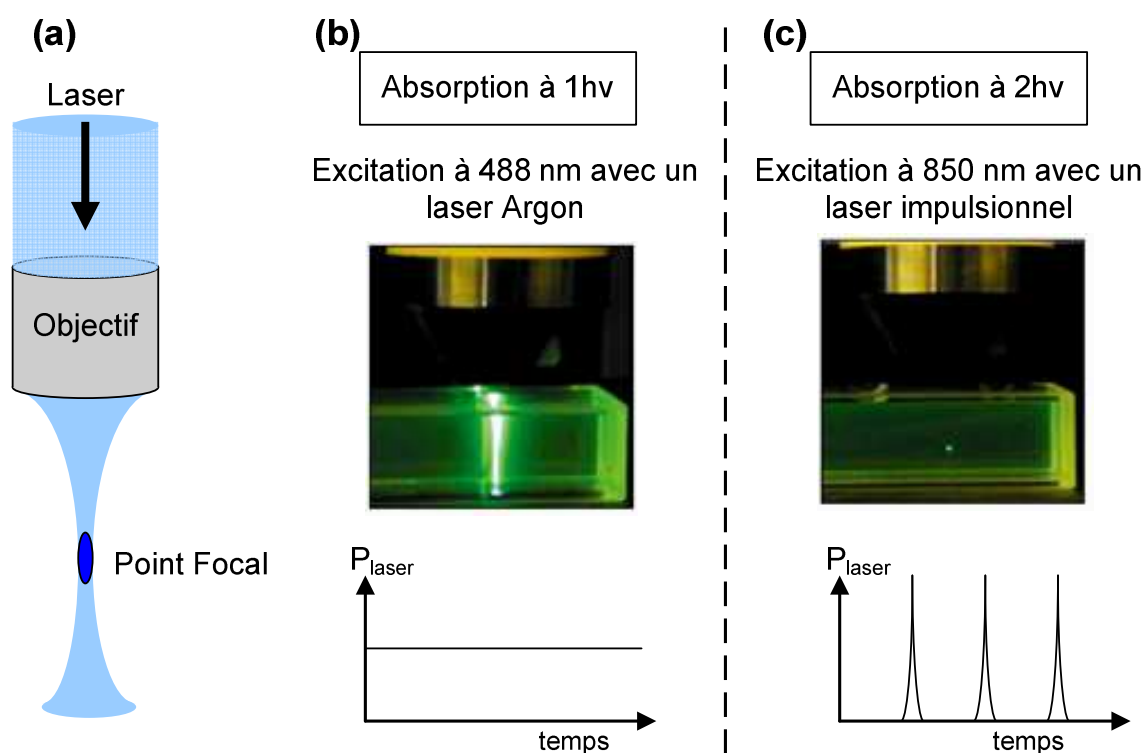
### II.2.1. Principe et description

La microscopie de fluorescence à deux photons tire profit du phénomène non linéaire d'absorption quasi simultanée de deux photons prédit par Göppert-Mayer en 1931<sup>11</sup>. La molécule va passer dans son état excité en passant par un état virtuel suite à l'absorption d'un premier photon. Ensuite, l'absorption d'un deuxième photon lui permet de passer dans son état excité. Comme le montre la figure II-3, une molécule fluorescente pouvant être excitée normalement à une longueur d'onde  $\lambda$  pourra être excitée à deux photons avec une longueur d'onde  $\lambda/2$ .



**Figure II-3.** Diagramme de Jablonski simplifié pour une molécule fluorescente excitée à un ou deux photons

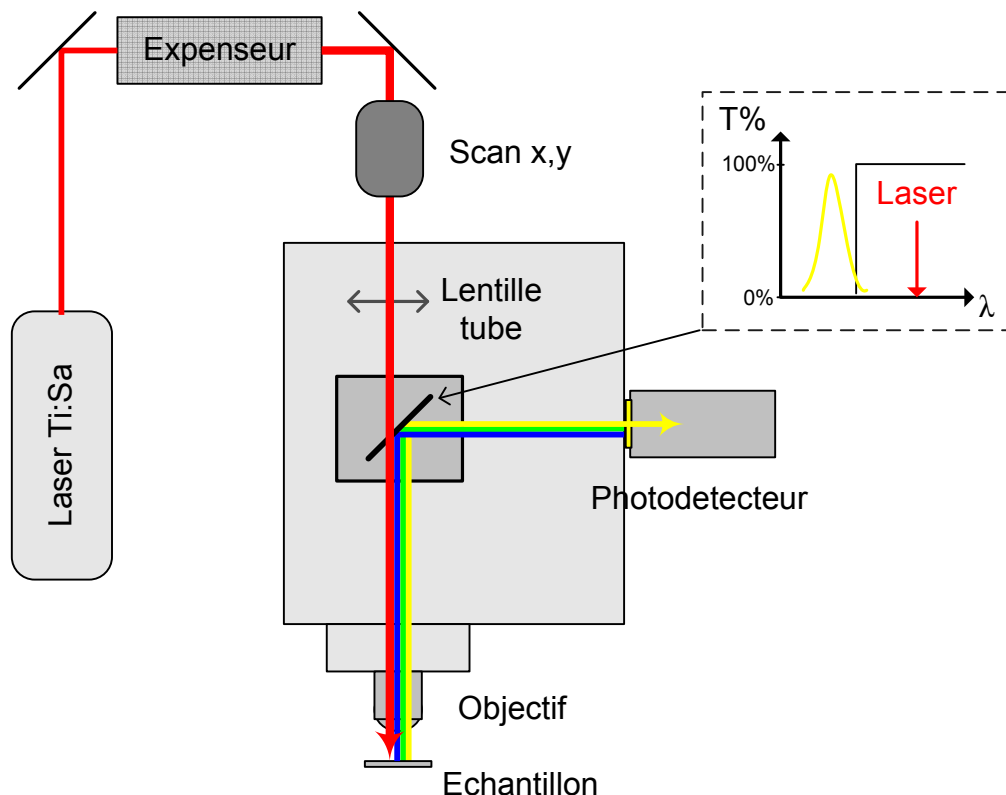
La durée de vie de l'état virtuel est très courte, de l'ordre de la femtoseconde. Il faut donc une très grande densité spatiale et temporelle de photons incidents pour pouvoir exciter la molécule avec deux photons successifs. L'observation expérimentale de ce processus a été faite avec l'apparition dans les années 1960 des lasers impulsionnels grâce auxquels on peut libérer de grandes quantités d'énergie lumineuse sur des durées très courtes. En focalisant ces impulsions lumineuses à travers un objectif on obtient alors une compression spatiale de ces photons. De cette façon, il est possible d'observer des phénomènes d'absorption non-linéaire au point focal du laser (figure II-4c).



**Figure II-4 a.** Représentation schématique du cône d'excitation et du point focal d'un laser focalisé à travers un objectif. **b.** Excitation à un photon d'une solution contenant un chromophore à l'aide d'un laser continu. **c.** La même solution sous excitation par un laser impulsionnel Ti :Sa.

En comparaison avec une excitation à un photon en microscopie confocale (figure II-4b), on n'observe pas de fluorescence le long du cône d'excitation en excitation à deux photons (figure II-4c). Cette propriété permet de réaliser de l'imagerie de fluorescence résolue sans avoir besoin de diaphragme. En 1990, Denk Strickler et Webb ont réalisé le premier microscope à balayage laser utilisant l'absorption à deux photons. Comme le montre la figure

II-5, on retrouve presque les mêmes composants que dans un microscope confocal à balayage laser. Le laser classique est remplacé par un laser impulsif. Ces lasers sont généralement des lasers titanium-saphire (Ti :Sa) utilisant un laser de pompage (souvent  $Nd : YVO_4$ ). Ces lasers existent depuis une vingtaine d'années mais n'ont été rendus fiables et simples d'utilisation que récemment. Ils délivrent des impulsions d'environ 100 fs à une fréquence d'environ 100 MHz. Ils sont accordables en longueur d'onde permettant de couvrir une gamme d'excitation allant environ de 700 nm à 1  $\mu\text{m}$ . Après une mise en forme, le faisceau laser est réfléchi par des miroirs de scan puis passe à travers un miroir dichroïque. Il est ensuite focalisé sur l'échantillon à travers un objectif. La fluorescence émise (à des longueurs d'onde plus petites que la longueur d'onde laser) est ensuite collectée par l'objectif et réfléchi par le miroir dichroïque. La fluorescence étant restreinte uniquement au point focal toute la fluorescence émise peut ensuite être détectée et il n'est pas nécessaire d'utiliser un diaphragme devant le détecteur. L'objectif utilisé doit être choisi pour avoir de bonnes propriétés de transmission dans l'infrarouge.



**Figure II-5.** Vue d'ensemble d'un microscope à deux photons et différence entre les dichroïques utilisés en microscopie confocale ou à deux photons.

La résolution des images que l'on peut obtenir dépend de la distribution de l'intensité lumineuse autour du point focal (de sa géométrie). Elle est fonction de la longueur d'onde d'excitation, de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé et de l'indice de réfraction du milieu :

$$R_{\text{latérale}} = \lambda / (2 \text{ ON}) \text{ et } R_{\text{axiale}} = 1,3 n \lambda / \text{ON}^2$$

On a généralement une résolution latérale d'environ 400 nm et une résolution axiale de 1,5  $\mu\text{m}$ . Cette résolution se dégrade quand on image en profondeur dans les tissus à cause des ruptures d'indices qui créent des aberrations sphériques. En fonction de l'incidence avec laquelle ils arrivent sur l'échantillon, ils ne sont pas focalisés dans le même plan. Au final, la résolution est un peu moins bonne qu'en microscopie confocale. Cependant, la fluorescence ne provenant que du point focal, tous les photons de fluorescences émis peuvent être collectés augmentant la sensibilité de la détection. De plus, le rayonnement infrarouge utilisé en microscopie à deux photons est moins diffusé et absorbé par les tissus que le rayonnement ultra-violet ou visible de la microscopie confocale. La microscopie à deux photons permet ainsi une meilleure profondeur d'observation. Elle permet d'acquérir des images tridimensionnelles jusqu'à plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques et s'est imposée comme une technique de choix pour les études ou intravitales ou ex vivo sur tranche de tissus. On reviendra plus en détail sur les paramètres influençant la profondeur d'observation dans la section II.3.

### II.2.2. Les marqueurs en microscopie à deux photons

On peut utiliser la plus-part des marqueurs fluorescents en microscopie à deux photons. Cependant, certains d'entre eux pourtant très efficaces en microscopie de fluorescence classique ne sont pas de très bons marqueurs à deux photons. La probabilité d'absorber simultanément deux photons de longueur d'onde  $\lambda/2$  n'est pas reliée à celle d'absorber un photon de longueur d'onde  $\lambda$ . Ainsi un marqueur peut avoir une bonne brillance en microscopie de fluorescence classique et une faible efficacité de fluorescence à deux photons.

L'absorption à deux photons est un phénomène non linéaire dépendant du carré du flux de photons incident. On introduit la section efficace d'absorption à deux photons  $\sigma_{2p}$  (en  $\text{cm}^{-4}\text{s}$ ) caractéristique de la probabilité d'absorber simultanément deux photons pour une molécule. Généralement, on exprime  $\sigma_{2p}$  en Göppert-Mayert (GM) avec  $1\text{GM}=10^{-50} \text{ cm}^{-4}\text{s}$ .

Elle relie le nombre de photons absorbés par molécule et par unité de temps au flux de photons incidents  $\Phi$  au carré :

$$N_{abs2P}(t) = \sigma_{2P} \Phi^2(t)$$

Contrairement aux mesures de coefficient d'extinction molaire, les mesures directes de section efficace d'absorption à deux photons sont difficiles à réaliser. On la détermine généralement de manière indirecte en mesurant la fluorescence sous excitation à deux photons:

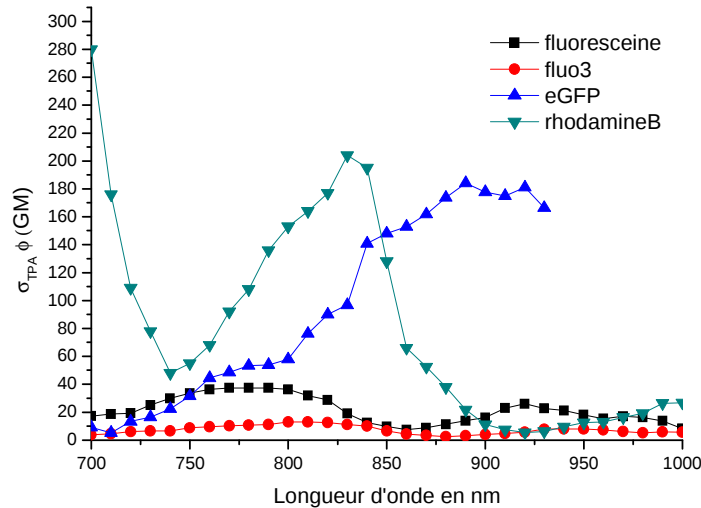
$$I_{fluo}(t) = \frac{1}{2} \eta \sigma_{2P} \Phi^2(t)$$

Avec  $\eta$  le rendement quantique de fluorescence. Le facteur  $\frac{1}{2}$  provient de la nécessité pour la molécule d'absorber deux photons pour en émettre un de fluorescence. Le produit  $\eta \cdot \sigma_{2P}$ , aussi appelé section efficace de fluorescence à deux photons, est caractéristique de la brillance de la molécule sous excitation à deux photons. Pour mesurer  $\sigma_{2P}$ , on compare généralement la fluorescence émise de différents composés sous les mêmes conditions d'excitation. En utilisant des standards de sections efficaces d'absorption à deux photons connues on peut obtenir celle des autres composés<sup>12</sup>. En répétant cette mesure pour différentes longueurs d'ondes, on va pouvoir représenter le spectre d'absorption à deux photons de ces composés.

L'absorption à deux photons de la plupart des marqueurs fluorescents utilisés classiquement en biologie a été caractérisée. Bien qu'ils soient pour la plupart excitable à deux photons, leurs sections efficaces d'absorption sont assez faibles (figure II-6). Utiliser des marqueurs très absorbants à deux photons permet de diminuer les puissances laser lors de l'imagerie et de limiter ses effets indésirables (photodestruction, photodommage des tissus). Dans ce sens, la microscopie à deux photons nécessite le développement de nouveaux marqueurs pour les applications en biologie à partir de molécules spécialement conçues.

Les molécules fortement absorbantes à deux photons possèdent généralement un fort transfert de charge intramoléculaire entre un groupement donneur (D) et un groupement accepteur (A) d'électrons, séparés par un système d'électrons  $\pi$  délocalisables (système conjugué). Ces chromophores de types D- $\pi$ -A sont aussi appelés chromophores « push-pull ». De nombreux chercheurs travaillent au développement de nouvelles molécules combinant une forte section efficace d'absorption à deux photons et un bon rendement quantique de fluorescence<sup>13</sup>. Récemment, des systèmes de type D-  $\pi$ -A- $\pi$ -D (push-push) efficaces ont été

développés<sup>14</sup>. Ces molécules ont généralement des sections efficaces d'absorption à deux photons 100 fois plus importantes que les chromophores classiques.



**Figure II-6.** Section efficaces de fluorescence à deux photons de différents marqueurs classiquement utilisés en biologie. D'après [http://www.drbio.cornell.edu/cross\\_sections.html](http://www.drbio.cornell.edu/cross_sections.html)

### II.3. Utilisation en imagerie du petit animal

L'imagerie du petit animal est un outil très utilisé pour le diagnostic ou le suivi des traitements en recherche médicale. Elle permet de mieux comprendre l'anatomie et la physiologie des organismes vivants. On distingue l'imagerie structurale, qui renseigne sur l'anatomie (volume, position, morphologie...), de l'imagerie fonctionnelle qui renseigne sur le fonctionnement de l'organisme (physiologie, métabolisme...). L'inconvénient majeur en microscopie à deux photons est la profondeur d'observation (quelques centaines de  $\mu\text{m}$ ). Elle dépend majoritairement de l'absorption et de la diffusion par les tissus du laser d'excitation et la fluorescence émise. De ce fait, ce type d'imagerie n'a pas encore trouvé d'application chez l'homme. Elle est cependant de plus en plus utilisée in vivo chez le petit animal. Par rapport aux autres techniques d'imagerie intravitale, le champ et la profondeur d'observation restent très limités. Cependant, la résolution micrométrique des images permet d'observer des phénomènes à l'échelle cellulaire. De plus, la multitude de marqueurs fluorescents offre de

nombreuses applications en imagerie fonctionnelle. Ces caractéristiques en font une méthode d'imagerie intravitale très complémentaire des autres techniques.

### **II.3.1. Les différentes techniques d'imagerie intravitale**

- **Les rayons X :**

La plus ancienne technique d'imagerie intravitale est la radiographie par rayons X. La première radiographie a été réalisée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et cette technique s'est depuis beaucoup développée. Les progrès des techniques en détection des rayons X et l'apparition de l'informatique ont permis depuis l'invention de la tomographie par rayons X grâce à laquelle on peut obtenir des vues en coupes ou en trois dimensions. Cette technique offre un excellent contraste entre les tissus mous et les os mais un faible contraste entre deux tissus mous différents. On peut tout de même utiliser des agents de contrastes comme l'iode ou des molécules à base de métaux lourds mais leur pouvoir contrastant reste faible. Cette technique permet d'obtenir des images sans limite de profondeur avec une résolution de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Cependant la toxicité des rayonnements utilisés nécessite de nombreuses précautions d'emploi.

- **Les ultrasons :**

L'imagerie à base d'ultrasons ou l'échographie est apparue dans les années 1970. Cette technique permet l'imagerie structurelle des tissus mous en se basant sur les différences de densité. Le contraste peut être renforcé par des microbulles. Ce sont généralement des nanoparticules à base d'huile dans laquelle on peut dissoudre du gaz<sup>15</sup>. Cette technique sans aucun danger pour les organismes vivants peut être très résolue (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ). Cependant, sa résolution diminue fortement avec la profondeur d'observation.

- **L'imagerie par résonance magnétique :**

L'imagerie de résonance magnétique (IRM) est également un outil permettant de visualiser les tissus mous. Développé dans les années 1980, il permet d'imager à trois dimensions sans limite de profondeur dans les organismes vivants avec une résolution de l'ordre du  $\text{mm}^3$ . Cette technique, sensible aux atomes d'hydrogène des molécules d'eau, est sans danger pour les

organismes. On peut augmenter le contraste des images en utilisant des nanoparticules paramagnétiques ou des chélates de gadolinium. Le coût très important des dispositifs d'imagerie de résonnance magnétique restreint tout de même l'utilisation de cette technique.

- **L'imagerie nucléaire :**

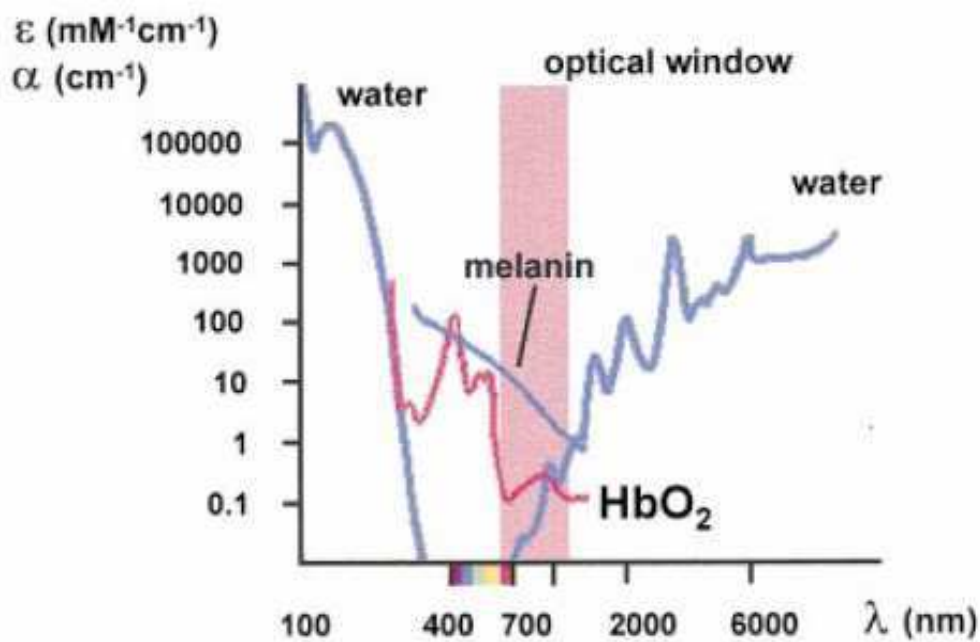
L'imagerie nucléaire est basée sur l'observation de la désintégration d'atomes radioactifs. En fonction du type de radioéléments observés, on distingue la tomographie à émission de positrons (TEP) ou la tomographie par émission monophotonique (TEMP). En TEMP, on utilise des agents de contraste à base de technétium 99, d'indium 111 ou d'iodure 123. Pour le TEP, les radioéléments généralement utilisés sont l'oxygène 15, l'azote 13, le carbone 11 ou le fluor 18. Les radioéléments utilisés en TEP ont des durées de demi-vie généralement courtes (inférieures à 2 heures). Cette technique est une technique d'imagerie très sensible avec une résolution comprise entre 4 et 7 mm. Cependant, les marqueurs sont difficiles et chers à produire et leurs faibles durées de demi-vie nécessitent de les préparer juste avant utilisation. L'utilisation de source radioactive nécessite également de nombreuses précautions d'emploi.

- **La fluorescence :**

Outre la microscopie de fluorescence à deux photons, il existe d'autres méthodes basées sur la fluorescence pour l'imagerie intravitale. La seule utilisée cliniquement depuis 2003 consiste à coupler un microscope confocale à un ensemble de fibres optiques. Cette technique qui permet de réaliser des images par endoscopie est assez invasive. On peut cependant réaliser des images à l'échelle cellulaire à l'intérieur des tissus vivants. Il existe d'autres méthodes utilisées en imagerie du petit animal<sup>16</sup>. Par rapport à l'imagerie de fluorescence par microscopie à deux photons, ces techniques permettent de réaliser des images sur l'animal entier mais avec une faible résolution spatiale. La profondeur observable est également limitée. Leurs avantages principaux sont le faible coût et la rapidité d'acquisition.

### II.3.2. Profondeur d'observation en microscopie à deux photons

Par rapport à toutes ces techniques, la principale limite pour les utilisations *in vivo* de la microscopie de fluorescence à deux photons est la profondeur d'observation. Les contraintes majeures proviennent de l'absorption et de la diffusion de la lumière dans les tissus biologiques. L'absorption par les tissus provient principalement de l'eau, de la mélanine et de l'hémoglobine. Comme on peut le voir sur la figure II-7, il existe une gamme spectrale située entre 650 et 1000 nm où l'absorption des tissus biologiques est minimale<sup>17</sup>. On l'appelle fenêtre de transparence des milieux biologiques. Cependant, le phénomène le plus gênant reste la diffusion de la lumière par les tissus. La diffusion par les tissus est un phénomène qui diminue quand la longueur d'onde augmente. La longueur d'onde du laser d'excitation et la longueur d'onde d'émission de fluorescence des marqueurs ont donc une grande influence sur les profondeurs observables. L'instrumentation utilisée va également pouvoir être modifiée pour améliorer cette profondeur.



**Figure II-7.** Coefficient d'absorption molaire des principaux composants absorbants des milieux biologiques<sup>17</sup>.

### **II.3.2.1. Optimisation de l'excitation**

On doit tenir compte de plusieurs paramètres pour optimiser les profondeurs auxquelles on peut exciter des molécules fluorescentes. Tout d'abord, il faut essayer de minimiser l'absorption et la diffusion du laser par les tissus. Les lasers femtosecondes utilisés permettent de couvrir une gamme spectrale allant de 700 à 1060 nm. Plus récemment, l'utilisation d'oscillateurs paramagnétiques optiques (OPO) permet d'obtenir des longueurs d'onde supérieures (jusqu'à 1200 nm). Leurs longueurs d'onde d'émission se situent donc dans la fenêtre de transparence des milieux biologiques et l'absorption par les tissus n'est pas très gênante. Par contre, la diffusion par les tissus va diminuer pour les grandes longueurs d'onde. Plus la longueur d'onde du laser sera grande plus on pourra imager profondément. Pour choisir cette longueur d'onde il faut, bien entendu, tenir compte des propriétés d'absorption à deux photons des marqueurs utilisés. Comme on l'a vu dans la section II.2.3., le nombre de photons absorbés par les marqueurs va également dépendre de sa section efficace d'absorption à deux photons des marqueurs à la longueur d'onde  $\lambda$ . Il faudra donc trouver un compromis pour exciter efficacement le chromophore à des longueurs d'onde laser les plus grandes possibles. L'intensité du laser est généralement limitée pour ne pas induire de photodommages. On peut cependant monter la puissance d'excitation pour gagner en profondeur. Pour gagner en intensité au point focal sans augmenter la puissance du laser, on peut diminuer la fréquence des pulses laser (augmentation de la puissance crête) où jouer sur le remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif par le faisceau laser. En réduisant la taille du faisceau on va dégrader la résolution mais gagner en intensité au point focal.

### **II.3.2.2. Optimisation de la détection**

La collection des photons de fluorescence émis en profondeur dans les tissus est elle aussi très importante. Les longueurs d'onde des photons de fluorescence sont plus courtes que celle du laser et sont plus diffusées. De même l'absorption par les tissus est plus importante. Il est donc nécessaire d'utiliser des marqueurs dont les longueurs d'onde d'émission se situent le plus possible dans la partie rouge du spectre visible pour imager profondément.

Du point de vue instrumental, l'efficacité de collection va dépendre de l'objectif. Pour pouvoir collecter un maximum de photons il devra avoir un faible grossissement (agrandissement du champ de vue) et une grande ouverture numérique (augmentation de l'angle de détection).

### **II.3.3. Imagerie cérébrale**

La microscopie à deux photons a trouvé de nombreuses applications en recherche médicale. Des modèles animaux ont été mis en place pour permettre d'imager *in vivo* différents organes. La microscopie à deux photons est notamment très utilisée en neuroscience<sup>18</sup>. On peut imager les différents composants du cortex cérébral en réalisant un marquage adapté. La méthode reste traumatisante pour l'animal car on doit s'affranchir d'une partie de la boîte crânienne trop diffusante. Cette technique permet de réaliser une cartographie des différents types cellulaires présents<sup>19</sup> ou d'avoir accès aux paramètres hémodynamiques<sup>20</sup> en profondeur dans le cortex.

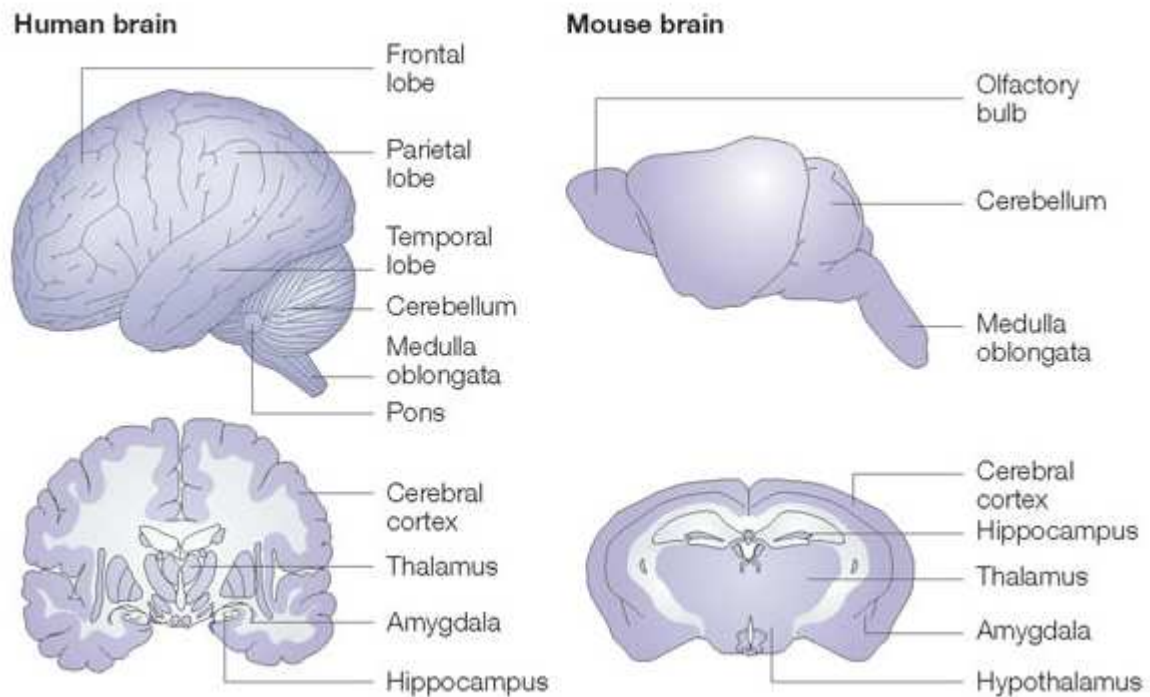
Après une brève description des différents composants du cerveau on s'intéressera aux éléments présents dans le cortex et aux différentes stratégies de marquage pour les révéler. Ensuite, le modèle animal utilisé sera décrit avant de donner des exemples d'études réalisées dans le cerveau en microscopie à deux photons.

#### **II.3.3.1. Le cortex cérébral**

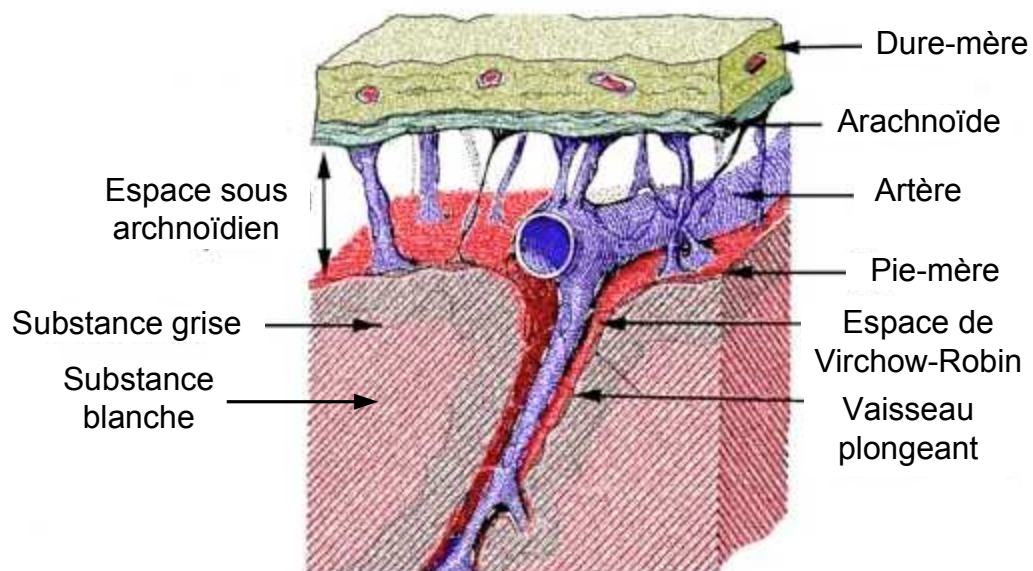
L'étude du cerveau du petit animal est très utile à la compréhension du cerveau humain. Comme le montre la figure II-8, on retrouve de nombreuses similitudes d'un individu à l'autre<sup>21</sup>. Le cerveau constitue avec la moelle épinière le système nerveux central. Il se divise en plusieurs parties. Le télencéphale (ou hémisphères cérébraux) représente la partie la plus volumineuse du cerveau. Il est composé en périphérie de substance grise, constituée de neurones et de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, cellules de Schwann, cellules microgliales et cellules épendymaires). L'ensemble de cette substance grise est appelée le cortex cérébral. Le cortex est protégé de la boîte crânienne par les méninges. Les méninges sont divisées en trois couches (figure II-9) :

- La dure-mère, feuillet épais et résistant qui adhère au crâne. Elle est située au dessus des sinus veineux qui drainent les veines cérébrales.
- L'arachnoïde qui tapisse la face interne de la dure-mère
- La pie-mère, feuillet très fin et transparent qui adhère à la surface du cerveau.

On définit également plusieurs espaces dont l'espace sous-arachnoïdien (entre l'arachnoïde et la pie-mère) où circulent le liquide cérébro-spinal, les veines et les artères.



**Figure II-8.** Comparaison entre le cerveau du rongeur et le cerveau humain (d'après <sup>21</sup>).



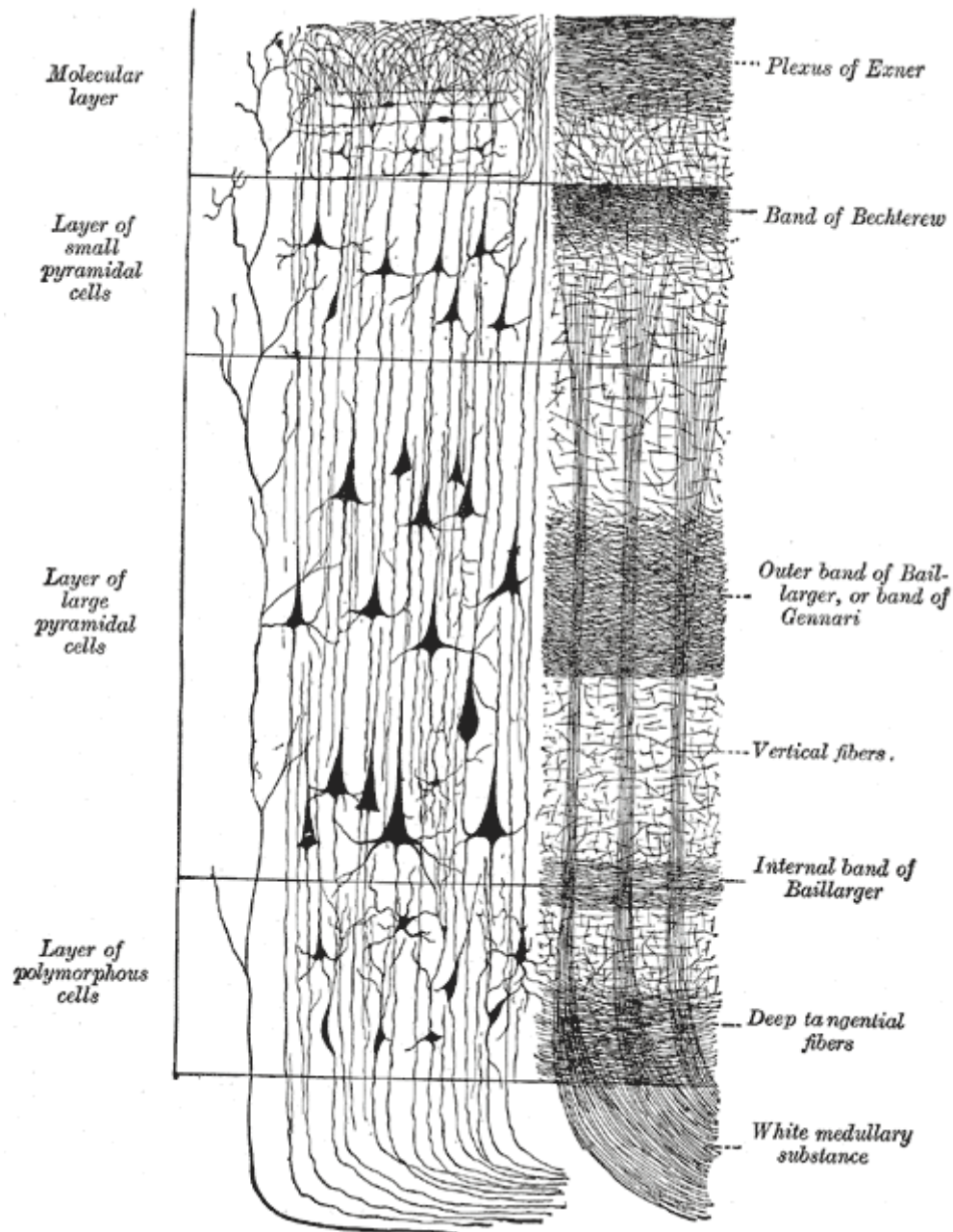
**Figure II-9.** Organisation des méninges.

A l'intérieur du cortex cérébral, les neurones s'organisent en unités fonctionnelles perpendiculaires à la surface du cortex appelées colonnes corticales. Elles se divisent en plusieurs couches ayant différentes fonctionnalités (figure II-10) :

- La couche moléculaire contient des axones et des dendrites de neurones des couches internes. Elle comporte peu de cellules (essentiellement des astrocytes).
- La couche granulaire externe contient des neurones granulaires. Elle reçoit les afférences d'autres aires du cortex.
- La couche pyramidale externe est constituée de neurones pyramidaux. Elle émet des connexions vers d'autres zones du cortex cérébral.
- La couche granulaire interne contient des neurones étoilés et pyramidaux. C'est par cette couche que les informations en provenance de l'extérieur du cortex entrent dans le cortex. Elle reçoit aussi les afférences en provenance de l'autre hémisphère cérébral.
- La couche pyramidale interne est composée de gros neurones pyramidaux, généralement des neurones moteurs.
- La couche polymorphe, la couche la plus interne à l'état adulte. Elle envoie des prolongements axonaux en direction du thalamus permettant une rétroaction sur les entrées du cortex cérébral.

On trouve également à l'intérieur de toutes ces couches des cellules gliales. Elles ont un rôle très important dans le fonctionnement du cerveau. Elles remplissent de nombreuses fonctions: guide de migration, développement neuronal, myélinisation, compartimentalisation, soutien, homéostasie ionique, régulation du pH, recyclage des neurotransmetteurs, défense immunitaire, plasticité synaptique...

Certaines pathologies liées au cerveau (Alzheimer, épilepsie...) sont à l'origine de dysfonctionnement dans le cortex cérébral. Grâce aux études en microscopie à deux photons on peut mieux comprendre les mécanismes d'action de ces pathologies. Elles permettent de réaliser une cartographie des différents types cellulaires présents ou de réaliser de l'imagerie fonctionnelle dans le cortex<sup>22</sup>. Pour réaliser ces études, on peut utiliser les marqueurs classiquement utilisés in vitro. Cependant, le marquage des tissus en profondeur est souvent plus délicat.

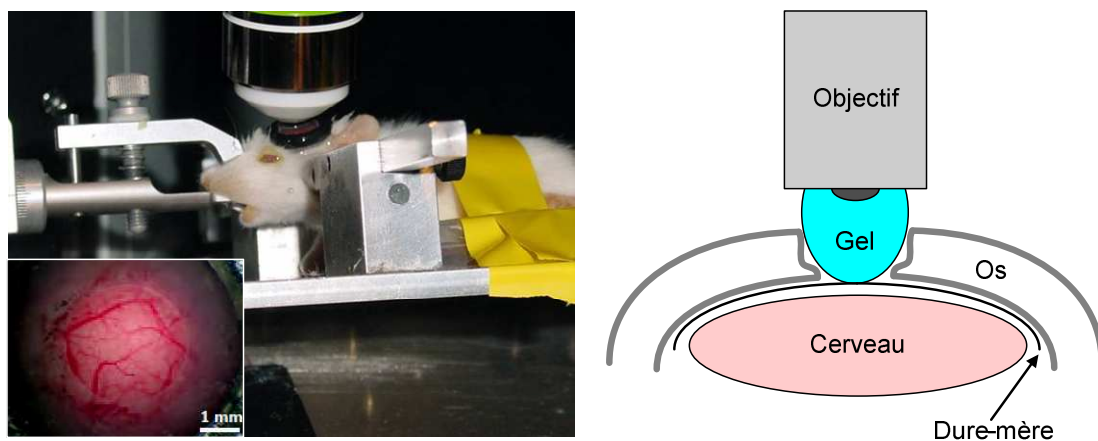


**Figure II-10.** Représentation schématique des différentes couches d'une colonne corticale (d'après wikipedia)

### II.3.3.2. Marquage et modélisation animale

On peut marquer différents corps cellulaires en injectant des marqueurs dans la circulation sanguine. Outre son affinité pour un type cellulaire ou une fonction cellulaire précise, le marqueur doit pouvoir accéder au tissu d'intérêt. Certaines petites molécules vont diffuser à travers les vaisseaux sanguins pour marquer des cellules en contact avec la

vascularisation. C'est le cas par exemple de la sulfo-rhodamineB (SRB) qui va s'accumuler de manière spécifique dans les astrocytes via les pieds astrocytaires en contact avec la vascularisation<sup>23</sup>. On peut également réaliser de l'imagerie des flux calciques en utilisant des marqueurs comme le Fluo-4 qui vont s'accumuler dans certains types de neurones. Ces marquages restent plus difficiles à mettre en œuvre *in vivo* qu'*in vitro*. Les modèles transgéniques sont aussi très utiles. On dispose ainsi de modèles permettant d'exprimer des GFP à l'intérieur des différents types de cellules gliales. De même, l'auto fluorescence ou la génération de seconde harmonique (SHG) peuvent être très utiles pour réaliser de l'imagerie structurelle<sup>24</sup>. Enfin, on peut injecter des marqueurs fluorescents non diffusibles pour venir imager la vascularisation<sup>25</sup>. On reviendra plus en détail sur l'intérêt de l'imagerie de la vascularisation cérébrale dans le Chapitre III.



**Figure II-11.** Observation dans le cortex de la souris en microscopie à deux photons

Les souris sont généralement utilisées pour ces études en microscopie à deux photons du fait du grand nombre de modèles transgéniques qui ont été développés. On retrouve des modèles de différentes neuropathologies comme les tumeurs cérébrales<sup>26</sup>, Alzheimer<sup>27</sup> ou l'épilepsie<sup>28</sup>. De plus chez les souris, la dure-mère est peu opaque et permet une profondeur d'observation. Pour pouvoir imager dans le cortex (figure II-11), il faut s'affranchir de l'os de la boîte crânienne, très diffusant. On retire généralement une partie de l'os à la verticale du cortex. On vient ensuite placer l'objectif en immersion dans du liquide physiologique ou un gel échographique. Pour l'imagerie, la principale difficulté consiste à immobiliser l'animal. La durée d'acquisition d'une image étant d'environ 1 seconde, on doit s'affranchir des mouvements parasites de l'animal (surtout la respiration). Pour cela, la tête de l'animal est

généralement immobilisée dans un cadre stéréotaxique. L'utilisation d'une anesthésie appropriée permet aussi de limiter ces mouvements. Les anesthésies volatiles comme l'isoflurane offrent de bons résultats.

#### **II.3.4. Imagerie des tumeurs**

La microscopie à deux photons peut être également utile pour l'étude des tumeurs. Elle permet d'obtenir des informations sur leur développement ou la réponse de la tumeur à un traitement à l'échelle cellulaire<sup>29</sup>. Les principales applications concernent l'imagerie de la vascularisation tumorale.

##### **II.3.4.1. Modélisation animale**

Il existe de nombreux types de tumeurs. Pour les modéliser, on greffe des cellules ou des explants tumoraux dans des souris nude. Ces souris ont un système immunitaire déficient dépourvu de lymphocytes T. De cette façon, elles ne reconnaissent pas les cellules cancéreuses. On distingue deux types de greffes :

- Orthotopiques : La tumeur est implantée dans son environnement physiologique.

- Hétérotopiques : La tumeur est implantée dans un environnement différent.

En microscopie à deux photons, on travaille généralement sur des greffes hétérotopiques pour faciliter l'accès optique à la tumeur. On greffe la tumeur dans des espaces sous cutanés. On peut ensuite l'observer en enlevant la peau très diffusante. Il est important d'implanter la tumeur dans des zones bien vascularisées pour que la greffe prenne.

Un autre modèle permet de réaliser un suivi longitudinal des tumeurs après leur implantation ou après un traitement. Pour cela, on met en place des fenêtres dorsales permettant d'observer la tumeur sous une lamelle de quartz. On reviendra plus en détail sur la mise en place de ces modèles dans le Chapitre VI.

#### **II.3.4.2. Exemples d'applications**

La principale application de l'imagerie des tumeurs en microscopie à deux photons est le suivi de la vascularisation tumorale. On peut utiliser des marqueurs intravasculaires pour visualiser la néo-vascularisation tumorale. La formation et le développement de ces vaisseaux, aussi appelés angiogénèse, est un phénomène clef dans le développement des tumeurs. L'observation en microscopie à deux photons de la vascularisation tumorale peut permettre d'étudier ce phénomène in vivo à l'échelle microscopique. De plus, de nombreux traitements anti cancéreux ont pour cible la vascularisation tumorale. La microscopie à deux photons peut permettre d'analyser les lésions provoquées dans la vascularisation et de mieux comprendre l'action de ces traitements.

## **Chapitre III. Les marqueurs intravasculaires pour la microscopie à deux photons**

Dans la plus-part des pathologies et leur traitement, la vascularisation joue un rôle important. Mieux comprendre ce rôle peut aider à améliorer la qualité des traitements. Le marquage de la vascularisation est assez simple à mettre en œuvre. Il consiste injecter des marqueurs fluorescents de poids moléculaire élevé (macromolécules ou nanoparticules) dans le sang. En microscopie à deux photons, on va pouvoir obtenir ainsi des mesures du volume sanguin<sup>25</sup> ou de la perméabilité vasculaire<sup>30</sup>.

Pour mieux comprendre les caractéristiques nécessaires des marqueurs pour l'imagerie de la vascularisation, on s'intéressera dans un premier temps aux contraintes liées à l'environnement intravasculaire avant de rentrer plus en détail sur l'intérêt de l'imagerie de la vascularisation en médecine. Ensuite, on verra quels sont les marqueurs intravasculaires fluorescents disponibles et quels sont leurs limites. Enfin, on abordera les différentes stratégies possibles pour faire des marqueurs intravasculaires.

### **III.1. Contraintes liées à l'environnement**

#### **III.1.1. Le sang**

Une fois injectés dans la circulation sanguine, les marqueurs vont se retrouver mélangés au sang. Le sang est un fluide servant à véhiculer l'oxygène et les nutriments vers les tissus biologiques. Il est également impliqué dans le système immunitaire. Il est composé en majorité de globules rouges baignant dans un liquide appelé plasma sanguin. Les globules rouges transportent l'hémoglobine, une protéine capable de transporter l'oxygène aux cellules et de capter le dioxyde de carbone issu de la respiration cellulaire. Ils représentent 45% du volume sanguin total. On retrouve également dans le sang des globules blancs ou leucocytes, beaucoup moins nombreux (0,2% du nombre total de globules). Ils regroupent l'ensemble des cellules du système immunitaire (granulocytes, lymphocytes et monocytes). On y retrouve enfin des plaquettes. Elles servent à initier la polymérisation du fibrinogène, protéine présente dans le plasma, et sont ainsi responsables de la coagulation sanguine.

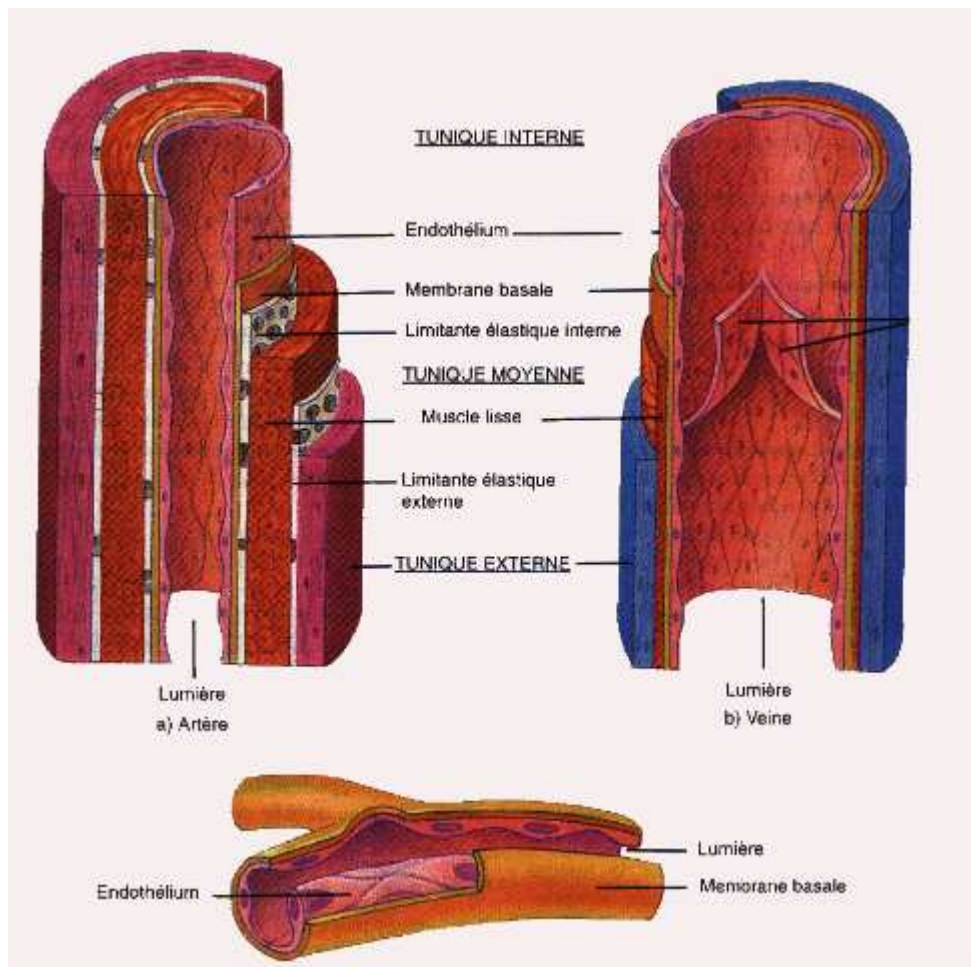
Le plasma sanguin est une solution aqueuse (91% d'eau) contenant de nombreuses petites molécules. Il contient de nombreuses substances en transit comme les nutriments (glucose, lipide, acide aminés), les hormones ou les déchets métaboliques. Il contient également de

nombreuses protéines ayant vocation à rester dans le sang. Certaines aident à la régulation du pH aux alentours de 7,4 et de la pression osmotique. D'autres comme les anticorps jouent un rôle dans le système immunitaire. Malgré les protéines permettant de réguler le pH et la pression osmotique dans le sang, il est important de ne pas trop modifier ces conditions en injectant les marqueurs.

### **III.1.2. La vascularisation**

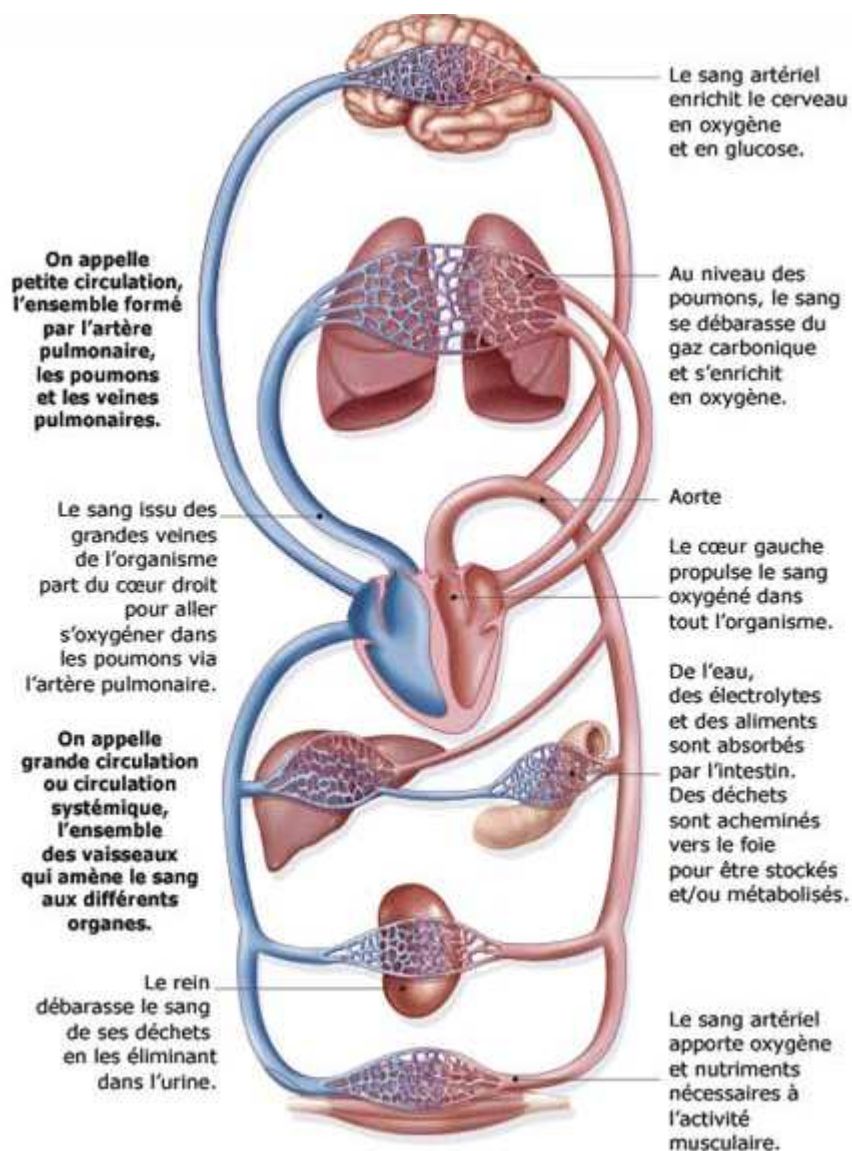
La vascularisation est un réseau fermé de vaisseaux sanguins permettant le transport du sang vers les tissus par l'intermédiaire du cœur. Comme le montre la figure III-1, elle est composée de trois types de vaisseaux sanguins: les artères, les veines et les capillaires. Les artères sont des vaisseaux sanguins très larges transportant le sang oxygéné du cœur vers les tissus et les cellules de l'organisme. Les veines sont des vaisseaux chargés de transporter le sang pauvre en oxygène et les déchets du métabolisme vers le cœur. Le cœur des vaisseaux, où circule le sang est appelé lumière. La lumière est entourée par l'endothélium, un ensemble de cellules permettant de faire une paroi plus ou moins étanche. Dans les veines et les artères, on retrouve autour de l'endothélium des muscles lisses et un tissu conjonctif permettant aux vaisseaux de se contracter ou de se dilater. Les artères transportent le sang sous haute pression et, par conséquent, leurs parois sont beaucoup plus épaisses et élastiques que celles des veines. Les capillaires relient les artères et les veines aux tissus de l'organisme et sont le siège de l'échange entre l'oxygène et le dioxyde de carbone. Ils sont beaucoup plus petits que les veines et les artères. Ils possèdent seulement une paroi endothéliale entourée d'une couche de cellules, les péricytes, capable de se contracter pour permettre de réguler le débit sanguin. Les péricytes ont également un rôle immunitaire (macrophagique).

On injecte généralement les marqueurs dans la veine caudale de la souris. Comme le montre la figure III-2, ils vont alors remonter dans le cœur droit et partir en direction des poumons. Ils retournent ensuite dans le cœur gauche avant d'être envoyés dans l'aorte. Les marqueurs vont ainsi partir en direction des différents organes avant de retourner au cœur par les veines et d'entamer un nouveau cycle.



**Figure III-1.** Structure des vaisseaux sanguins d'après <http://bio.m2osw.com/>

La petite taille des capillaires ( $4\text{ }\mu\text{m}$  chez l'homme,  $3\text{ }\mu\text{m}$  chez la souris) induit des critères de sélection pour les marqueurs. Généralement, les marqueurs de diamètre supérieur à  $100\text{ nm}$  vont s'accumuler et boucher ces petits vaisseaux. Les marqueurs de taille moléculaire vont eux diffuser à travers la paroi endothéliale et s'accumuler dans les tissus. Pour avoir un marqueur stable dans le sang, il faut généralement une taille supérieure à quelques nanomètres.



**Figure III-2.** Schéma de la circulation sanguine. D'après <http://www.santea.com>

### III.1.3. L'élimination par le sang

Les organismes indésirables sont généralement pris en charge par le système réticuloendothélial ou excrétés par les reins ou dans une moindre mesure le foie. Les reins sont les principaux organes d'excrétion. Ils permettent de filtrer le sang et de n'y réintégrer que certains éléments. La vascularisation dans les reins comporte des pores d'environ 60 nm recouverts d'un diaphragme bouchant une partie de l'ouverture<sup>31</sup>. Il permet de filtrer ainsi la plus-part des petites molécules présentes dans le sang mais ne permet pas d'éliminer les particules de taille importante. Leur élimination est souvent liée à d'autres processus mettant en jeu le système réticuloendothélial.

Le système réticuloendothélial permet l'élimination des corps étrangers et des cellules sanguines en fin de vie. Au cours de leur transit dans le sang, les corps indésirables vont être marqués par des anticorps. Ils seront ensuite reconnus par des macrophages puis internalisés avant d'être dégradés ou stockés.

Le foie est lui aussi responsable d'une partie de l'élimination des nanoparticules du sang. Sa vascularisation possède des porosités de 100 à 300 nm de diamètre dépourvues de diaphragme qui représentent environ 6 à 8 % de la surface des vaisseaux sanguins<sup>32</sup>. Ainsi, des nanoparticules peuvent passer dans le foie.

#### **III.1.4. Résumé**

Comme on l'a vu, après injection, les marqueurs ne doivent pas modifier les paramètres sanguins comme le pH ou la pression osmotique. De plus, les marqueurs doivent pouvoir circuler dans le sang sur des durées assez longues. Pour cela, ils devront avoir une taille allant de quelques nanomètres à 100 nanomètres. On doit ajouter à cela toutes les propriétés d'un bon marqueur fluorescent à deux photons. Le marqueur devra avoir une bonne section efficace de fluorescence à deux photons à des longueurs d'onde comprises entre 800 et 1000 nm, et une longueur d'onde d'émission de fluorescence le plus proche possible de la partie rouge du spectre visible. On retrouve en majorité de l'hémoglobine dans le sang qui est très absorbante dans le visible. Plus les marqueurs émettront à des grandes longueurs d'onde moins la fluorescence sera réabsorbée.

### **III.2. Intérêt de l'imagerie de la vascularisation en microscopie à deux photons**

En utilisant ces marqueurs avec des modèles comme ceux décrits dans le chapitre II, on peut obtenir des informations sur les paramètres hémodynamiques et la structure des vaisseaux dans différents environnement in vivo avec une résolution micrométrique.

### **III.2.1. La vascularisation cérébrale**

L'imagerie de la vascularisation cérébrale en microscopie à deux photons peut par exemple être utile pour mesurer la densité vasculaire dans le cortex. Cette mesure, ainsi que l'observation de l'architecture formée par les vaisseaux permet de mieux comprendre la relation entre le sang et le cerveau. On peut généralement relier la concentration en neurones à la densité vasculaire dans le cortex<sup>19</sup>.

La vascularisation cérébrale possède également une paroi vasculaire plus compliquée. Elle a pour rôle de réguler les échanges entre le sang et le cerveau. On l'appelle barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière est en principe très imperméable. En microscopie à deux photons, on peut observer la perméabilité de la BHE en mesurant la quantité de marqueurs qui a fui à l'extérieur des vaisseaux. Ces mesures peuvent être utiles pour observer et mieux comprendre les effets des radiothérapies sur le cerveau par exemple<sup>29</sup>.

### **III.2.2. La vascularisation tumorale**

Comme on la vu dans le chapitre précédent, la vascularisation joue un rôle primordial dans le développement des tumeurs. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur (angiogenèse tumorale) est un événement décisif dans sa croissance<sup>33</sup>. L'imagerie de la vascularisation en microscopie à deux photons permet de visualiser ces phénomènes améliorant ainsi nos connaissances sur l'angiogenèse tumorale<sup>34</sup>. Les traitements anti cancéreux ont également de plus en plus comme cible la vascularisation dans la tumeur<sup>35</sup>. L'utilisation de marqueurs intravasculaires fluorescents permet de visualiser en temps réel l'action de ces traitements pour permettre de mieux comprendre leurs mécanismes d'actions et de les améliorer.

Il est cependant établi que les vaisseaux sanguins des tumeurs sont mal développés avec un endothélium discontinu. Ainsi, la vascularisation tumorale est très perméable aux macromolécules<sup>36, 37</sup>. Cette perméabilité entraîne une diffusion des colorants à travers la paroi des vaisseaux sanguins de la tumeur. Cette diffusion peut être gênante pendant le suivi de la vascularisation tumorale sur des durées importantes<sup>38</sup>. On peut cependant utiliser des marqueurs fluorescents de taille plus importante pour limiter la diffusion du colorant dans les tissus de la tumeur.

### III.3. Marqueurs existants

Les marqueurs les plus utilisés en imagerie de la vascularisation par microscopie à deux photons sont des macromolécules composées de sucres (Dextrans) sur lesquelles ont été greffées des molécules fluorescentes. On retrouve généralement des Dextrans fonctionnalisés par des fluorophores classiques comme la Rhodamine B ou la Fluorescéine. Il en existe de différents poids moléculaire (de quelques kDa à 500 kDa), cependant, la solubilité des plus gros Dextran reste limitante pour les applications d'imagerie de la vascularisation. Typiquement, le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre de glucose est de 1 pour 250. Au-delà, la solubilité et les propriétés de fluorescence des objets vont généralement diminuer. Le gros avantage de ces marqueurs est leur biocompatibilité. Ils sont sans danger pour l'homme et les organismes vivants en général. Les sucres peuvent facilement être éliminés par l'organisme, et les chromophores greffés à leur surface sont généralement bien connus pour être biocompatibles. Cependant, leur efficacité d'absorption à deux photons n'est pas toujours optimum, ce qui nécessite d'injecter de grandes quantités de colorants.

Les quantum dots peuvent être aussi utilisés pour l'imagerie de la vascularisation en microscopie à deux photons<sup>39</sup>. Leur grande efficacité de fluorescence permet d'imager efficacement la vascularisation avec des quantités faibles de marqueurs. Généralement leur potentielle toxicité et leur coût élevé sont un frein à leur utilisation. Il existe également d'autres types de nanoparticules fluorescentes commerciales permettant de couvrir ces applications. Tout comme les quantum dots, leur usage est limité à l'imagerie du petit animal. Leur comportement dans les organismes (excrétions, modification de certaines fonctions biologiques...) doit être approfondi avant de généraliser leur usage.

D'une manière plus générale, la plus-part des nanoparticules fluorescentes à base de fluorophores efficaces à deux photons vont permettre de couvrir ces applications. La difficulté principale est de les rendre inertes du point de vue physiologique et non toxiques. Il existe de nombreuses méthodes pour faire des nanoparticules pour les applications en biologie. Nous allons voir dans le chapitre suivant les différentes stratégies de synthèse de nanoparticules et leur potentiel en médecine en général.

## **Chapitre IV. Les nanoparticules pour la médecine**

Comme on l'a vu précédemment, en transportant un agent de contraste, les nanoparticules peuvent être utilisées en imagerie médicale comme marqueurs pour l'imagerie de la vascularisation. Leurs bonnes propriétés de circulation dans le sang peuvent également servir à transporter d'autres substances actives à l'intérieur des organismes vivants<sup>40</sup>. Par exemple, avec une fonctionnalisation adaptée, on peut envisager le transfert ciblé de molécules actives vers des cellules pathologiques. Ce ciblage doit permettre de faciliter la détection des pathologies en utilisant des agents de contraste, ou d'emmener directement des médicaments vers ces pathologies<sup>41</sup>. Ces utilisations entraînent déjà, notamment en cancérologie, une diminution des doses prescrites, une baisse de la toxicité et une meilleure tolérance thérapeutique des traitements. Dans ce sens, la recherche et le développement de nanoparticules et de stratégies de ciblage ouvrent un grand champ de recherche dans la localisation et le traitement des maladies.

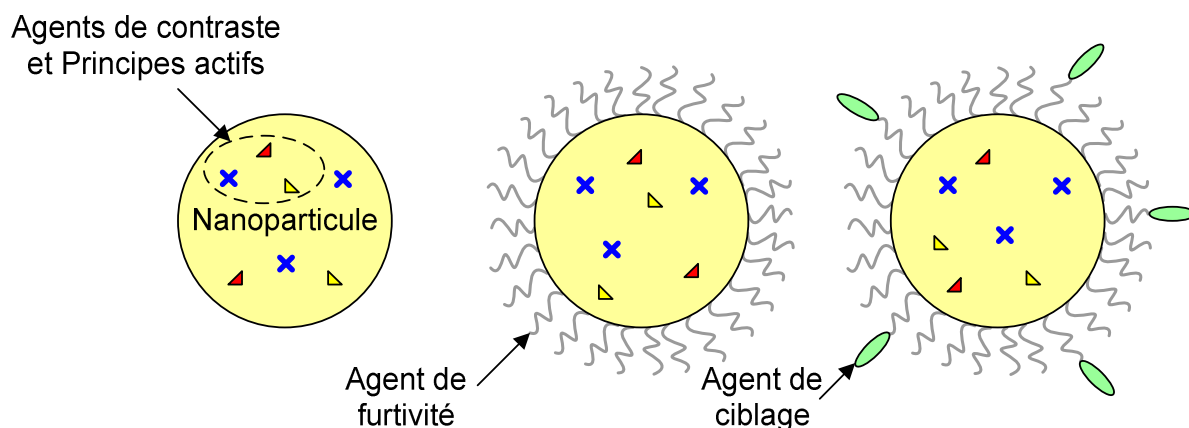
Dans ce chapitre, on définira dans un premier temps le concept des nanoparticules pour la médecine et leur intérêt. On énumèrera ensuite les différents types de nanoparticules utilisés en médecine ou en cours de développement. Enfin, des exemples de produits disponibles commercialement pour des usages médicaux seront donnés.

### **IV.1. Description générale et intérêt**

Les nanoparticules sont assez volumineuses et possèdent une grande surface fonctionnelle. Elles permettent l'encapsulation ou le greffage de plusieurs molécules ayant différentes fonctions sur un même objet. Pour être utiles au transport de drogue, elles doivent dans un premier temps permettre à l'agent d'intérêt de ne pas être bloqué par les barrières physiologiques, avant de délivrer cet agent de manière spécifique aux cellules pathologiques. On peut pour cela modifier leur surface avec des agents de furtivité et des agents de ciblage (figure IV-1).

Il existe de nombreux types de nanoparticules qu'on énumèrera par la suite. Depuis leurs premières utilisations en biologie, les nanoparticules ont beaucoup évolué. La première difficulté est de concevoir des objets de petite taille pouvant incorporer des molécules actives. Comme dans le cas des marqueurs pour l'imagerie de la vascularisation, les objets doivent

être suffisamment petits pour envisager une administration intra vasculaire. Ensuite, il est important que les particules ne soient pas évacuées rapidement de l'organisme, notamment par le système réticuloendothélial. Pour pallier à cet inconvénient, on utilise des objets dont la surface les rend furtifs, c'est-à-dire non détectables par les anticorps du système réticuloendothélial. On utilise des nanoparticules dont la surface est généralement couverte de Polyéthylène Glycol (PEG), ou d'autres molécules empêchant, par effet de répulsion stérique, la fixation d'autres objets comme les anticorps sur les nanoparticules<sup>42</sup>. Enfin, pour être utiles à la détection ou au traitement d'une pathologie, les nanoparticules doivent avoir une affinité pour celle-ci.



**Figure IV-1.** Evolutions possibles des nanoparticules pour la médecine

De nombreuses stratégies de ciblage des nanoparticules vers des pathologies sont étudiées. La plus simple est d'utiliser la perméabilité de l'endothélium vasculaire présent dans certaines maladies. C'est le cas des tumeurs par exemple dont l'endothélium est plus perméable en raison de la réaction inflammatoire et de la désorganisation vasculaire due au cancer. En utilisant des particules de taille adaptée, elles ne traverseront pas l'endothélium vasculaire sain, et vont s'accumuler dans les tumeurs. Cet effet est appelé EPR (« Enhanced and Permeability Retention effect »). De nombreuses autres stratégies en cours d'étude consistent à rajouter à la surface des nanoparticules un agent de ciblage, qui peut être par exemple le ligand d'un récepteur, l'anticorps contre une protéine surexprimée dans les tissus visés ou un oligonucléotide<sup>43</sup>.

Classiquement, les agents thérapeutiques à transporter sont essentiellement des molécules organiques. On peut également transporter des protéines, des peptides ou de l'ADN ou de l'ARN pour les thérapies géniques. Les nanoparticules peuvent aussi être utilisées pour transporter des agents thérapeutiques photo-activables :

- En photoactivation par rayon X, on va transporter un élément lourd (Pt, Gd...) vers des cellules tumorales. En irradiant ensuite les cellules avec un rayonnement X adapté on va pouvoir détruire ces cellules. Les éléments lourds ayant absorbé des rayons X émettent des sous produits toxiques et des rayonnements nuisibles pour les cellules<sup>29</sup>.

- En hyperthermie, il s'agit de transporter des agents permettant de convertir un rayonnement lumineux, souvent infra rouge, en chaleur. On utilise généralement des particules métalliques ou des oxydes de fer. Lors de l'irradiation, les cellules seront détruites par l'élévation locale de la température<sup>44</sup>.

- En photothérapie dynamique (PDT), on va transporter des photosensibilisateurs. Ces molécules vont produire de l'oxygène singulet qui va induire les cellules quand on les irradie<sup>45</sup>.

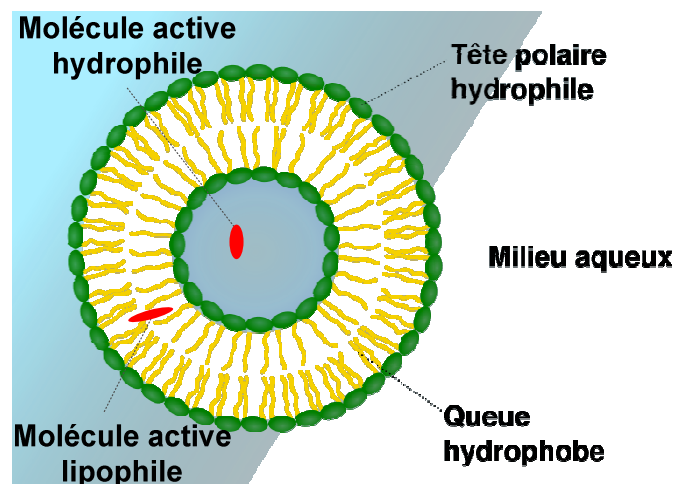
## **IV.2. Les différents types de nanoparticules**

L'appellation nanoparticules est uniquement basée sur la taille (de quelques nm à quelques centaines de nm). Il en existe actuellement une très grande variété dont la composition peut être très variable. On distingue les nanoparticules organiques des nanoparticules inorganiques. Une grande partie des nanoparticules inorganiques possèdent intrinsèquement des propriétés thérapeutiques (particules métalliques ou magnétiques) ou diagnostiques (cristaux semi-conducteurs, particules magnétiques). En revanche, les particules organiques sont dépourvues de telles propriétés. Généralement, elles permettent de protéger les agents thérapeutiques ou de contraste qu'elles doivent véhiculer vers une zone de l'organisme pour éventuellement les relarguer.

#### IV.2.1. Les nanoparticules organiques

- **Les liposomes :**

Les liposomes sont des vésicules artificielles constituées d'une bicouche de molécules amphiphiles encapsulant un réservoir aqueux. Comme le montre la figure IV-2, elles peuvent transporter des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux ou des molécules lipophiles à l'intérieur de la bicouche de phospholipides. Il existe différents procédés pour obtenir des liposomes, on les obtient généralement en mélangeant des phospholipides dans l'eau. Les phospholipides se regroupent pour former des vésicules de manière à minimiser les interactions hydrophobes. Leur taille peut varier de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres.

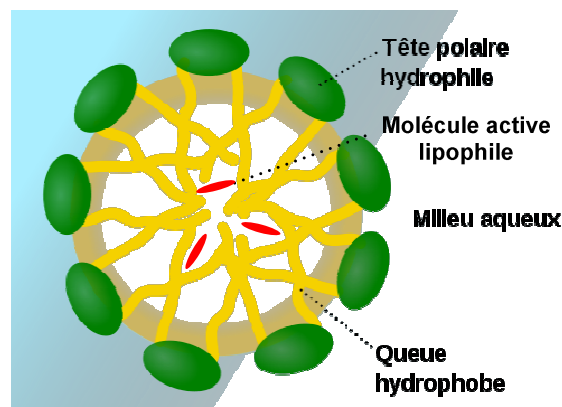


**Figure IV-2.** Schéma d'une vésicule formée avec des phospholipides en milieu aqueux

Les liposomes sont connus depuis 1965 et possèdent l'avantage d'être non toxiques. Ils ont l'inconvénient de ne pas pouvoir transporter un grand nombre de molécules lipophiles. L'encapsulation des molécules hydrophiles n'est pas non plus parfaite. Des principes actifs hydrophiles peuvent être relargués dans le sang<sup>46</sup>. Depuis la fin des années 1990, ils ont souvent été utilisés pour le transport d'agent de contraste ou de médicament dans des milieux biologiques. Comme on le verra plus tard, ils sont utilisés actuellement dans certains traitements chez l'homme.

- **Les micelles :**

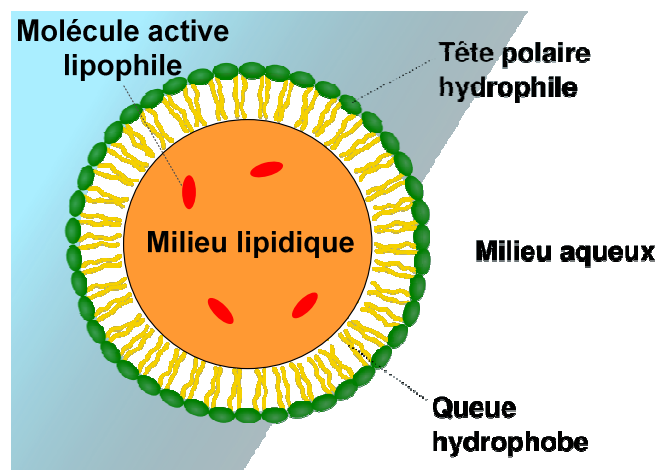
Les micelles sont des objets auto-assemblés en milieu aqueux. Comme les liposomes, ils sont basés sur l'utilisation de molécules amphiphiles, ou surfactant, qui vont former des micelles pour minimiser les interactions hydrophobes (figure IV-3). On obtient ainsi des objets d'une taille de quelques dizaines de nanomètres comportant un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. On reviendra plus en détail sur la formation des micelles dans le chapitre V. Elles peuvent ainsi permettre de transporter des molécules lipophiles<sup>47</sup>.



**Figure IV-3.** Schéma d'une micelle en milieu aqueux

- **Les nanoparticules lipidiques :**

La formation de nanoparticules lipidiques repose sur le même principe que la formation des vésicules et des micelles. Dans ce cas, on réalise une émulsion. On stabilise de petites gouttes d'huile (solvant lipophile non miscible avec l'eau) dans l'eau (figure IV-4). On peut comme cela obtenir des particules de quelques dizaines de micromètres. Contrairement aux vésicules, elles permettent d'encapsuler un grand nombre de molécules hydrophobes. Le cœur lipidique de ces nanoparticules est généralement composé de triglycérides biodégradables<sup>48</sup>.



**Figure IV-4.** Schéma d'une nanoparticule lipidique

- **Utilisation des polymères :**

Ces méthodes de fabrication de nanoparticules nécessitent l'utilisation de surfactants. Pour des raisons de biocompatibilité, on utilise généralement des molécules amphiphiles issues du vivant comme les phospholipides. On peut cependant utiliser des polymères biocompatibles<sup>49</sup>. En utilisant des polymères de nature amphiphiles on va pouvoir également former des vésicules ou des micelles. Leurs propriétés varient selon leur composition et leur taille. D'une manière plus générale, ils vont s'auto-assembler en milieu aqueux. Ils peuvent ainsi permettre de solvater des composés hydrophobes et de les rendre solubles. Il existe une très grande variété de polymères utilisés dans les applications en biologie. Parmi les polymères employés, on retrouve des copolymères à base de polyacide lactique et de polyacide glycolique (PLA / PGA). Initialement utilisés pour réaliser des implants médicaux, ils sont facilement biodégradables et ne sont pas toxiques. Les copolymères à base de polyéthylène oxyde et de polypropylène oxyde (PEO / PPO) sont aussi très utilisés, notamment pour la solubilisation et le transport des drogues lipophiles<sup>50</sup>. Ces polymères, employés dans ce travail pour la synthèse des nanoparticules, seront abordés plus en détail le chapitre V. D'autres polymères à base de polypeptides, polynucléotides, ou de polysaccharides sont également employés pour l'obtention de nanoparticules.

Outre les objets auto-assemblés, il existe également des dendrimères. Ce sont des complexes polymériques dont on peut faire varier la taille. En utilisant des monomères possédant au moins trois sites réactifs, on va former des constructions polymériques fortement branchées de structure bien contrôlée<sup>51</sup>. Leur synthèse reste généralement plus délicate.

#### **IV.2.2. Les nanoparticules inorganiques**

- **Les nanoparticules métalliques :**

Ce sont généralement des particules d'or<sup>52</sup> ou d'argent. Elles sont biocompatibles, et très résistantes à la corrosion. On peut fabriquer des particules métalliques de différentes formes et tailles par des procédés d'oxydoréduction. Initialement, elles ont été utilisées, et le sont encore, pour le marquage des composés cellulaires et leur visualisation en microscopie électronique. De nombreux procédés pour greffer des molécules à leur surface ou les enrober ont été développés. Elles peuvent être utilisées directement comme agent de contraste (rayons X, électrons) ou comme agent thérapeutique en photoactivation par rayons X ou en hyperthermie. Il est également possible de former des coquilles métalliques d'une épaisseur de quelques nanomètres pouvant transporter des molécules dans leur cœur.

- **Les nanoparticules magnétiques :**

La plus-part des nanoparticules magnétiques sont composées d'oxyde de fer super paramagnétique. Elles sont généralement faites de maghémite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) ou de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). On les recouvre généralement de polymère ou de polysaccharide (dextran) pour les rendre solubles et stables. Elles servent généralement d'agent de contraste IRM.

- **Les nanoparticules de silice :**

Il existe également de nombreux procédés pour obtenir des nanoparticules de silice. On obtient alors des objets plus ou moins poreux permettant de transporter des molécules actives ou des agents de contraste<sup>53</sup>.

- **Les nanocristaux semi-conducteurs :**

Les Quantum dots, décrit dans le chapitre I, font également partie des nanoparticules inorganiques. Ils sont utilisés comme agent de contraste en microscopie de fluorescence. Grâce à une fonctionnalisation adaptée ils permettent de réaliser de nombreuses études<sup>5, 6</sup>.

### IV.3. Utilisations en médecine

On utilise déjà les nanoparticules en pharmacologie depuis la fin des années 1990. L'injection de nanoparticules de quelques dizaines de nanomètres est autorisée chez l'homme depuis 1997. Les premières utilisations ont été faites avec des liposomes transportant un agent anticancéreux, la daunorubicine (DaunoXome®, NeXstar Pharmaceuticals). Depuis, d'autres formulations de médicaments utilisant des nanoparticules ont été mises sur le marché, la plupart utilisant également des liposomes, avec souvent des applications en cancérologie. On peut citer par exemple la doxorubicine (Caelyx®, Myocet®), encapsulée dans des liposomes. Dans le cas du Caelyx®, le liposome comporte des agents de furtivité afin d'améliorer sa biodistribution. Il existe également des nanoparticules commercialisées pour d'autres applications comme le traitement des mycoses. Par exemple, l'Ambisome® utilise des liposomes vectorisés pour réduire la toxicité rénale du principe actif, l'amphotéricine. Les liposomes se fixent directement sur la paroi cellulaire du champignon et l'amphotéricine est alors libérée. En ophtalmologie, les liposomes présentent aussi un grand potentiel thérapeutique. La vertéporfine (Visudine®) est actuellement prescrite pour le traitement de la dégénérescence maculaire. Dans ce cas, des liposomes transportent un photosensibilisateur vers les néo vaisseaux. On utilise des liposomes ayant des affinités pour des récepteurs de lipoprotéines situés sur la membrane endothéliale des néovaisseaux. La photo-illumination par un laser diode permet ensuite la destruction des néovaisseaux grâce à la présence du photosensibilisateur. Le traitement des yeux secs, de la kératite, et des uvéites bénéficie également de l'encapsulation des médicaments traditionnellement utilisés. Pour le traitement des maladies cérébrales, on peut signaler l'utilisation d'anticorps anti-récepteur de la transferrine pour faire traverser la barrière hématoencéphalique à des médicaments, qui, pour la plupart, sont des liposomes. Dans tous ces exemples, les nanoparticules permettent une diminution des doses prescrites, une baisse de la toxicité et une meilleure tolérance thérapeutique. Comme pour les anticancéreux, de grands espoirs sont fondés sur ces méthodes pour améliorer les traitements antibiotiques.

On utilise également les nanoparticules pour les applications en imagerie médicale. Les particules dont l'usage est approuvé chez l'homme sont des agents de contraste IRM. Notamment des nanoparticules d'environ 100 nm de diamètre composées de particules d'oxydes de fer de 5 à 6 nm de diamètre enrobées par une couche de dextran (permettant de

les rendre furtives). Elles sont commercialisées sous le nom d'Endorem® (Laboratoire Guerbet). Injectées par voie intraveineuse, elles sont utilisées pour visualiser les lésions du foie associées à une altération du système réticuloendothélial (notamment dans certaines tumeurs). D'autres agents de contraste de ce type avec des tailles différentes ont également été mis sur le marché. Ces particules étant inorganique, leur toxicité a beaucoup été étudiée. Après injection, elles sont généralement captées par les cellules du système réticuloendothélial. Elles sont ensuite lentement dégradées dans les lysosomes des macrophages. Le fer est ensuite intégré dans l'organisme.

#### **IV.4. Toxicité des nanoparticules**

Même en utilisant des matériaux connus comme biocompatibles, les nanoparticules peuvent être toxiques pour les organismes vivants. Certaines propriétés comme la charge de surface, la capacité à former des agrégats, ou leur photosensibilité vont les rendre toxiques à l'état de nanoparticules. En diminuant la taille des objets, on augmente le rapport entre la surface active et la masse de produit administré et ils peuvent devenir toxiques. De plus, la diminution de la taille des éléments facilite à priori leur passage à travers les interfaces biologiques très importantes dans la physiologie des tissus sains et pathologiques. Parmi ces interfaces, les barrières hémato-encéphaliques, hémato-rétiniennes, la cloison séparant les espaces endo et péri-lymphatiques de l'oreille interne, la frontière materno-embryonnaire et fœtale formée par le placenta et la barrière glomérulaire du rein servent à cloisonner l'intérieur de l'organisme. Ces interfaces constituent de véritables barrières, c'est à dire qu'elles peuvent être plus ou moins ouvertes ou fermées à certains éléments précis, et que cette perméabilité plus ou moins stricte peut être modifiée par divers facteurs, notamment pathologiques. Elles gèrent généralement les échanges indispensables à la survie, comme l'information et la nutrition. Le franchissement de ces différents cloisonnements par les nano-objets peut s'avérer toxique.

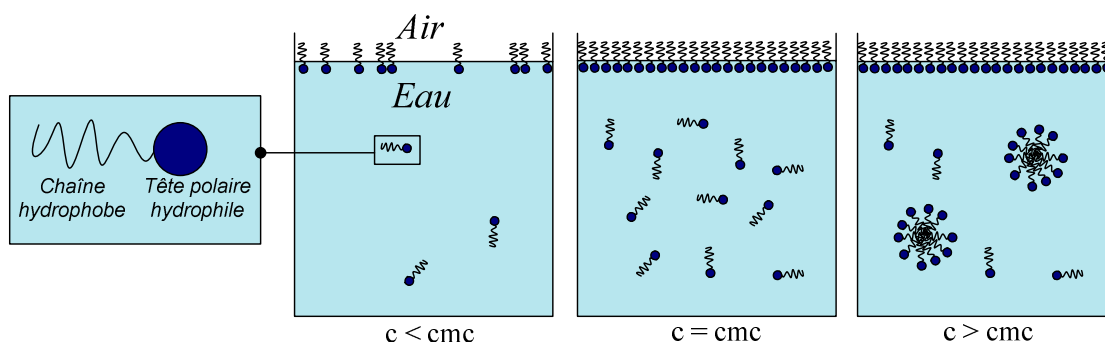
## Chapitre V. Synthèse de nanoparticules pour l'imagerie de la vascularisation par microscopie à deux photons

L'approche utilisée ici consiste à encapsuler des molécules fluorescentes hydrophobes dans des micelles de copolymère pour les rendre hydrosolubles et biocompatibles. Dans le cadre des applications en imagerie de la vascularisation, le procédé doit permettre d'obtenir des concentrations relativement élevées en chromophore dans la solution d'injection (de l'ordre du  $\text{g.l}^{-1}$ ). De plus, comme on l'a vu précédemment, les objets doivent avoir une taille contrôlée (inférieure à 100 nm) pour permettre une injection intraveineuse.

### V.1. Procédé de Micro-émulsion

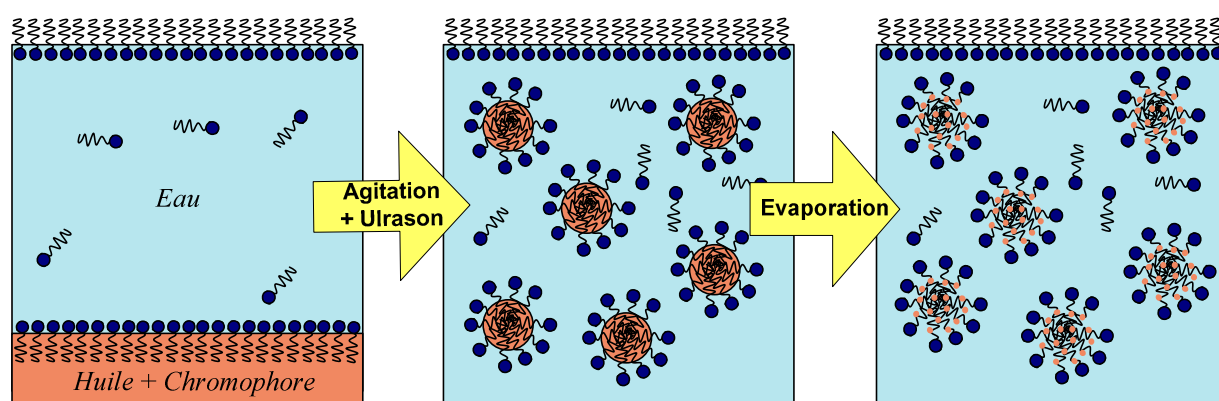
#### V.1.1. Principe et description

La formation de micelles repose sur l'utilisation de surfactants (ou tensioactifs). Ce sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire comportant à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile. En milieu aqueux, elles vont s'agencer de manière à minimiser les interactions entre l'eau et leurs parties hydrophobes. Au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration critique micellaire (cmc), les molécules vont s'assembler sous forme de micelles souvent sphériques ou cylindriques (figure V-1). On peut ainsi obtenir des objets hydrosolubles de taille nanométrique comportant un cœur hydrophobe.



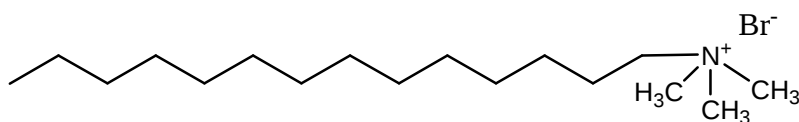
**Figure V-1.** Schéma montrant le comportement d'un tensio-actif dans l'eau en fonction de sa concentration par rapport à la concentration micellaire critique (cmc).

Pour encapsuler efficacement des molécules hydrophobes à l'intérieur de ces micelles, un procédé de micro-émulsions (oil in water) a été mis au point récemment au sein du laboratoire<sup>1</sup> (figure V-2). Un chromophore hydrophobe est dissout dans un petit volume de chloroforme et ajouté à une solution aqueuse contenant un tensioactif. Après agitation magnétique, l'huile se retrouve dispersée dans l'eau sous forme de petites gouttelettes. Le mélange est alors mis dans un bain à ultrasons pour obtenir une émulsion très fine, d'aspect laiteux, avec une taille de gouttes d'une centaine de nanomètres. Après agitation magnétique, la taille des gouttes est très grande et polydisperse. Au cours de la sonification, la taille des gouttes diminue de manière constante, à cause des phénomènes de fusion et de fission, jusqu'à atteindre un équilibre. Plus l'émulsion sera fine, plus elle restera stable longtemps. Dans notre cas, la stabilité de l'émulsion permet d'avoir le temps d'évaporer le solvant organique en chauffant le mélange. On obtient alors une suspension de micelles encapsulant le chromophore hydrophobe. La taille des particules obtenues et leur polydispersité peut ensuite être réduite par filtration mécanique à 100 nm.



**Figure V-2.** Illustration du procédé de microémulsion

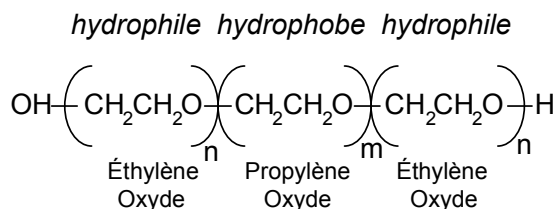
La concentration en surfactant et la proportion d'huile par rapport à l'eau sont des paramètres cruciaux du procédé. Le système a été optimisé pour la réalisation d'émulsion de chloroforme dans l'eau en utilisant un tensioactif ionique, le tetradecyltrimethylammonium bromide (figure V-3), comme surfactant<sup>1</sup>. La toxicité des tensioactifs ioniques ne permet pas une utilisation de ces nanoparticules pour les applications en biologie. On peut cependant les remplacer par d'autres tensioactifs non-ioniques biocompatibles.



**Figure V-3.** Formule chimique du tetradecyltrimethylammonium bromide

### V.1.2. Utilisation du Pluronic comme surfactant

Les Poloxamers ou Pluronic® (BASF Corporation) sont une série de copolymères tri-blocs. Ils sont constitués d'une chaîne hydrophobe de polypropylène oxyde entourée par deux chaînes hydrophiles de polyéthylène oxyde (figure V-4). Leur nature amphiphile leur permet de s'assembler sous forme de micelles en milieu aqueux s'ils sont suffisamment concentrés<sup>54</sup>. De nombreuses études ont été menées démontrant l'absence de toxicité de ces macromolécules<sup>55</sup>. La solubilisation de drogues hydrophobes par des micelles de Pluronic est déjà utilisée en recherche pharmaceutique pour les applications de « drug delivery »<sup>50</sup>. Dans ce sens, l'utilisation des Pluronic pour le procédé de microémulsion doit permettre d'obtenir des particules fluorescentes efficaces de taille contrôlée et surtout biocompatibles.



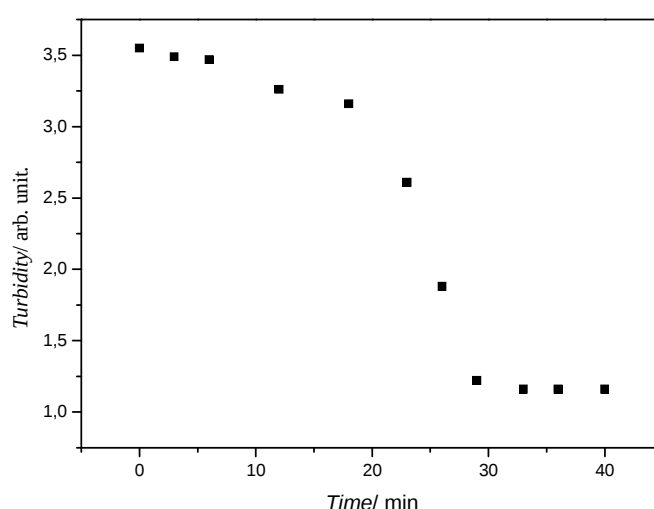
**Figure V-4.** Structure générale du Pluronic ; Pluronic F68 n=76 m= 29 Mw= 8 600, Pluronic F127 n=101 m= 56 Mw= 12 600

- **Utilisation du Pluronic F68 :**

Le procédé a été transposé dans un premier temps au Pluronic F68, largement utilisé dans diverses applications en biologie. Ce Pluronic comporte deux chaînes de 76 monomères d'éthylène oxyde qui entourent une chaîne de 29 monomères de propylène et sa concentration micellaire critique (c.m.c) est de  $4.8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ .<sup>54</sup> Pour ces premiers essais, le poly(fluorene)

à été utilisé comme chromophore hydrophobe. Le poly(fluorène) est un colorant fortement fluorescent à deux-photons, hydrophobe, et très soluble dans le chloroforme<sup>56</sup>. Le rapport ( $r$ ) entre le volume de chloroforme et le volume d'eau a été optimisé pour arriver à obtenir une émulsion stable en présence de Pluronic F68 ( $c > c_{mc}$ ). Pour  $r > 0,1$  le volume de chloroforme est trop grand ( $r = 0,1$  correspond à 500  $\mu\text{L}$  de chloroforme dans 5 mL d'eau) et on observe une démixtion entre les deux phases. Le ratio  $r = 0,02$  (100  $\mu\text{L}$  de chloroforme pour 5 mL d'eau). Pour envisager des applications en imagerie il est important de pouvoir incorporer le maximum de chromophore dans l'émulsion (de l'ordre du  $\text{g.L}^{-1}$ ). Pour obtenir cette concentration en utilisant un ratio de 0,02 il faut que le chromophore ait une grande solubilité dans le chloroforme ( $>20\text{g.L}^{-1}$ ).

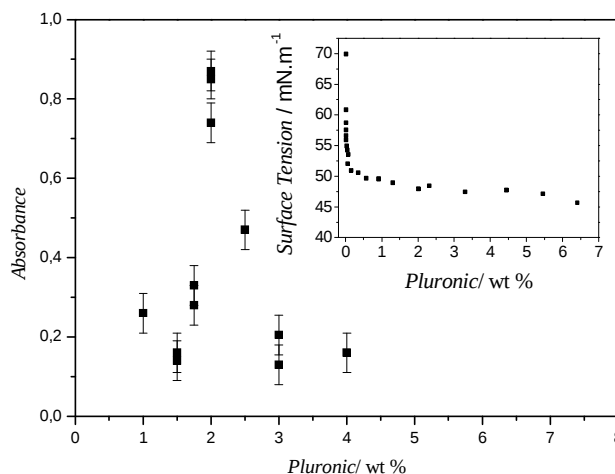
Le chloroforme étant très toxique, il est important de bien l'évaporer. Après sonification, la solution est chauffée à 60°C. Les résultats de turbidité montrés sur la figure V-5 indiquent qu'au bout de 30 minutes la solution est limpide, indiquant la disparition des gouttes de chloroforme et donc que tout le chloroforme a été évaporé.



**Figure V-5.** Evolution de la turbidité de la solution chauffée à 60 °C

Pour les applications visées, la taille des objets doit être inférieure à 100 nm. Après évaporation du chloroforme, les émulsions ont été filtrées successivement à 5  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 450 nm et 100nm. Des spectres d'absorption (représentatifs de la quantité de chromophore en solution) ont été réalisés après chaque filtration. Après filtration à 5  $\mu\text{m}$  on retrouve plus de 90% du chromophore initialement présent dans le chloroforme. Cependant, après filtration à 100 nm, il ne reste qu'environ 25% du chromophore initial. On peut déduire de ces résultats

qu'une grande partie du chromophore initial (75 %) se retrouve dispersé dans des objets de taille supérieure à 100 nm. En utilisant le Pluronic F68, on atteint au maximum des concentrations en solution aqueuse de l'ordre de 0,1 g/l en chromophore.



**Figure V-6.** Absorbance (proportionnelle à la concentration en chromophore) en fin de procédé (après filtration à 100 nm) pour différentes concentrations en Pluronic F68. L'insert montre l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en Pluronic F68 dans l'eau.

La concentration en Pluronic a ensuite été ajustée de manière à maximiser la quantité de chromophore présente en fin de procédé après filtration à 100 nm. La figure V-6 montre l'absorbance (proportionnelle à la concentration en chromophore) des solutions après filtration à 100 nm en fonction de la concentration en Pluronic F68. L'insert sur la figure montre l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration (linéaire) en Pluronic F68. On voit clairement que la tension de surface monte très rapidement pour les concentrations inférieures à 0,5 % wt. La courbe logarithmique ne montre pas de point de rupture à la cmc comme pour les tensioactifs classiques ioniques mais diminue de manière constante avec l'augmentation de la concentration en Pluronic. Ceci peut s'expliquer par la polydispersité des assemblages formé par le polymère. Une valeur optimum de 2% wt a été obtenue. Pour les valeurs inférieures, la concentration est probablement trop proche de la cmc (0,5% wt). Pour les concentrations trop grandes devant la cmc, le Pluronic s'arrange dans d'autres structures que des micelles, comme des cylindres ou des bâtonnets. De tels assemblages ne permettent pas de disperser les chromophores dans des objets de taille inférieure à 100 nm.

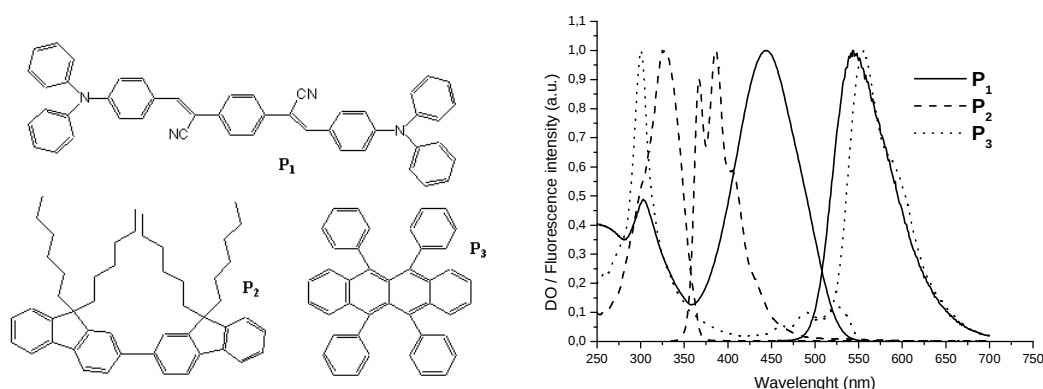
- **Utilisation du Pluronic F127 :**

Un autre Pluronic souvent utilisé pour la solvatisation de composé hydrophobes est le Pluronic F127. Ce Pluronic est de poids moléculaire plus élevé que le Pluronic F68 (12 600 g.mol<sup>-1</sup> contre 8600 g.mol<sup>-1</sup>) mais également plus hydrophobe, avec 36% en poids de segments hydrophobes contre 28% pour le Pluronic F68. Ainsi, le Pluronic F127 possède une cmc 100 fois plus basse (2,8 10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup>) que le Pluronic F68<sup>54</sup>.

On peut facilement réaliser une émulsion en remplaçant le Pluronic F68 à 2% wt par du Pluronic F127 à 1% wt. Avec le même procédé, il permet de récupérer plus de 90% du chromophore initial après filtration à 100 nm. Cette plus grande quantité de colorant récupérée s'explique probablement par sa plus grande hydrophobicité, avec un segment de propylène oxyde (hydrophobe) deux fois plus grand que le Pluronic F68 (65 monomères au lieu de 29).

### V.1.3. Influence du composé hydrophobe sur l'efficacité du procédé

Le procédé a été testé avec succès pour différents chromophores hydrophobes (figure V-7) ayant une bonne solubilité dans le chloroforme et les deux Pluronic précédents. Des spectres d'absorption ont été réalisés pour déterminer les concentrations en chromophore après filtration à 5 et 0,1 µm. Les spectres d'absorption et d'émission des émulsions diluées sont montrés sur la figure.



**Figure V-7.** Structure des chromophores utilisées ; Spectres d'absorption et d'émission des produits en émulsion

Les résultats présents sur le tableau V-1 montrent que la nature du chromophore n'influe pas sur l'efficacité du procédé. On retrouve dans tout les cas environ 90 % du produit après filtration à 100 nm en utilisant le Pluronic F127 et 20 % avec le Pluronic F68.

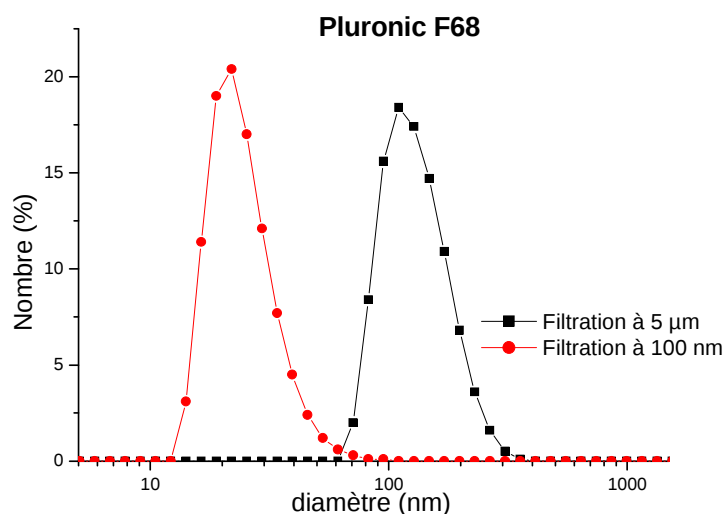
| filter<br>diameter<br>( $\mu\text{m}$ ) | Average amount of recovered dye (%) |                |                |                |                |                |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                         | P <sub>1</sub>                      | P <sub>1</sub> | P <sub>2</sub> | P <sub>2</sub> | P <sub>3</sub> | P <sub>3</sub> |
|                                         | F68                                 | F127           | F68            | F127           | F68            | F127           |
| 5                                       | 97                                  | 99             | 92             | 98             | 98             | 95             |
| 0.1                                     | 25                                  | 95             | 24             | 92             | 13             | 91             |

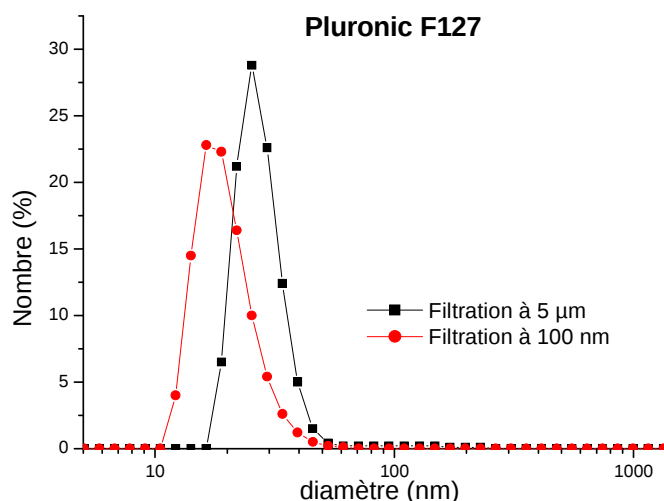
**Tableau V-1** Pourncentage de chromophore présent en solution après filtration mécanique à différents diamètres

La structure du colorant utilisée pour la réalisation des marqueurs n'influe pas sur le rendement d'incorporation du produit dans les Pluronic. Le procédé peut donc s'appliquer à un grand nombre de chromophores hydrophobes ayant une solubilité dans le chloroforme ( $>20\text{g.l}^{-1}$ ).

#### V.1.4. Caractérisation des marqueurs par diffusion de la lumière

La taille des émulsions obtenues avec les deux Pluronic a été mesurée par diffusion de la lumière (DLS). Les graphiques de la figure V-8 montrent la distribution en taille des deux émulsions après filtration à  $5\text{ }\mu\text{m}$  ou  $100\text{ nm}$  avec le Pluronic F127 ou le Pluronic F68. En effet, en filtrant à  $5\text{ }\mu\text{m}$ , les graphiques de DLS indiquent que pour le Pluronic F68 seuls 20 à 25 % des objets ont une taille inférieure à  $100\text{ nm}$ . Pour le Pluronic F127, on retrouve plus de 90% d'objets de taille inférieure à  $100\text{ nm}$ . En tenant compte de la quantité de colorant retrouvée dans l'émulsion après filtration à  $100\text{ nm}$  pour les deux Pluronic, on montre ainsi que le colorant est bien présent à l'intérieur des micelles en fin de procédé.



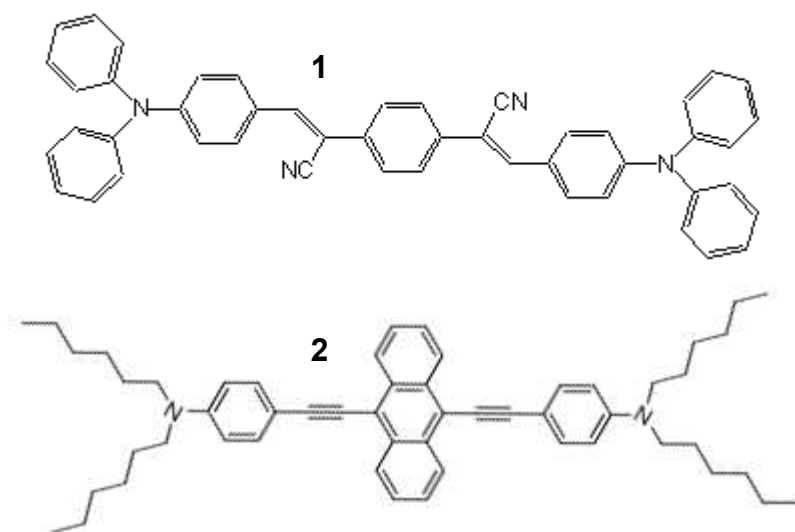


**Figure V-8.** Distribution en taille des émulsions après filtration à 5 µm ou 100 nm avec le Pluronic F127 ou le Pluronic F68

## V.2. Choix du chromophore et caractérisation spectroscopiques

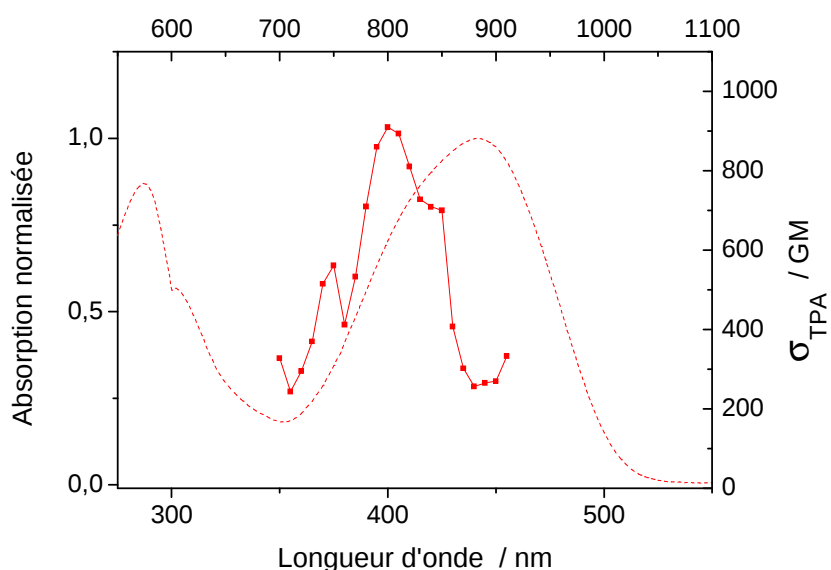
### V.2.1. Chromophores à forte section efficace d'absorption à deux photons

Pour une utilisation en microscopie biphotonique in-vivo, il est important d'utiliser des chromophores ayant une émission de fluorescence se situant la plus proche possible de la partie rouge du spectre visible. Il est aussi important que le fluorophore possède une forte section efficace d'absorption à deux-photons entre 800 et 900 nm et un bon rendement quantique de fluorescence.



**Figure V-9.** Structures des chromophores à forte section efficace d'absorption à deux photons utilisés. 1 :dérivé de di-styryl benzène, 2 dérivé de l'anthracène

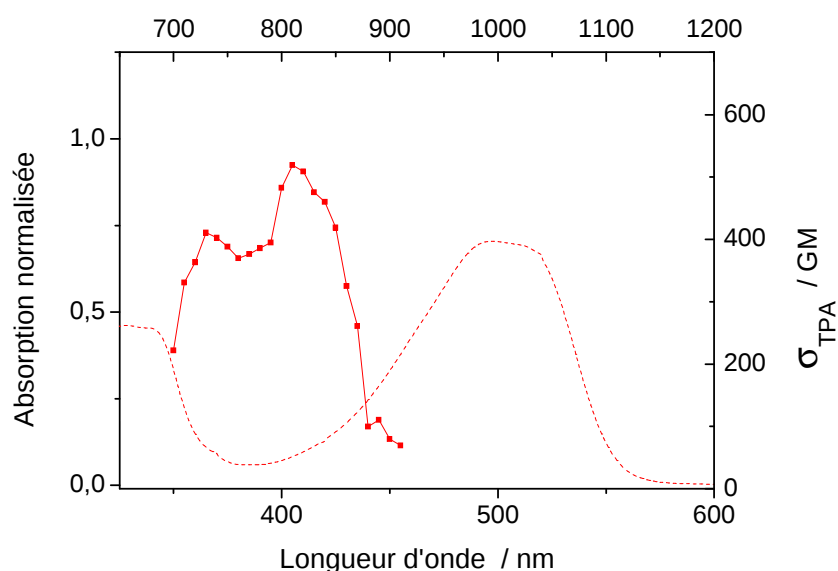
Deux molécules hydrophobes spécialement synthétisées pour avoir de bonnes propriétés de fluorescence à deux photons ont été étudiées ici (figure V-9). Ces deux molécules sont des molécules symétriques de type push-push. Ce sont des chromophores quadripolaires de type donneur/accepteur/donneur ( $D-\pi-A-\pi-D$ ). Le composé 1 est un dérivé de di-stiryl benzène synthétisé par l'équipe de Seth Marder<sup>57</sup>. Il est constitué de deux groupements diphénylamine (donneurs) reliés par un pont distiryl benzène sur lequel on a substitué deux groupements nitriles (accepteurs). Il possède une section efficace d'absorption à deux photons de 730 GM à 825 nanomètres dans le toluène<sup>57</sup> et une émission de fluorescence dans le jaune (maximum à 520 nm). Cette molécule ne possède pas un bon rendement quantique de fluorescence en milieu dilué (1,5 % dans le toluène) mais est très fluorescente à l'état solide. (sous forme de poudre). Cette propriété peut s'avérer essentielle dans le cas de la formation d'agrégats solides dans le cœur hydrophobe des micelles. Des mesures ont été également réalisées dans le chloroforme pour ce composé. Son rendement de fluorescence est toujours faible (environ 2%) et sa section efficace d'absorption à deux photons est de 920 GM à 800 nm (figure V-10).



**Figure V-10.** Spectre d'absorption à deux photons du composé 1 dans le Chloroforme (trait plein). Pour comparaison, on peut voir le spectre d'absorption à un photon normalisé (trait pointillé)

Le composé 2 est également un système de type  $D-\pi-A-\pi-D$ . Il a été synthétisé par le groupe de C. Andraud et possède également une bonne section efficace d'absorption à deux photons dans la fenêtre de transparence des milieux biologiques (520 GM à 810 nm dans le chloroforme, figure V-11). Contrairement au composé 1, cette molécule est très fluorescente

quand elle est dispersée dans le chloroforme (rendement proche de 100%) mais n'est pas du tout fluorescente à l'état solide. Elle émet une fluorescence plus rouge que le composé 1 (maximum à 560 nm contre 525 pour le dérivé de distiryl benzène).



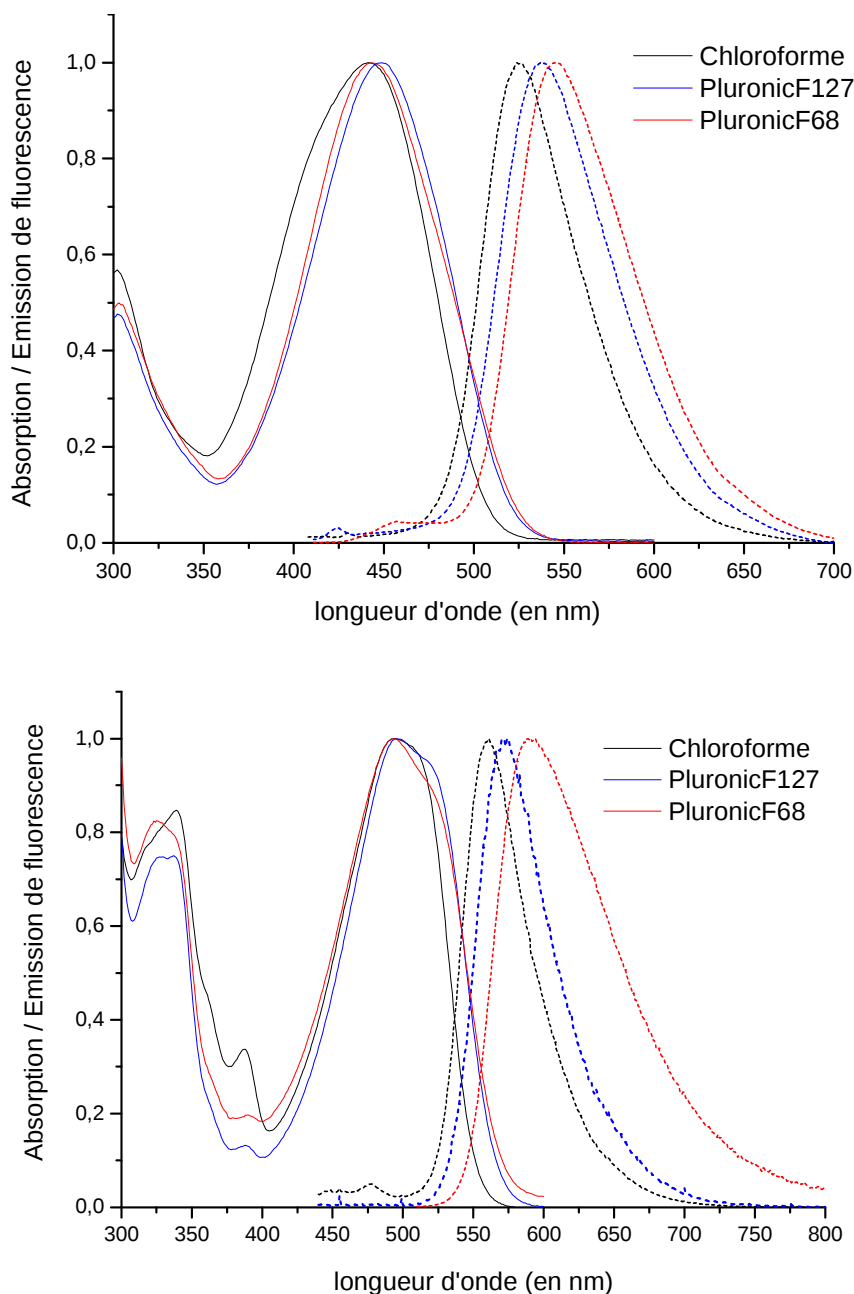
**Figure V-11.** Spectre d'absorption à deux photons du composé 2 dans le Chloroforme (trait plein). Pour comparaison, on peut voir le spectre d'absorption à un photon normalisé (trait pointillé)

### V.2.2. Influence du procédé sur les propriétés de fluorescence des chromophores

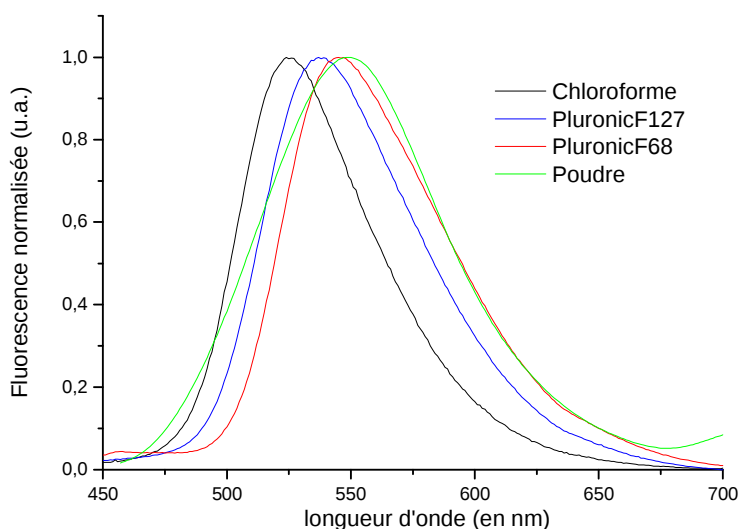
En utilisant ce procédé, on obtient après évaporation du chloroforme une grande concentration de chromophore au cœur des micelles. En utilisant le pluronic F68, dont les segments hydrophobes sont plus courts, on obtient même probablement des agrégats. L'environnement de la molécule en fin de procédé va modifier ces propriétés de fluorescences. Les spectres d'absorption et d'émission des deux composés ont été réalisés en émulsion (figure V-12) et les rendements quantiques de fluorescences ont été mesurés (tableau V-2).

Pour les deux composés, on observe un décalage de la fluorescence du chromophore en émulsion vers la partie rouge du spectre visible. Les spectres d'absorption sont eux peu sensibles à l'environnement de la molécule. Dans les deux cas, le décalage sur les spectres d'émission est plus important dans les micelles de Pluronic F68 que dans les micelles de Pluronic F127. Ces molécules à fort transfert de charge sont généralement sensibles à la polarité de leur environnement. Classiquement, leurs spectres sont décalés dans le rouge quand la polarité augmente. Ces changements de longueurs d'onde d'émission de

fluorescence peuvent également s'expliquer par des empilements entre chromophores dans les micelles. La figure V-13 montre l'émission de fluorescence de poudre de composé 1, fluorescent à l'état solide. On peut voir que l'émission de la molécule à l'état solide est également décalée par rapport à l'émission du produit dans le chloroforme, et son spectre est très proche de celui mesuré à l'intérieur des micelles de Pluronic F68.



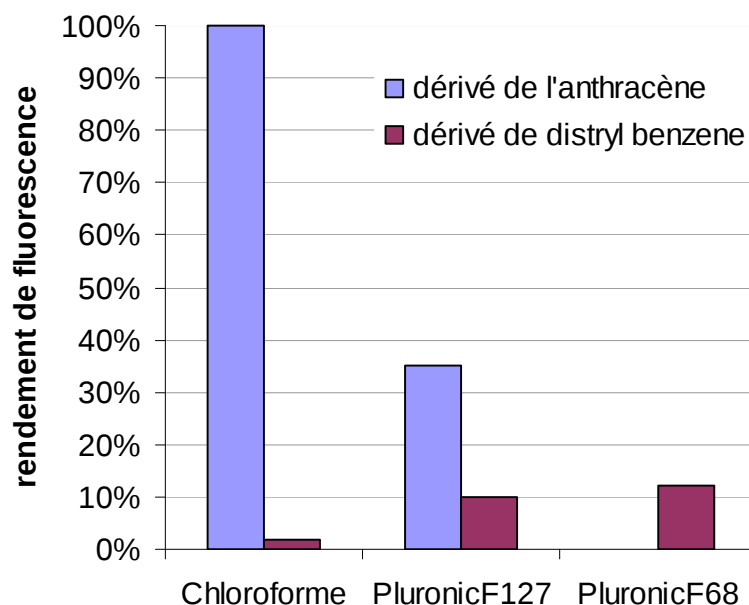
**Figure V-12.** Spectres d'absorption (traits pleins) et d'émission de fluorescence (pointillés) du composé 1 (en haut) et du composé 2 (en bas) pour différents environnements ( $\text{CHCl}_3$  en noir, émulsion avec le Pluronic F68 en bleu et émulsion avec le Pluronic F127 en rouge).



**Figure V-13.** Comparaison de l'émission de fluorescence du composé 1 en poudre par rapport aux précédents environnements

Cette probable agrégation des chromophores modifie également beaucoup les rendements quantiques de fluorescence (figure V-14). Classiquement, la fluorescence des chromophores est très sensible à leur concentration et encore plus à l'agrégation. Les interactions entre chromophores vont généralement augmenter les probabilités de désexcitation non radiative faisant chuter le rendement quantique de fluorescence. Dans le cas de l'agrégation, la fluorescence disparaît généralement à cause des empilements  $\pi$ - $\pi$  entre molécules. C'est le cas du composé 2. Malgré un rendement quantique de fluorescence de 100 % dispersé dans le chloroforme, son rendement n'est plus que de 35 % dans les micelles de Pluronic F127 et est proche de 0 % dans les micelles de Pluronic F68. Cette chute du rendement peut s'expliquer par la concentration en chromophore localement importante au cœur des micelles. Dans le cas du Pluronic F68, la fluorescence quasi nulle du composé peut s'expliquer par une probable agrégation du chromophore.

Le comportement du composé 1 diffère. A l'inverse des chromophores classiques, il est fluorescent à l'état agrégé ou cristallin mais son rendement quantique de fluorescence est assez faible dispersé en solution. Dans ce cas, la fluorescence du chromophore est plus importante dans les micelles que dispersé dans le chloroforme.



**Figure V-14.** Diagramme représentant l'évolution des rendements quantique des deux composés en émulsion par rapport au rendement quantique dans le chloroforme

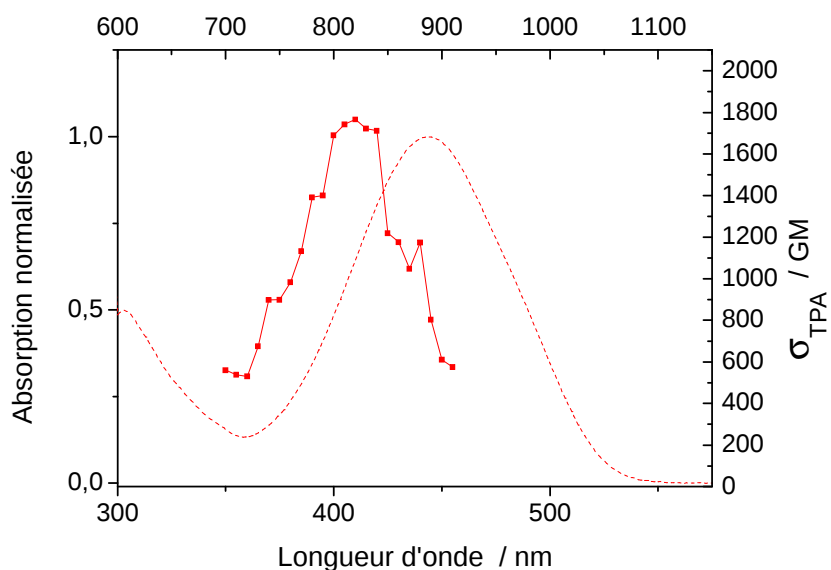
Ces résultats montrent l'importance de l'environnement final des chromophores sur leurs propriétés de fluorescence. En utilisant le Pluronic F68 pour le procédé de microémulsion il est nécessaire d'utiliser des chromophores fluorescents à l'état solide à cause de la probable agrégation du chromophore à l'intérieur des micelles. Dans le cas du Pluronic F127, les segments hydrophobes plus longs permettent sans doute une meilleure dispersion du chromophore dans les micelles.

| composé                   | environnement     | $\lambda$ max d'absorption | $\lambda$ max d'émission | $\eta$ |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|--------|
| dérivé de l'anthracène    | CHCl <sub>3</sub> | 495                        | 561                      | 100%   |
|                           | PluronicF68       | 495                        | 591                      | < 0,1% |
|                           | PluronicF127      | 496                        | 572                      | 35%    |
| dérivé de distryl benzene | CHCl <sub>3</sub> | 441                        | 525                      | 2%     |
|                           | PluronicF68       | 444                        | 545                      | 12%    |
|                           | PluronicF127      | 448                        | 537                      | 10%    |

**Tableau V-2.** Longueurs d'onde des maximums d'absorption et d'émission et rendement quantique de fluorescence des deux composés dans les différents environnements

### V.2.3. Choix du dérivé de di-stiryl benzène

Les essais en imagerie à deux photons ont été faits initialement avec le Pluronic F68. Le dérivé de distryl benzène a été choisi pour ses bonnes propriétés de fluorescence à l'état solide et ses bonnes propriétés d'absorption à deux photons. Une section efficace d'absorption à deux photons de 1800 GM à 820 nm a été mesurée dans les micelles de Pluronic F68 (figure V-15).



**Figure V-15.** Spectre d'absorption à deux photons du composé 1 dans les micelles de Pluronic F68 (trait plein). Pour comparaison, on peut voir le spectre d'absorption à un photon normalisé (trait pointillé)

La durée de vie du chromophore a été mesurée. On retrouve un déclin de fluorescence multi exponentiel de la fluorescence avec une composante rapide (0,345 ns) et une composante plus longue (1,187ns). Ce comportement complexe peut s'expliquer par le manque d'homogénéité du système avec différents environnements pour les chromophores. Pour comparaison, un déclin de fluorescence mono exponentiel de 0,072 ns est mesuré pour la molécule dispersée dans le chloroforme.

### V.3. Résumé

La solvation de composés hydrophobes peut s'obtenir directement en les ajoutant à une solution aqueuse de Pluronic. Cependant le procédé de microémulsion permet d'incorporer de plus grande quantité de colorant dans des micelles de tailles inférieures à 100 nm. L'efficacité

du procédé dépend seulement du type de Pluronic employé et il peut être utilisé pour la plus part des molécules hydrophobes ayant une bonne solubilité dans le chloroforme. On a pu voir que les propriétés de fluorescence des chromophores dans les micelles sont différentes de celles des chromophores dispersés dans un solvant organique. Il faudra choisir de préférence des molécules fluorescentes à l'état solide pour obtenir des marqueurs brillants. La structure exacte des micelles n'est pas connue. On peut cependant supposer que lors du procédé, les chaînes hydrophobes du Pluronic (PO) se regroupent aux centres des micelles en solvantant le composé hydrophobe et ou des agrégats tandis que les chaînes hydrophiles restent en périphérie des objets.

On obtient des concentrations allant de 0,1 à 0,3 g.l<sup>-1</sup> en fluorophore dans des solutions aqueuses de Pluronic (10 à 20 g.l<sup>-1</sup>). En comparaison, les solutions de Dextrans fonctionnalisés utilisées classiquement pour les applications d'imagerie de la vascularisation sont composées d'environ 1 g.l<sup>-1</sup> en chromophore (Fluorescéine ou Rhodamine B) greffé à 100 g.l<sup>-1</sup> de Dextran. Les micro-émulsions de Pluronic ne permettent donc pas d'obtenir des concentrations aqueuses de colorant aussi élevées. Cependant, la forte efficacité en absorption à deux photons du dérivé de di-styryl benzene (1800 GM contre environ 10 à 100 GM pour les chromophores conjugués aux Dextrans) permet de compenser cette plus faible concentration. L'efficacité globale pour une utilisation en microscopie à deux photons est donc au final comparable pour les deux types de solutions avec une quantité de matière 10 fois moindre dans les émulsions (10g.l<sup>-1</sup> en Pluronic contre 100g.l<sup>-1</sup> en Dextran).

## **Chapitre VI. Validation en imagerie du petit animal, comparaison aux Dextrans fonctionnalisés**

L'efficacité globale (concentration, absorption à deux-photons, et rendement quantique de fluorescence) des émulsions obtenues avec le Pluronic F68 et le dérivé de distryl benzène étant comparable à celle des Dextrans conjugués utilisées classiquement en imagerie du petit animal, on peut envisager une utilisation in-vivo. Pour avoir un intérêt, les marqueurs à base de Pluronic doivent permettre d'imager (à puissance laser égale) la vascularisation à des profondeurs comparables à celles imagées avec ces Dextrans, avec une coloration homogène et stable sur plusieurs heures. Ce dernier point est important dans le cas de notre approche. Le chromophore n'est pas lié directement aux micelles et peut être relargué dans le sang.

La caractérisation in-vivo des marqueurs a été faite dans un premier temps en imageant la vascularisation cérébrale saine chez la souris. Les marqueurs ont ensuite été utilisés pour imager la vascularisation en environnement tumoral.

### **VI.1. Imagerie profonde dans le cerveau sain**

L'imagerie de la vascularisation cérébrale chez la souris est un bon moyen de comparer l'efficacité des marqueurs in-vivo. La dure-mère est fine et peu opaque permettant une observation profonde dans les tissus. Chez un animal jeune (moins de 2 mois), au cortex peu diffusant, la profondeur d'observation peut aller jusqu'à 600  $\mu\text{m}$  avec notre dispositif en utilisant des Dextrans fonctionnalisés. Cependant, cette profondeur se dégrade assez vite chez les animaux âgés, aux tissus plus denses. En utilisant des souris de même âge on peut donc comparer l'efficacité des marqueurs en comparant les profondeurs maximales d'observations. Cependant, chez des souris identiques (âge, type) avec un même colorant, on observe des variations sur cette profondeur d'un individu à l'autre. Il est donc important de répéter l'expérience sur plusieurs souris par colorant pour obtenir une efficacité moyenne. L'expérience a été réalisée sur 3 souris OF1 (6 à 8 semaines, Charles River Laboratories, Lyon, France) et 3 Balb/c (6 mois, Charles River Laboratories, Lyon, France) par colorant.

### **VI.1.1. Protocole expérimental**

- **Chirurgie :**

Pour ces expériences, les souris ont été anesthésiées par inhalation continue d'isoflurane dans un mélange gazeux de O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub>O (30% / 70%). Ce type de mélange est couramment utilisé pour l'anesthésie des mammifères de petites tailles. Il permet l'anesthésie sur des temps assez longs (quelques heures) et diminue les mouvements respiratoires facilitant ainsi l'acquisition d'images.

Préalablement à la chirurgie, l'anesthésie est induite en mettant l'animal dans une cage étanche dont l'air contient 5% d'isoflurane. Une fois l'animal anesthésié, il est placé sur un cadre stéréotaxique. L'anesthésie est alors prolongée à l'aide d'un masque situé sur le museau de l'animal délivrant de l'isoflurane à environ 2 %. La température est maintenue à 37 °C par une circulation d'eau chaude située sous l'animal. Le cadre stéréotaxique permet d'immobiliser la tête de l'animal au moyen de deux barres bloquées sous les bas-joues pour s'affranchir des mouvements gênants en chirurgie et en imagerie. Il permet aussi une orientation de la surface du crâne de l'animal de manière à optimiser ensuite le positionnement sous le microscope.

On incise alors la peau sur le sommet de la tête de l'animal de manière à mettre à nu son crâne. On réalise ensuite une craniotomie d'environ 2 à 3 mm de diamètre sur le sommet du cortex pariétal gauche de l'animal à l'aide d'une fraise dentaire. Une fois l'os retiré, une goutte de sérum physiologique est déposée de manière à empêcher le dessèchement. La craniotomie peut donner lieu à des hémorragies qui rendent par la suite l'imagerie de la vascularisation impossible. La chirurgie doit donc être réalisée avec précaution et il est nécessaire de stopper tout saignement avant d'injecter le colorant. Pour pouvoir immerger l'objectif du microscope, un joint torique est fixé autour de la craniotomie afin de maintenir l'étanchéité.

- **Imagerie :**

Avant l'imagerie, on a injecté 100 µl d'une des solutions suivantes par une veine de la queue de la souris :

- Emulsion à base de Pluronic F68 : 0,1 g/l de chromophore dans une solution saline à 20 g/l en Pluronic
- Emulsion à base de Pluronic F127 : 0,4 g/l de chromophore dans une solution saline à 10g/l en Pluronic
- Rhodamine-B isothiocyanate Dextran 70 kDa (Sigma) : 100mg/ml dans du sérum physiologique.

Après l'injection, l'animal est positionné sous le microscope et l'objectif à immersion est amené à la verticale de la craniotomie. On réalise ensuite une première mise au point grâce à une lampe à mercure couplée au microscope avant de lancer le scan par le laser.

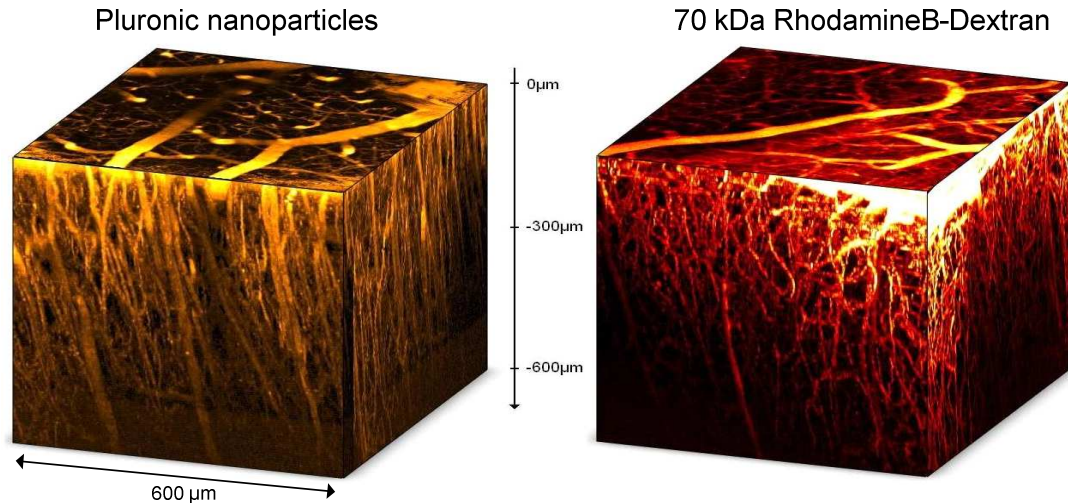
Le microscope est composé d'une tête de scan Biorad (MRC 1024) couplée à microscope droit (Olympus BX50WI). L'excitation laser a été réalisée à 800 nm à l'aide d'un laser femptosecond Ti :sapphire (Spectra-Physics, Millenia V) focalisé à travers un objectif 20x à immersion (NA = 0.95, Xlum Plan FI Olympus). Pour ces expériences, la fluorescence a été collectée sur un seul photomultiplicateur (PMT) protégé par un filtre pour le laser (BG39, Schott Glass–Jena, Allemagne).

Des plans de 512 x 512 pixels sont scannés permettant l'acquisition d'images de 600 x 600 µm à la vitesse de 0,9 images par seconde. La variation de la profondeur d'observation est réalisée par la translation de l'objectif à l'aide d'un moteur pas à pas.

L'analyse et la reconstruction des images a été faite par l'intermédiaire du logiciel ImageJ.

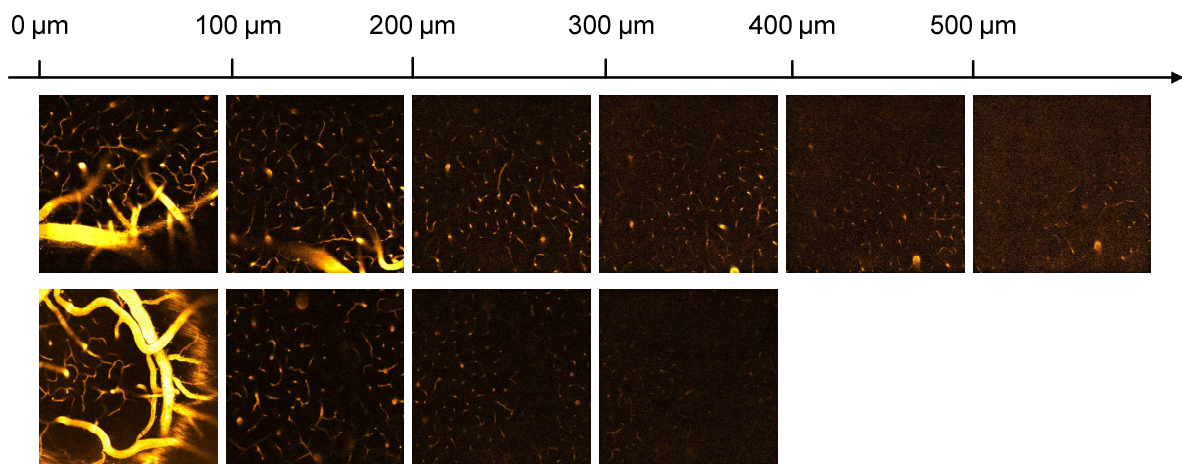
### **VI.1.2. Efficacité des marqueurs in-vivo**

Les profondeurs maximales imagées sont les mêmes après injection d'émulsion à base de Pluronic F68 ou de Rhodamine-B Dextran. Dans les deux cas, chez des souris OF1 âgées de 6 à 7 semaines, la vascularisation a pu être observée jusqu'à des profondeurs de 500 à 600 µm sous la dure-mère. La figure VI-1 montre une comparaison entre deux séries d'images réalisées jusqu'à 600 µm sous la dure-mère après injection de l'un ou l'autre de ces colorants. Dans les deux cas, le signal est perdu au-delà de cette profondeur limite.



**Figure VI-1.** Reconstruction d'images obtenues à partir de 121 images de  $600 \times 600 \mu\text{m}$  collectées jusqu'à  $600 \mu\text{m}$  sous la dure-mère après injection de  $100 \mu\text{l}$  d'émulsion à base de Pluronic F68 (à gauche) ou après injection de  $100 \mu\text{l}$  de RhodamineB Dextran (à droite).

On peut voir sur la figure VI-2 la différence entre l'efficacité des marqueurs obtenus à base de Pluronic F68 par rapport à ceux obtenus à base de Pluronic F127. Après injection d'émulsion à base de Pluronic F127, plus concentrée en colorant mais moins efficace en fluorescence que l'émulsion à base de Pluronic F68, la vascularisation n'a pu être imagée qu'à des profondeurs de  $300$  à  $400 \mu\text{m}$  chez des souris de même âge.

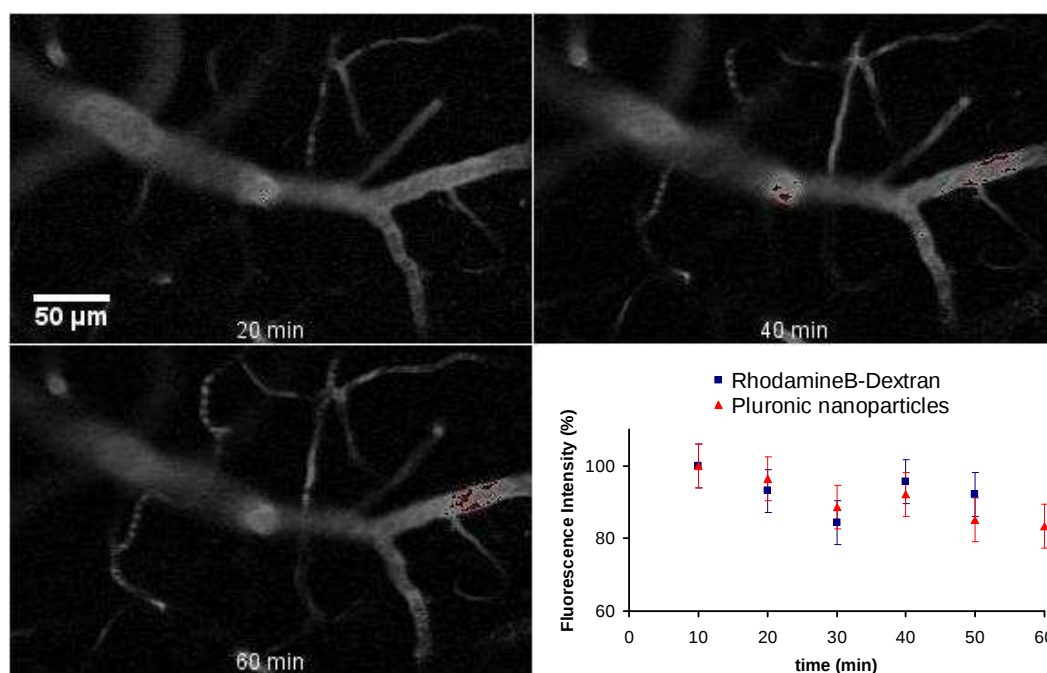


**Figure VI-2.** Séries d'images prises à différentes profondeurs dans le cortex après injection de  $100 \mu\text{L}$  d'émulsion à base de Pluronic F68 (en haut) ou après injection de  $100 \mu\text{L}$  d'émulsion à base de Pluronic F127 (en bas)

Les mêmes expériences ont été menées sur des souris Balb/c de 6 mois. La profondeur d'observation sous la dure-mère a alors été limitée à  $300 \mu\text{m}$ .

### VI.1.3. Evolution du marquage dans le temps

En plus d'être efficaces, il est important que les marqueurs permettent d'obtenir une coloration homogène et stable dans le temps. Pour généraliser leur utilisation in-vivo, les micelles doivent circuler correctement à l'intérieur des vaisseaux et permettre d'imager la vascularisation sur des temps relativement longs (environ 1h). Des stacks de 61 images espacés de 5  $\mu\text{m}$  sous la dure-mère ont été réalisés toutes les 10 min pendant 1 heure après injection d'émulsion à base de Pluronic F68 ou de Rhodamine-B Dextran 70 kDa. Le volume imagé se décalant dans le temps à cause des mouvements de l'animal, la fluorescence d'une zone de vaisseaux spécifique (400  $\mu\text{m}$  x 250  $\mu\text{m}$  sur une épaisseur de 30  $\mu\text{m}$ ) a été quantifiée sur chaque stack à l'aide du logiciel ImageJ.



**Figure VI-3.** Images prises à une profondeur de 50  $\mu\text{m}$  sous la surface du cortex à différents temps après l'injection de 100  $\mu\text{L}$  d'émulsion à base de Pluronic. En insert, le graphe montrant l'évolution du signal de fluorescence dans le temps après injection de dérivé de distyryl benzène dans le Pluronic F68 ou après injection de rhodamineB-Dextran

La figure VI-3 montre une zone spécifique imagée au cours du temps après injection d'émulsion à base de PluronicF68. Le graphe en insert indique la décroissance du signal de fluorescence moyen provenant de l'intérieur des vaisseaux. On peut voir qu'après 60 min, on observe encore un excellent contraste sur les images avec encore 85 % du signal de

fluorescence initial. Les mêmes observations ont été faites après injection de Rhodamine-B Dextran 70 kDa (insert de la figure VI-3).

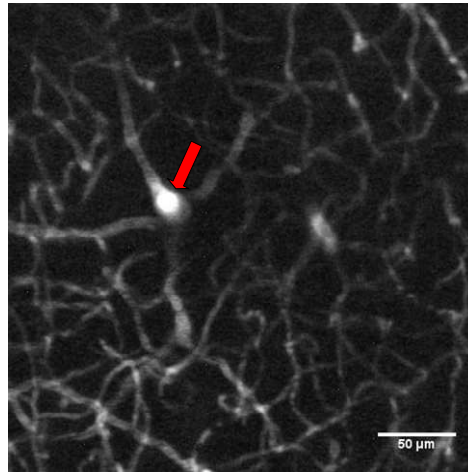
Ces résultats montrent un bon comportement circulatoire du chromophore dans le sang avec aucune diffusion observée dans le cortex. Une fuite des marqueurs à travers les vaisseaux ou une accumulation spécifique dans certains tissus engendrerait une chute rapide du signal de fluorescence. Il n'est cependant pas exclu que le chromophore puisse diffuser à travers les micelles ou soit relargué. Certaines études montrent que les colorants hydrophobes incorporés dans les micelles peuvent se lier à d'autres environnements lipophiles présents dans le sang et ainsi continuer à circuler.

#### **VI.1.4. Mesures du volume sanguin**

Une coloration uniforme et un bon contraste permettent aussi de réaliser des mesures de volume sanguin relatif (volume sanguin total / volume de l'échantillon). Des mesures ont été faites sur les précédentes images d'après la méthode décrite par Vérant et al.<sup>25</sup>

- **Traitement d'images :**

Pour chaque stack, les images de 0 à 50  $\mu\text{m}$  sous la dure-mère ont été supprimées pour éviter les vaisseaux superficiels de l'espace sous-arachnoïdien gênant à la mesure. Le bruit de fond et les pixels saturés dus aux artefacts ont été ensuite enlevés avec le logiciel ImageJ (algorithme « rolling ball » avec un rayon de 30  $\mu\text{m}$ ). Pour pouvoir appliquer ensuite la méthode de calcul de volume sanguin relatif, il faut s'affranchir de la perte de signal dans les vaisseaux due à la profondeur d'observation. L'intensité de fluorescence de chaque image est alors normalisée (de 0 à 255 niveaux de gris) en utilisant un vaisseau plongeant dont l'intensité est maximale (que l'on fixe à 255 niveaux de gris sur chaque image). Pour finir, une Z-projection moyenne des images est réalisée. Sur l'image obtenue, le volume sanguin est proportionnel à la somme des intensités des pixels. On peut voir sur la figure VI-4, un exemple de traitement réalisé sur un stack obtenu à partir de NP-PluronicF68. La flèche rouge montre le vaisseau plongeant ayant servi à la normalisation des images.



**Figure VI-4.** Z-projection d'une pile d'image normalisée utilisée pour une mesure de volume sanguin relatif dans le cortex. La flèche rouge montre un vaisseau plongeant utilisé pour la normalisation des images.

Le tableau VI-1 présente les différentes mesures de volume sanguin relatif réalisées à partir des précédents stacks. Chez des souris OF1 de 7 à 8 semaines, un volume sanguin relatif de  $2,4 \pm 0,5$  % (écart type) a été mesuré en utilisant les micelles de PluronicF68. Avec un marquage à la RhodamineB-Dextran 70 kDa, un volume de  $2,3 \pm 0,3$  % a été trouvé. Un volume relatif plus important ( $2,7 \pm 0,3$  %) a été mesuré sur les souris de type Balb/c âgées de 6 mois.

| Mouse type | Age    | Volume sanguin relatif (%) |              |
|------------|--------|----------------------------|--------------|
|            |        | NP-PluronicF68             | RhodBDextran |
| OF1        | 7/8sem | 2,6                        | -            |
| OF1        | 7/8sem | 2,5                        | -            |
| OF1        | 7/8sem | 2,1                        | -            |
| OF1        | 7/8sem | 3,1                        | -            |
| OF1        | 7/8sem | 1,9                        | -            |
| BalbC      | 6mois  | 2,7                        | -            |
| BalbC      | 6mois  | 2,5                        | -            |
| BalbC      | 6mois  | 2,7                        | -            |
| BalbC      | 6mois  | 2,7                        | -            |
| OF1        | 7/8sem | -                          | 2,1          |
| OF1        | 7/8sem | -                          | 2,1          |
| OF1        | 7/8sem | -                          | 2,6          |

**Tableau V-1.** Résultats des différentes mesures de volume sanguin réalisées

Les mêmes volumes relatifs obtenus en utilisant les deux types de marqueurs indiquent une répartition homogène du colorant à l'intérieur des vaisseaux, comparable à celles des Dextran fonctionnalisés. Ces mesures sont également en accord avec les données publiées dans la littérature.<sup>19</sup>

## **VI.2. Imagerie en environnement tumoral**

Comme on l'a vu dans les chapitres II et III, de nombreux traitements anticancéreux ont pour cible la vascularisation tumorale. L'imagerie à deux-photons des vaisseaux de la tumeur permet de valider l'efficacité de ces traitements in-vivo et de mieux comprendre leurs mécanismes. Cependant, la vascularisation tumorale étant plus perméable, il est nécessaire d'utiliser des marqueurs de poids moléculaire important pour éviter la fuite du colorant et l'accumulation dans les tissus environnant<sup>38</sup>. Pour valider, l'utilisation des micelles de PluronicF68 pour imager l'architecture vasculaire tumorale, les marqueurs ne doivent pas diffuser à travers la paroi des vaisseaux. Comme décrit dans la partie II.3, le modèle principal pour l'observation de la vascularisation tumorale in-vivo consiste à implanter des cellules cancéreuses dans une fenêtré dorsale. Cependant, la pose de fenêtré dorsale est délicate à réaliser et assez traumatisante pour l'animal. Des expériences préliminaires ont donc été faites ex-vivo sur des tumeurs sous-cutanées. La greffe de tumeur en sous-cutané est un modèle plus simple à mettre en œuvre et permet de se faire une idée du comportement des marqueurs en présence d'un environnement tumoral.

### **VI.2.1. Imagerie de l'environnement tumoral ex-vivo**

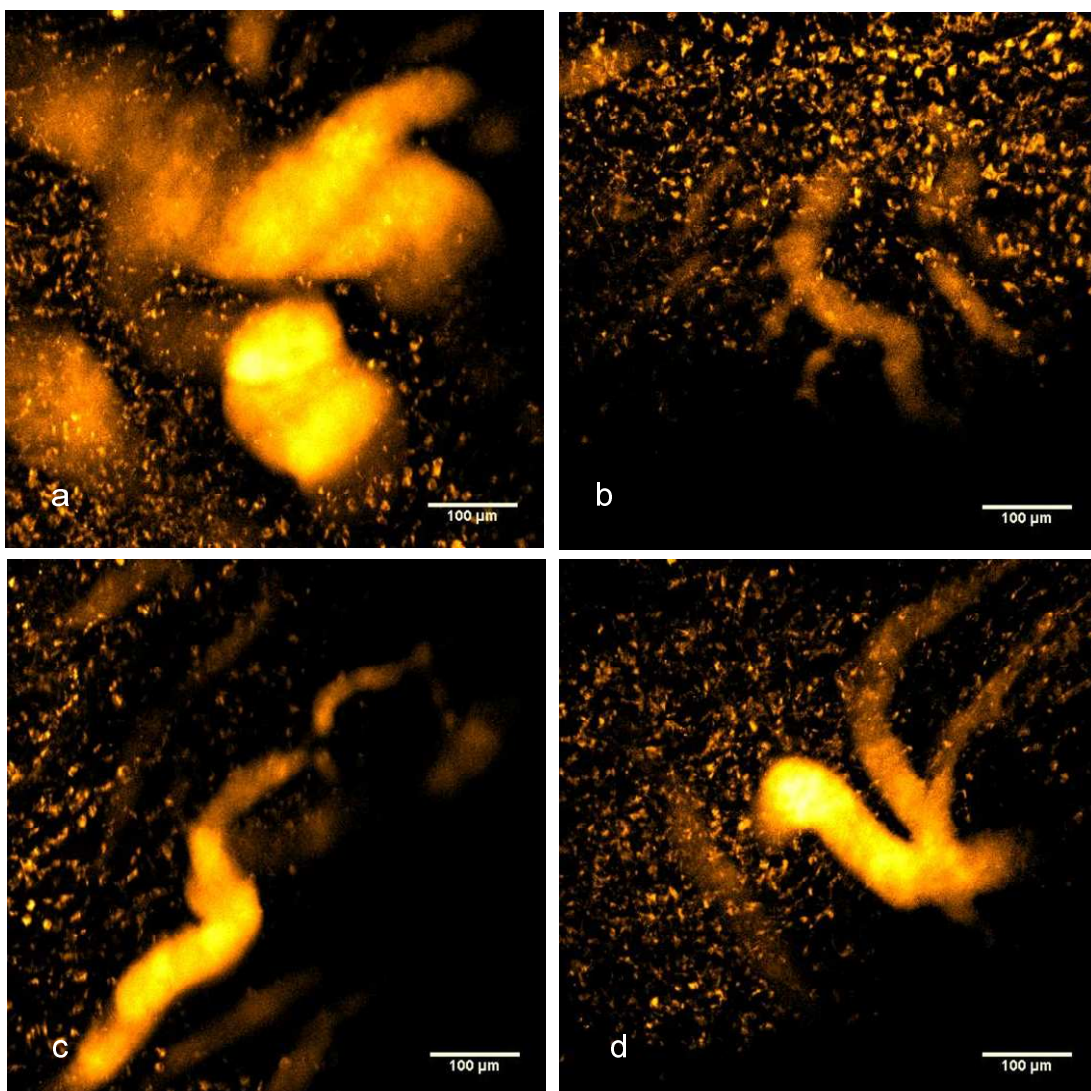
#### **VI.2.1.1. Protocole expérimental**

Préalablement à l'implantation de la tumeur les souris (Swiss nude, Charles River Laboratories, Lyon, France) ont été anesthésiées dans une atmosphère à 5% d'isoflurane. Ensuite, environ  $10^5$  cellules (gliomes F98) dans 100  $\mu$ l ont été implantées de manière sous-cutanée dans la cuisse supérieure de l'animal. Puis, la souris est mise en stabulation 15 jours jusqu'à obtenir une tumeur d'environ 50 à 100 mm<sup>3</sup>.

Avant l'imagerie, 100  $\mu$ l d'émulsion à base de Pluronic F68 et de dérivé de distyryl benzène ont été injectés par une veine de la queue de la souris. Quatre heures plus tard, l'animal a été sacrifié de manière à pouvoir imager dans la cuisse sans être gêné par les mouvements. Une incision de la peau (très diffusante) a ensuite été faite au dessus de la tumeur avant de la placer à la verticale de l'objectif. La configuration du microscope qui a été utilisée est similaire à celle décrite dans la section VI.1.1.

### VI.2.1.2. Résultats et discussion

On peut voir sur la figure VI-5 que 4 heures après l'injection de l'émulsion, on retrouve une coloration importante dans les vaisseaux en périphérie de la tumeur. Ces vaisseaux apparaissent dilatés, mais le colorant est encore présent en concentration importante dans le sang. On observe également de nombreuses cellules marquées par le colorant en périphérie de la tumeur. Ces cellules sont très probablement des mastocytes. Ces cellules interviennent généralement en réponse à une prolifération tumorale ou à l'angiogénèse et captent apparemment le chromophore à la surface des tumeurs.



**Figure VI-5.** Z projections of 50 images espacées de 5  $\mu\text{m}$  prises en périphéries de tumeurs (gliomes F98) implantées de manière sous cutanée dans des souris nude.

## **VI.2.2. Imagerie de la vascularisation tumorale en fenêtre dorsale**

Compte tenu l'absence de diffusion des marqueurs observée 4 heures après l'injection sur les tumeurs in situ, les marqueurs ont été utilisés pour imager la vascularisation tumorale en fenêtre dorsale. Ces expériences ont été faites pour des applications de suivi de traitements anticancéreux sur des modèles de cancer des poumons. Ces traitements permettent d'augmenter la perméabilité vasculaire et de diminuer la perfusion au niveau de la tumeur. La microscopie bi-photon et l'utilisation de tumeurs en fenêtre dorsale permettent de suivre la cinétique d'action et de voir les effets directs de ces traitements sur les vaisseaux de la tumeur. Cependant, pour pouvoir imager la vascularisation sur des temps assez longs, il est nécessaire d'utiliser des colorants non diffusibles. L'imagerie de la vascularisation d'une tumeur en fenêtre dorsale a été réalisée successivement en utilisant le dérivé de distryl benzène dans le PluronicF68 ou la RhodamineB-Dextran 70 kDa pour mettre en avant le caractère non diffusible des marqueurs à base de Pluronic F68.

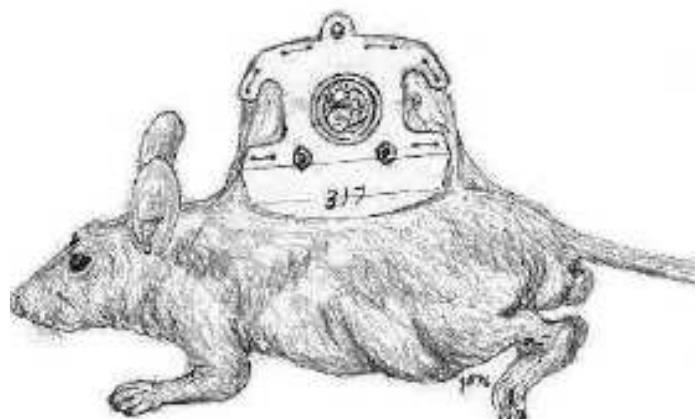
### **VI.2.2.1. Préparation du modèle animal**

Les animaux ont été anesthésiés par inhalation continue d'un flux gazeux (1,5 % isofluran, 30 % O<sub>2</sub>, 70 % Air) et placés sur une plaque chauffant afin de maintenir une température 36-37°C au cours de l'opération. La pose d'une fenêtre dorsale (figure VI-6) est assez longue et délicate à réaliser.

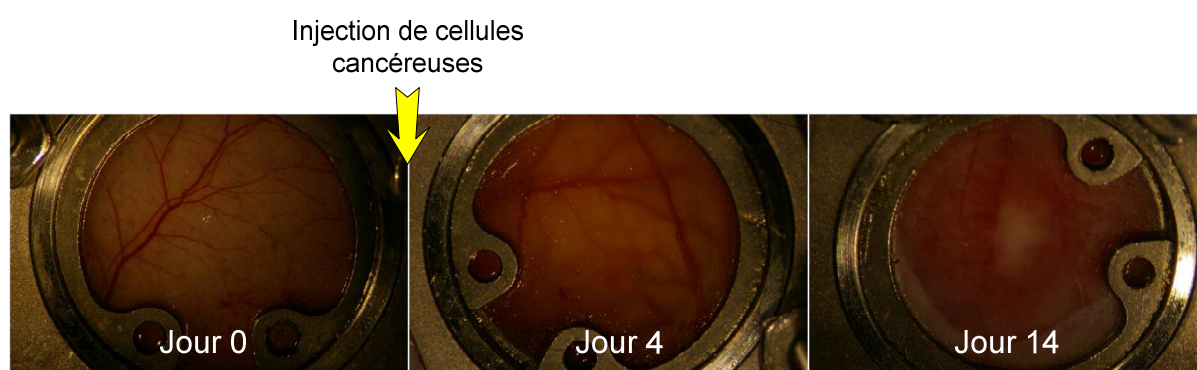
La peau est épilée au niveau du champ opératoire à l'aide d'une crème dépilatoire. Ensuite, l'animal est suspendu à une potence à l'aide de fil de suture en soie pour tendre la peau. On stérilise alors la plaque arrière de la fenêtre dorsale dans un bain d'alcool. La plaque arrière est ensuite suturée à la peau grâce à des perforations prévues à cet effet. A l'aide de ciseaux à bouts recourbés, une incision circulaire d'approximativement 1.5cm de diamètre est réalisée sur la face avant de la peau. Après le retrait de la peau, l'aponévrose du second feuillet de peau est délicatement incisée. La face avant de la chambre est ensuite posée et serrée à la face arrière grâce à des vis et des écrous. Un antibiotique en pommade (fucidine) est déposé. La fenêtre est ensuite remplie avec du liquide physiologique (NaCl 0.9%) et une lamelle de quartz est déposée avant d'être bloquée à l'aide d'une bague adaptée.

Vingt quatre heures après la pose de la fenêtre dorsale, les animaux ont été à nouveau anesthésiés. La lamelle de quartz a été retirée et des cellules cancéreuses ont été déposées à

proximité d'un vaisseau. Les tumeurs se sont ensuite développées 14 jours (figure VI-7) avant de procéder à l'imagerie.



**Figure VI-6.** Dessin représentant une fenêtre dorsale sur une souris



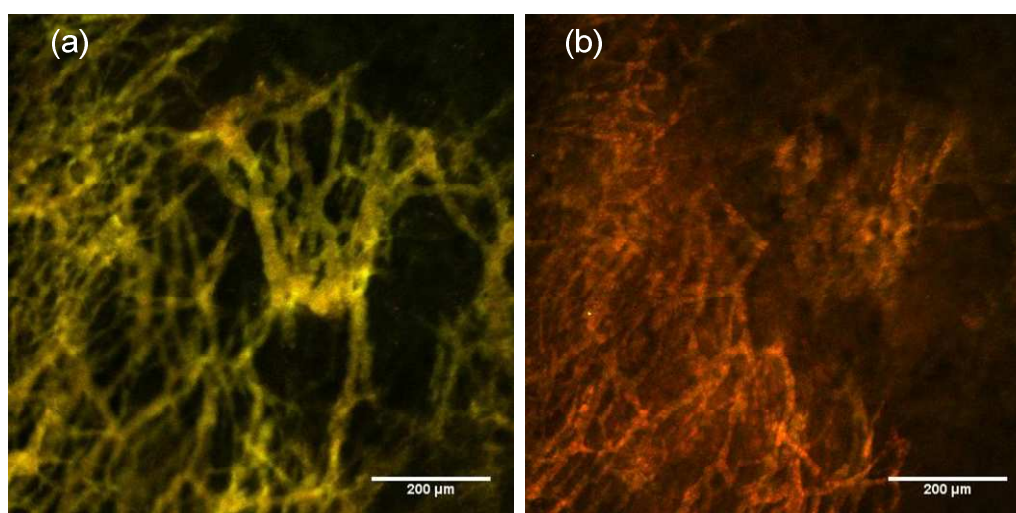
**Figure VI-7.** Développement de la tumeur dans une fenêtre dorsale après injection de cellules de cancer des poumons

#### VI.2.2.2. Résultats

On peut voir sur la figure VI-8a la vascularisation tumorale imagée 30 min après injection d'émulsion à base de PluronicF68. Aucune diffusion du colorant n'est observée avec un bon contraste entre le fond et les vaisseaux fonctionnels de la tumeur. La figure VI-8b montre la même zone 30 min après injection de RhodamineB-Dextran 70 kDa. Le contraste a été perdu dû à la diffusion du colorant dans l'espace extravasculaire.

Cette différence s'explique probablement par la plus grande taille des nanoparticules de Pluronic (20 à 100 nm). En comparaison, la RhodamineB-Dextran 70 kDa a un rayon

hydrodynamique d'environ 8 nm. Il est néanmoins connu que les micelles peuvent diffuser à travers la paroi des vaisseaux sanguins des tumeurs. Cependant, l'utilisation d'émulsion à base de Pluronic F68 et de dérivé de distryl benzène permet d'imager le volume sanguin fonctionnel sur des temps assez longs (environ 1h) sans être gêné par la diffusion du chromophore dans les tissus. D'autres investigations sur des temps plus longs montreraient peut être une accumulation du colorant dans les tissus de la tumeur. On peut noter également qu'il existe des Dextrans de poids moléculaire plus élevé (jusqu'à 500 kDa) dont la diffusion dans les tumeurs est plus lente<sup>58</sup>, cependant, leur solubilité et leur efficacité de fluorescence est moindre que celle des Dextran 70 kDa.

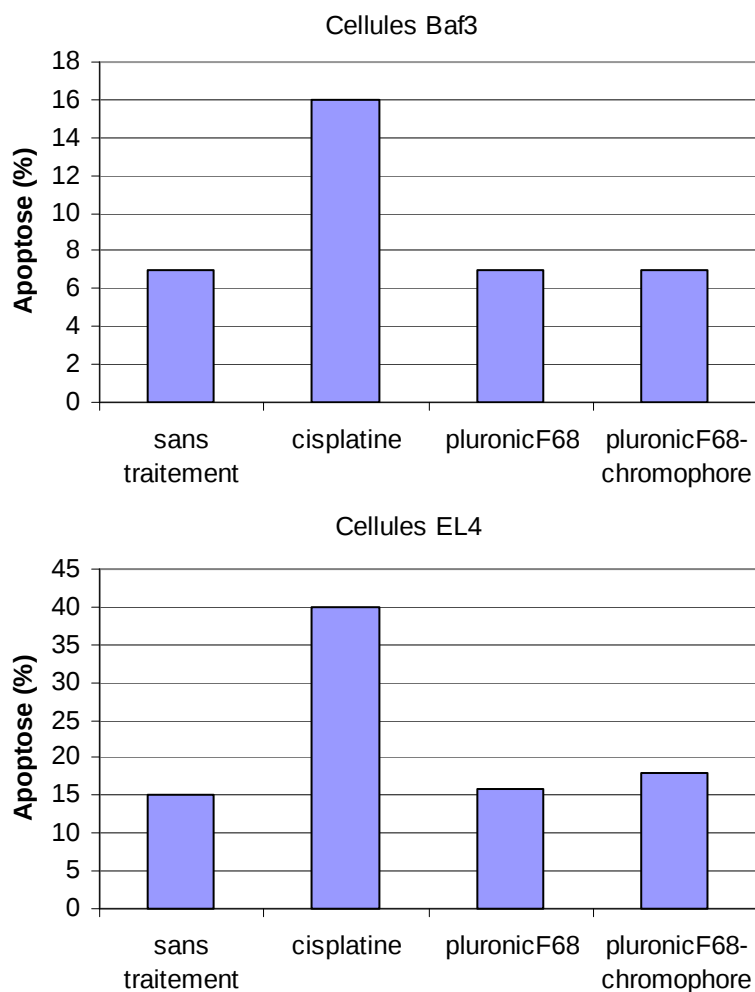


**Figure VI-8.** Images de la vascularisation tumorale prise 30 min après injection d'émulsion à base de Pluronic F68 (a) ou de RhodamineB-Dextran 70 kDa (b)

### VI.3. Toxicité et excrétion

#### VI.3.1. Toxicité des marqueurs in-vitro

Des études ont été menées in vitro sur la toxicité des micelles à base de Pluronic. Différentes cultures cellulaires ont été incubées pendant 3h en présence de Pluronic F68 seul ou de marqueurs à base de Pluronic F68. La mort cellulaire a ensuite été quantifiée après 24 h par cytométrie de flux en utilisant de l'iodure de propidium. Des cellules n'ayant subi aucun traitement et des cellules mises en présence de cisplatine pour provoquer leur mort cellulaire ont également été testées comme contrôle.



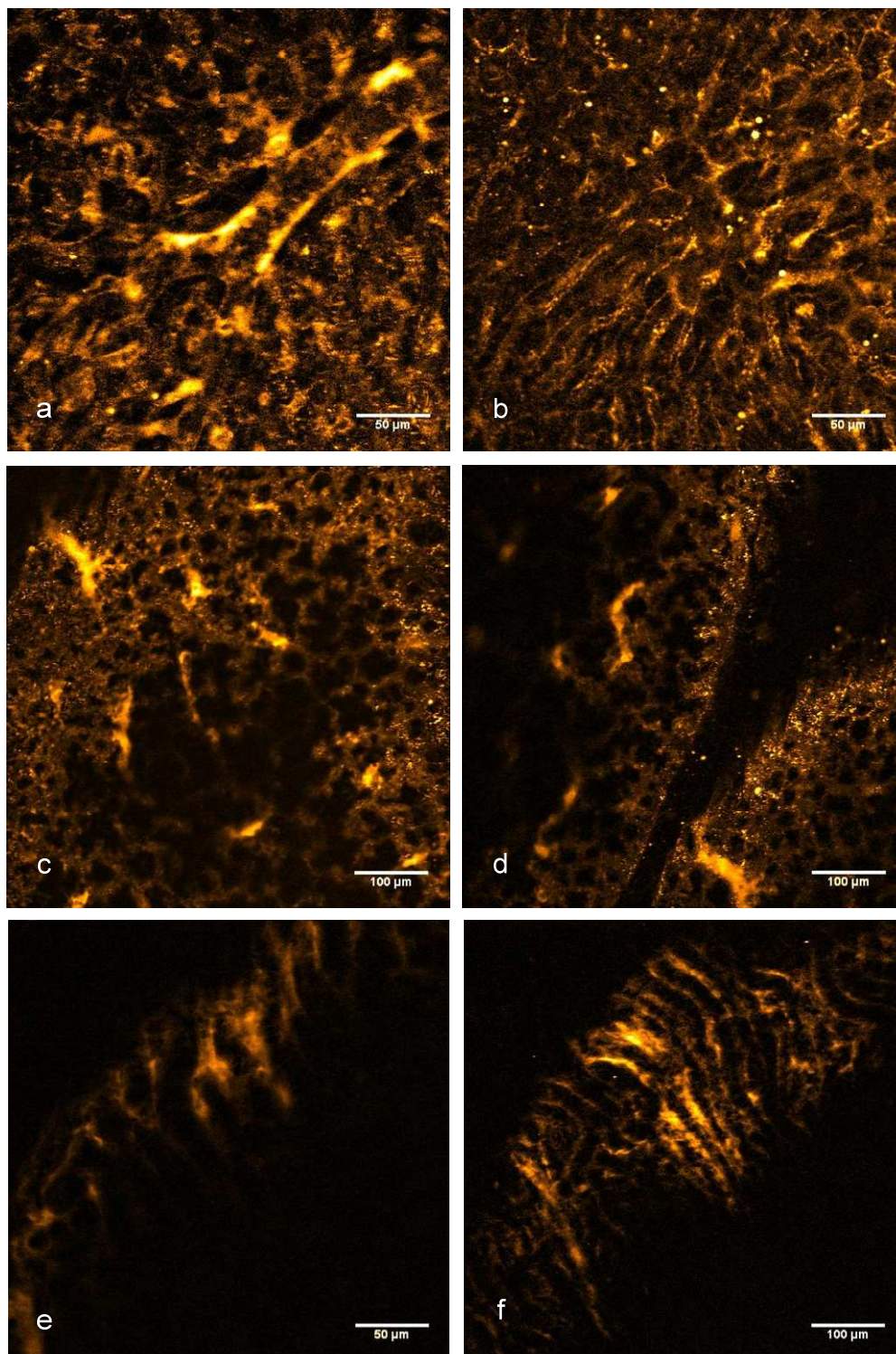
**Figure VI-9.** Pourcentage de mort cellulaire mesuré par cryométrie de flux sur des cellules EL4 ou Baf3. Les cellules ont été incubées pendant 3h en présence de Pluronic F68 (2% w/v) ou d'émulsion à base de Pluronic (20g.l<sup>-1</sup> en Pluronic, 0,1 g.l<sup>-1</sup> en chromophore). L'apoptose a été quantifiée après 24 h par cytométrie de flux. En contrôle les cellules ont été incubées en présence de cisplatine.

Sur les deux types cellulaires étudiés, aucune toxicité des micelles de Pluronic n'a été observée

### VI.3.2. Excrétion du colorant

Différents organes des animaux utilisés précédemment ont été observés après sacrifice. Les poumons, le foie et les reins ont alors été prélevés et immergés dans le sérum physiologique pour permettre leur observation sous le microscope à deux-photons. On peut voir sur la figure VI-10 les images relatives aux différents organes. Les figures VI-10a et b montrent la répartition du colorant dans le foie environ 1heure après injection des micelles de Pluronic.

On observe une accumulation du colorant en dehors des vaisseaux sous forme de gros agrégats. Les mêmes observations sont faites dans les poumons (figure VI-10c et d). Dans les reins, figure VI-10e et f, le colorant semble être resté intravasculaire.



**Figure VI-10.** Analyse de différents organes après sacrifice d'un animal 1 heure après injection de colorant. **a, b.** Images prises dans le foie. **c, d.** dans les poumons et **e, f.** dans les reins

La stabilité du signal de fluorescence dans le temps lors de l'imagerie montre qu'aucune fuite ou accumulation spécifique du colorant n'a lieu les premières heures suivant l'injection. La présence d'agrégats dans le foie peut s'expliquer par la porosité de la vascularisation supérieure à la taille des micelles. Des études sur des temps plus longs ou avec une vision plus globale des organes de l'animal devraient être menées pour connaître les voies d'excrétion du colorant.

#### **VI.4. Résumé et discussion**

Les nanoparticules à base de Pluronic et de dérivé de distyryl benzène permettent d'imager efficacement la vascularisation saine et tumorale. En environnement sain, elles permettent d'obtenir un marquage homogène et similaire à celui obtenu avec la RhodamineB-Dextran 70 kDa. On peut imager à des profondeurs comparables (600  $\mu\text{m}$ ) et sur des temps aussi longs (> 1heure) avec chacun des marqueurs. En environnement tumoral, les micelles de Pluronic permettent au chromophore de rester intravasculaires au contraire de la RhodamineB-Dextran 70 kDa qui diffuse à travers les parois de l'endothélium vasculaire. Cette aptitude rend les marqueurs à base de Pluronic intéressants pour l'imagerie du volume sanguin fonctionnel des tumeurs en microscopie bi-photon. On peut ainsi réaliser le suivi de la vascularisation lors de la croissance tumorale ou de traitements anti-vasculaires sans être gêné par la diffusion du colorant dans les tissus de la tumeur.

D'une façon plus générale, l'utilisation des Pluronic permet d'encapsuler de manière générique des colorants hydrophobes solubles dans le chloroforme ne permettant pas d'être utilisés in-vivo. Une fois encapsulés dans les micelles, le dérivé de distyryl benzène utilisé ici peut circuler sur des temps assez long dans le système sanguin. Il est cependant connu que les micelles ne sont pas stables. Les molécules de Pluronic et le chromophore ne sont pas liées entre elles de manière covalente. Il est possible que le chromophore soit relargué dans le sang et capté par d'autres structures hydrophobes présentes dans le sang.

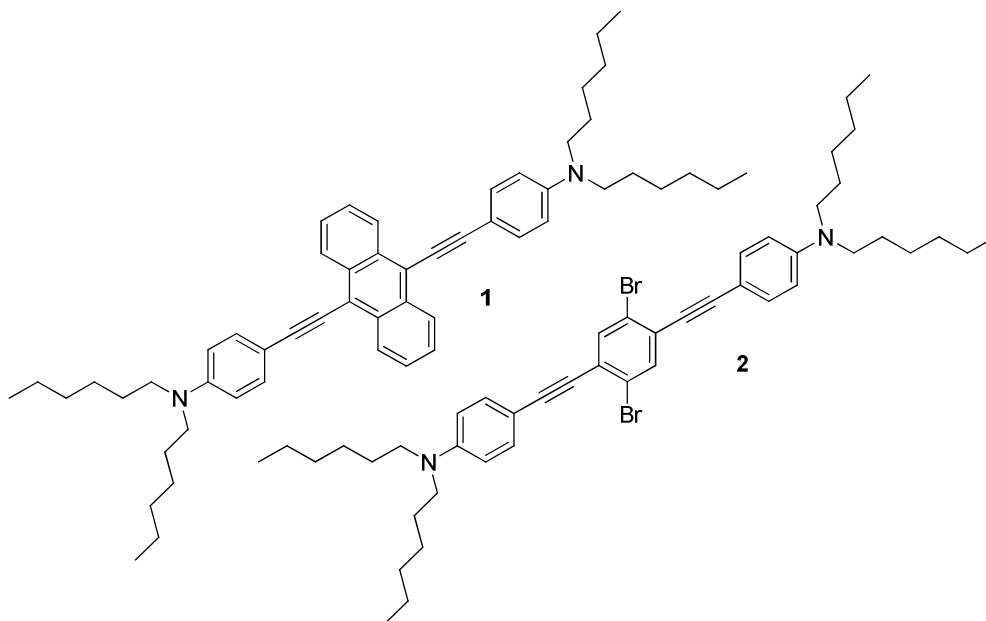
Des études restent à mener pour mieux comprendre comment se comportent les micelles et le dérivé de distyryl benzène en présence du sang. Il faudrait également approfondir le devenir du colorant dans l'animal sur des périodes plus longues pour voir si son élimination est complète ou si son usage peut modifier la physiologie de l'animal.

## Chapitre VII. Application au transport de principes actifs

Comme on l'a vu, les micelles de Pluronic peuvent permettre de solubiliser des chromophores hydrophobes pour les transporter dans la vascularisation. On peut également s'en servir pour transporter des molécules à vocation thérapeutique vers des cellules pathologiques. Le procédé de microémulsion a été utilisé ici avec un photosensibilisateur hydrophobe de manière à le rendre utilisable pour des essais de photothérapie *in vitro*.

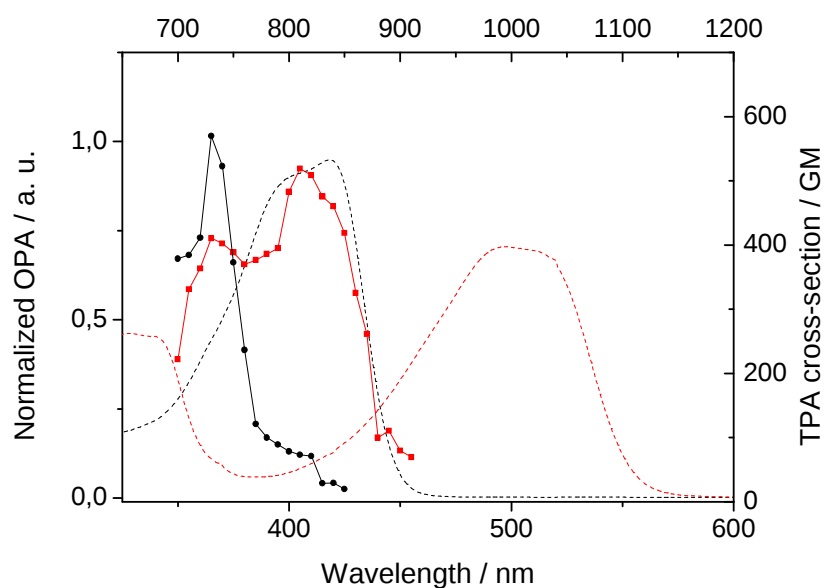
### VII.1. Une molécule pour la photothérapie dynamique à deux-photons

Une molécule pour la photothérapie dynamique a été synthétisée par le groupe de Chantal Andraud sur le même modèle que le chromophore étudié dans la partie V.2. (figure VII-1). Elle présente également une structure quadripolaire avec deux groupements donneurs aux extrémités et un squelette conjugué et ainsi une forte section efficace d'absorption à deux photons. Contrairement au dérivé de l'anthracène, efficace en fluorescence, cette molécule possède au centre un dibromobenzène favorisant les conversions intersystèmes (passage vers des états triplets) et permettant la production d'oxygène singulet.



**Figure VII-1.** Structure du dérivé de l'anthracène à forte section efficace d'absorption à deux photons (1) et du dérivé de dibromobenzène permettant la génération d'oxygène singulet (2)

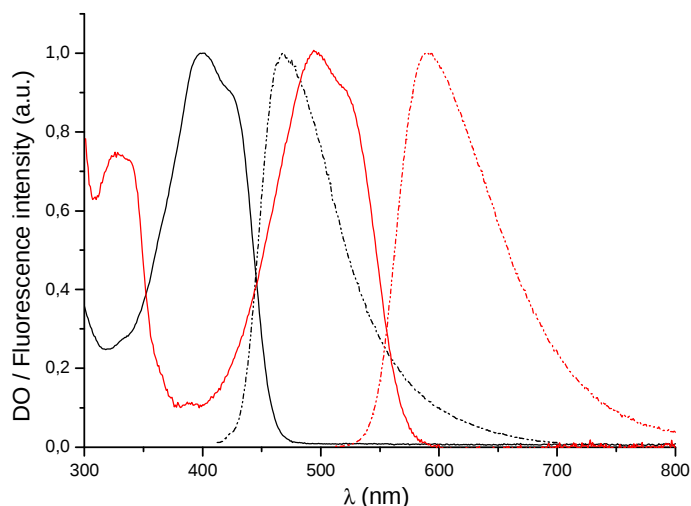
Le centre dibromobenzène modifie le rendement quantique de fluorescence. Il passe de 100 % avec le centre anthracène à 25 %. Il modifie également les spectres de la molécule. En comparaison au dérivé de l'anthracène, l'absorption à un photon est décalée vers les petites longueurs d'onde. Elle est maximum à 421 nm dans le chloroforme contre 513 nm pour la molécule à base d'anthracène. L'absorption à deux photons est moins changée et reste dans la fenêtre de transparence des milieux biologiques. Elle est de 570 GM à 730 nm pour le photosensibilisateur et de 518 GM à 810 nm pour le dérivé de l'anthracène (figure VII-2).



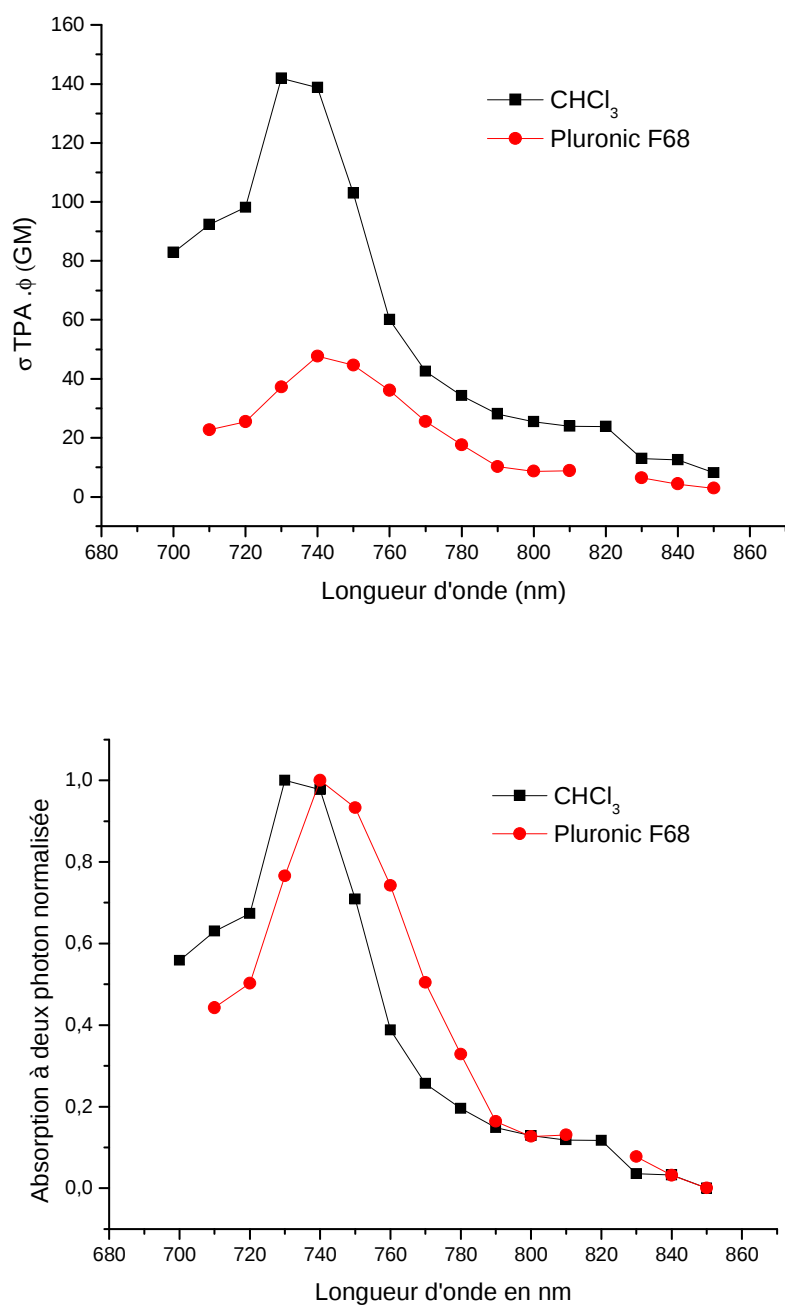
**Figure VII-2.** Spectres d'absorption à deux photons (trait plein) et un photon (pointillés) du dérivé de dibromobenzène (noir) et du dérivé de l'anthracène (rouge) dans le chloroforme.

Un rendement quantique de production d'oxygène singulet de 50 % a été mesuré dans le chloroforme pour cette molécule. L'oxygène singulet est une espèce très réactive et peut être utilisée pour provoquer la mort de cellules vivantes. Cependant, la durée de vie de l'oxygène singulet dans les milieux biologiques est très courte (de 3  $\mu$ s dans l'eau à 100 ns en présence de biomolécules). Ainsi, le rayon d'action de l'oxygène singulet dans les organismes vivants (<20 nanomètres) limite les dégâts aux zones irradiées contenant des photosensibilisateurs<sup>59</sup>. Pour pouvoir utiliser une molécule en photothérapie dynamique il faut donc qu'elle puisse pénétrer à l'intérieur des cellules. Encapsuler ce photosensibilisateur dans des micelles de Pluronic peut être un bon moyen de solubiliser la molécule et lui permettre de s'accumuler dans les cellules.

Comme on l'a montré pour le composé 1 dans le Chapitre V, on peut incorporer ce photosensibilisateur hydrophobe dans des micelles de Pluronic. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des deux molécules dispersées dans les micelles de Pluronic F68 sont montrés sur la figure VII-3. On observe comme pour le dérivé de l'anthracène une perte de la fluorescence. Le rendement quantique de fluorescence du photosensibilisateur passe de 25 % dans le chloroforme à moins de 1% dans le Pluronic F68. L'incertitude sur le rendement dans le Pluronic F68 ne permet pas de mesurer directement la section efficace d'absorption à deux photons. On peut cependant mesurer la section efficace de fluorescence à deux photons ( $\sigma_{\text{TPA}} \cdot \Phi$  avec  $\Phi$  le rendement quantique de fluorescence). On peut voir sur la figure VII-4 que la fluorescence à deux photons est 3 fois plus importante dans le chloroforme que dans le Pluronic F68. En tenant compte du faible rendement quantique de fluorescence (au moins 25 fois plus faible dans le Pluronic que dans le chloroforme), la section efficace d'absorption à deux photons du photosensibilisateur apparaît bien plus élevée dans le Pluronic. On peut voir également sur les spectres normalisés que l'absorption à deux photons est légèrement décalée dans les micelles par rapport au chloroforme (maximum à 740 nm dans le Pluronic F68 contre 730 dans le chloroforme).



**Figure VII-3.** Spectres d'absorption (trait plein) et d'émission (pointillés) de 1 (rouge) et 2 (noir) dispersé dans les micelles de Pluronic F68.



**Figure VII-4.** Spectres de fluorescence à deux photons (produit de la section efficace d'absorption à deux photons et du rendement quantique de fluorescence) du dérivé de dibromobenzène dans le chloroforme ou en émulsion (en haut). Spectres d'absorption à deux photons normalisés (en bas).

## **VII.2. Transport dans les cellules in-vitro et photothérapie**

Les micelles de Pluronic sont ici un bon moyen de solubiliser efficacement le photosensibilisateur hydrophobe dans un milieu biologique (ici un milieu de culture cellulaire). Cette molécule doit pouvoir ensuite s'accumuler à l'intérieur des cellules. On peut envisager différents mécanismes de pénétrations du photosensibilisateur dans les cellules. Il peut par exemple être relargué par la micelle vers les parties lipophiles des cellules. On peut également envisager que des micelles ou des unimer de Pluronic rentrent dans la cellule avec le photosensibilisateur. Dans tout les cas, la captation dans les cellules va dépendre du type de système Pluronic-chromophore utilisé et du type cellulaire.

### **VII.2.1. Captation par les cellules**

La captation du photosensibilisateur a été étudiée dans différents type cellulaires. La cinétique d'internalisation de la molécule a été estimée en microscopie de fluorescence classique sur des gliomes F98 (modèle de tumeur cérébrale de rat). Les mêmes études ont été menées par cytométrie de flux sur deux autres types cellulaires provenant de souris, des lymphome EL4 et des cellules Baf3.

#### **VII.2.1.1. Protocoles expérimentaux**

- **Culture cellulaire**

Les gliomes F98 ont été cultivés dans un milieu de culture complet (DMEM GlutaMAX-I contenant 10% de sérum de veau fœtal,  $4.5 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose, du sodium pyruvate, 1% d'une mixture d'antibiotiques (Penicilin-G à  $10000 \text{ U/mL}$  et Streptomycin à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans une solution saline) et des acides aminés non essentiels (BioWhittaker)) dans un incubateur à  $37^\circ\text{C}$  et 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Les cellules EL4 et Baf3 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Invitrogen Life Technologies) complété par 6 % de sérum de veau fœtal (Lonza, Belgium) et de la gentamicin à  $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$  (Invitrogen). Le milieu des cellules a été en plus complété par 5% de milieu conditionné par des cellules Wehi-3B. Les cellules se sont développées à  $37^\circ\text{C}$  dans une atmosphère humide à 7% en  $\text{CO}_2$ .

- **Etude en microscopie**

Ces études ont été faites à l'aide d'un microscope inversé Zeiss Axiovert permettant une observation en épifluorescence. Le microscope est équipé d'un incubateur permettant de maintenir la température à 37 °C et le CO<sub>2</sub> à 5 % au niveau de l'échantillon. L'excitation a été faite par l'intermédiaire d'une lampe à vapeur de mercure à arc court (HBO 100) couplée à un régulateur de puissance. Un cube de fluorescence permet de séparer la lumière d'excitation (436 nm) de la fluorescence collectée (480 nm). Les images sont collectées par une caméra numérique (1Mega pixels) et enregistrées par l'intermédiaire du logiciel Zeiss Axiovision.

Pour l'observation de la biodistribution, les cellules ont été cultivées dans des supports LabTek (Nunc). Elles ont été incubées 4 heures en présence de 40 µL d'émulsion à base du composé 2 et de Pluronic F68 (0,1 mg.mL<sup>-1</sup> en photosensibilisateur) dans 400 µL de milieu ou 24 h en présence d'émulsion à base de Pluronic F127 (0,1 mg.mL<sup>-1</sup> en photosensibilisateur). Des images de transmission ou d'épifluorescence ont ensuite été prises avec un objectif x100 à immersion à huile.

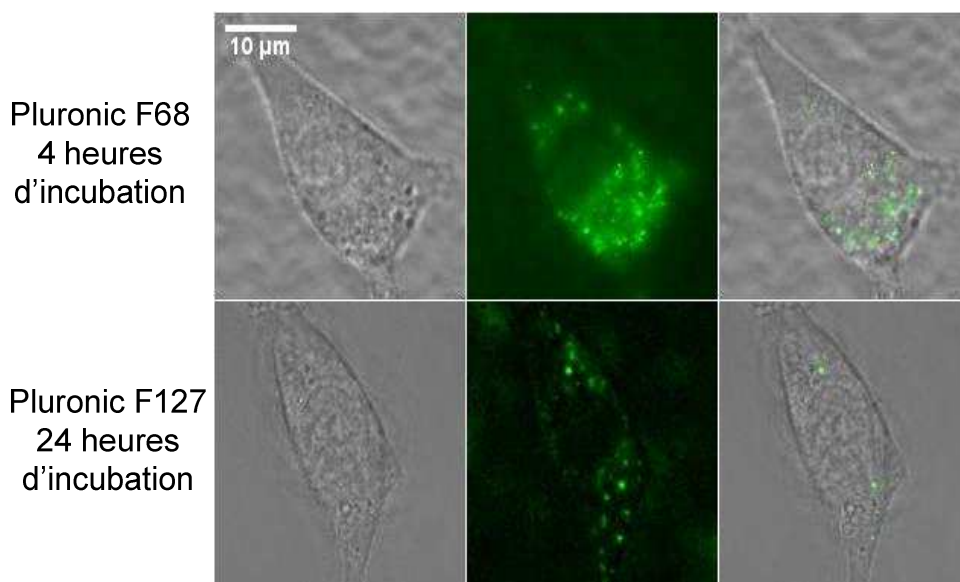
Pour l'étude de la cinétique de captation, les cellules ont été incubées dans des boîtes de Petri avec 200 µL d'émulsion à base du composé 2 et de Pluronic F68 dans 2 mL de milieu de culture pour différents temps (10, 20, 30, 50 et 80 min). Des images de fluorescence ont ensuite été prises à travers un objectif x10. La quantité de fluorescence présente dans le cytoplasme des cellules a été déterminée en utilisant le logiciel Image J.

- **Analyse en cytométrie de flux**

La captation du produit dans les cellules EL4 ou Baf3 a été analysée grâce à un cytomètre (Canto II, BD Biosciences) en utilisant une excitation à 405 nm et une détection à 450 nm. Les cellules (5 10<sup>5</sup> cellules par mL) ont été incubées pour différents temps en présence d'émulsion à base de composé 2 et de Pluronic F68 diluée dix fois dans le milieu de culture (concentration finale de 10 µg.mL<sup>-1</sup> en composé 2). Pour chaque temps d'incubation, la fluorescence de 10000 cellules a été enregistrée.

### VII.2.1.2. Résultats

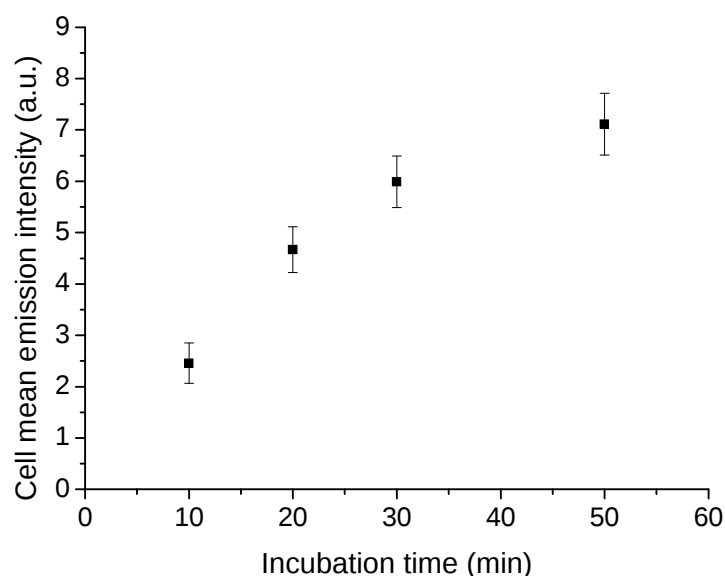
Les expériences réalisées montrent que le photosensibilisateur solubilisé par les micelles de Pluronic peut s'accumuler dans le cytoplasme des cellules. La figure VII-5 montre la répartition du chromophore dans des gliomes F98 après 4 heures d'incubation en présence du photosensibilisateur dans des micelles de Pluronic F68 ou 24 heures d'incubation en présence du photosensibilisateur dans des micelles de Pluronic F127. Dans les deux cas, on observe de la fluorescence dans le cytoplasme des gliomes. On peut voir que le marquage est très intense avec les micelles de Pluronic F68 après 4 heures d'incubation alors qu'un faible signal est observé après 24 heures d'incubation en présence de chromophore dans le Pluronic F127. Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence d'hydrophobicité des deux Pluronic. Le Pluronic F68 plus hydrophile que le Pluronic F127 peut probablement relarguer plus facilement le chromophore vers les parties lipophiles des cellules. Cependant, des études montrent que le Pluronic F68 peut rentrer dans certaines cellules et s'accumuler dans les endosomes et les lysosomes<sup>60</sup>. Il n'est pas exclu que la différence de marquage obtenue avec les deux Pluronic puisse être due à l'accumulation du Pluronic F68 solubilisant le photosensibilisateur.



**Figure VII-5.** Images de gliomes F98 après 4 heures d'incubation en présence du photosensibilisateur dans le Pluronic F68 ou 1 jour d'incubation en présence du photosensibilisateur dans le Pluronic F127. Transmission (à gauche), fluorescence (au milieu) et superposition (à droite)

La cinétique d'internalisation a été étudiée pour le Pluronic F68. L'évolution du signal de fluorescence cytoplasmique dans le temps a été mesurée pour les gliomes F98 (figure VII-6). On peut voir une internalisation du produit assez rapide dans l'heure suivant le début de l'incubation. Cependant, l'accumulation continue ensuite au cours du temps. D'autres études ont été faites en cytométrie de flux sur des cellules EL4 et Baf3. Le photosensibilisateur dans le Pluronic F68 ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du Pluronic F68 à 2%) a été incubé pour différents temps avec les cellules. Les cellules ont ensuite été lavées et le signal de fluorescence moyen a été mesuré sur environ 10000 cellules. Les résultats montrés sur la figure VII-7 indiquent une internalisation rapide dans les 20 premières minutes puis continue ensuite sur environ 3 heures.

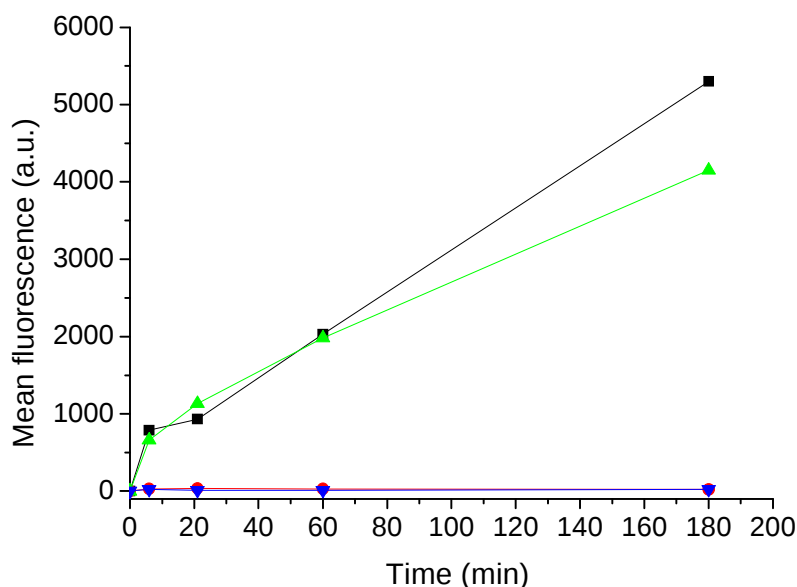
La captation ne semble pas trop dépendre du type cellulaire et les mêmes cinétiques d'internalisation sont observées pour les cellules EL4 ou les cellules Baf3. Ces résultats sont également en accord avec les observations faites en microscopie sur les gliomes F98. L'incorporation du photosensibilisateur dans des micelles de Pluronic F68 permet donc une accumulation rapide dans les cellules étudiées.



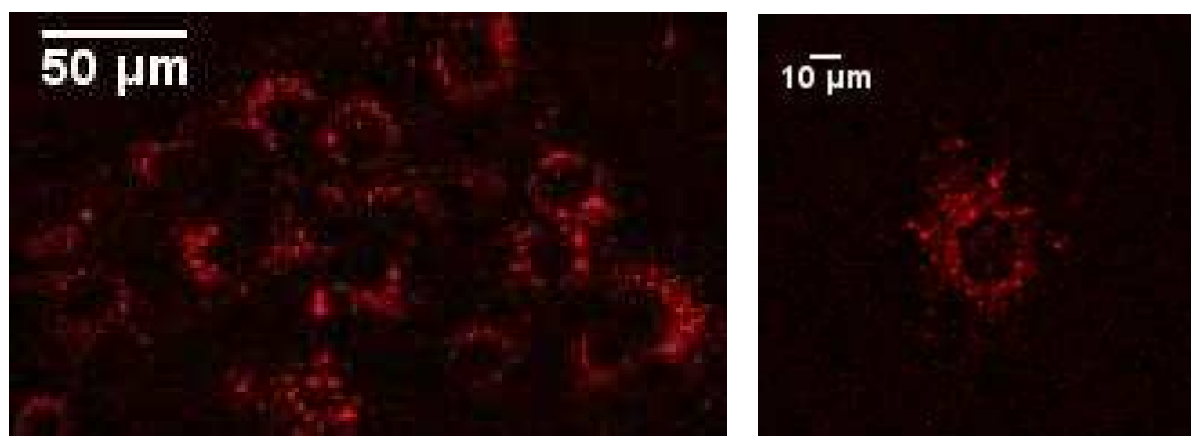
**Figure VII-6.** Cinétique d'internalisation du photosensibilisateur dans les gliomes mesurée en microscopie.

Le dérivé de l'anthracène peut de la même façon être transporté dans les gliomes F98. Des images du chromophore dans les gliomes ont été prises en microscopie à deux photons (figure VII-8). Les images ont été réalisées après 4h d'incubation en présence du chromophore dans

le Pluronic F68. On peut facilement imager les cellules sans rincer le colorant présent dans le milieu de culture. Comme pour le dérivé de dibromobenzène, le chromophore est réparti de manière discrète dans le cytoplasme des cellules. Cette répartition provient probablement d'une accumulation dans des vésicules présentes à l'intérieur du cytoplasme.



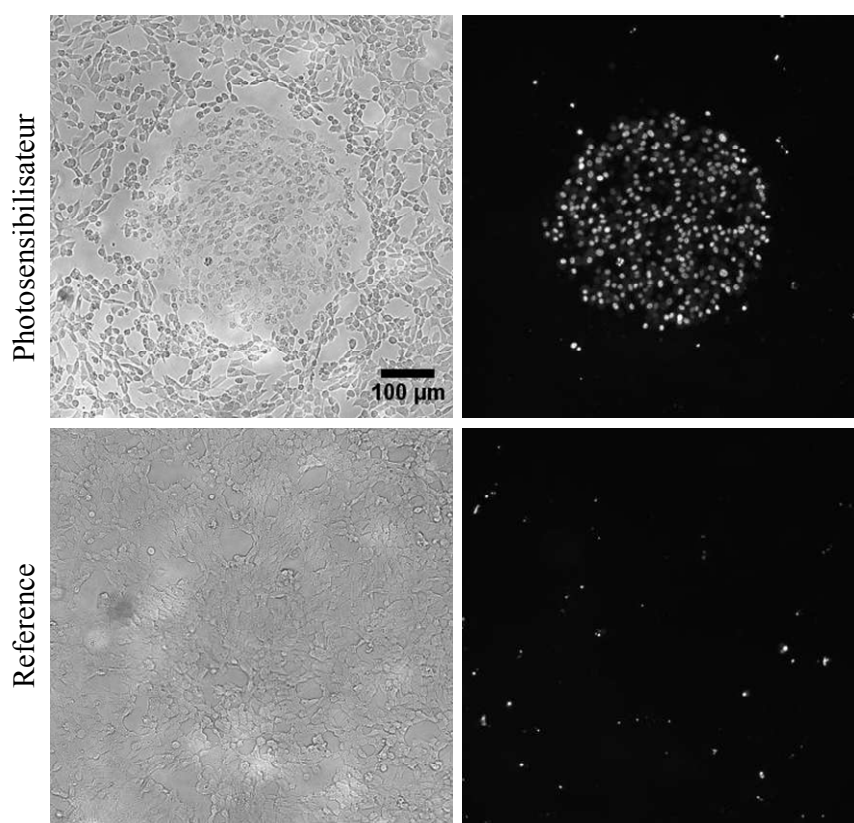
**Figure VII-7.** Cinétique d'internalisation du photosensibilisateur dans des cellules EL4 (carré noir) et dans des cellules Baf3 (triangles vert) mesurée en cytométrie de flux. En bleu et en rouge on peut voir des contrôles en l'absence de colorant.



**Figure VII-8.** Z-projection de 10 images (intervalle de 2µm) de gliomes F98 après 4 heures d'incubation en présence du dérivé de l'anthracène dans le Pluronic F68. Les images ont été prises avec une longueur d'onde d'excitation de 820 nm et une puissance laser de 20 mW pour un temps d'acquisition de 0,9 secondes/image

### VII.2.2. Photothérapie dynamique

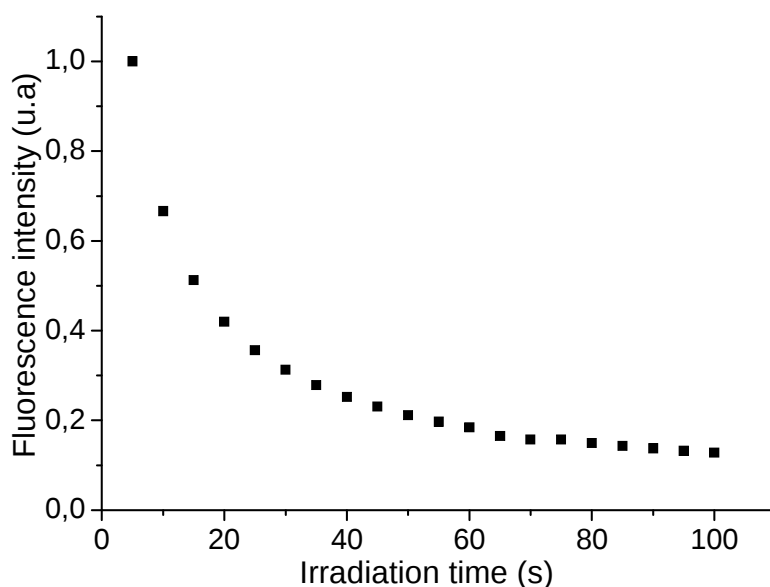
La répartition du chromophore dans les cellules permet d'envisager des essais de photothérapie sur les gliomes F98. Les cellules ont été incubées en présence de photosensibilisateur dans le pluronic F68 ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans le milieu de culture) pendant 1 heure. Les cellules ont ensuite été rincées et irradiées à  $436 \pm 10 \text{ nm}$  à travers le microscope de fluorescence avec une puissance de  $2 \text{ mW.cm}^{-2}$  pendant 5 minutes. 1 heure après l'irradiation, la mort cellulaire a été révélée par de l'iodure de propidium ( $1 \mu\text{M}$  pendant 1 minute). La même expérience a été réalisée sans le photosensibilisateur comme référence.



**Figure VII-9.** Images (objectif x10) de transmission (à gauche) et de fluorescence (à droite) de gliomes F98 1 heure après irradiation ( $300 \text{ J.cm}^{-1}$ ) à  $436 \text{ nm}$  en présence de photosensibilisateur ou sans photosensibilisateur (référence). La fluorescence observée est due à l'iodure de propidium présent dans les cellules mortes.

On peut voir sur la figure VII-9 que l'irradiation en présence de chromophore engendre une mortalité cellulaire importante sur la zone irradiée. En comparaison, une irradiation en l'absence de photosensibilisateur ne donne pas de mort cellulaire. L'évolution du signal de fluorescence dans les cellules a été enregistrée au cours de l'irradiation. La figure VII-10 montre que le signal de fluorescence décroît de manière très rapide dans les cellules.

On perd rapidement 80 % du signal en moins d'une minute d'irradiation. Cette décroissance rapide est probablement due à des phénomènes de photoblanchiment indiquant la destruction du chromophore par des espèces radicalaire ou directement par l'oxygène singulet.



**Figure VII-10.** Photoblanchiment du photosensibilisateur à l'intérieur des cellules.

### VII.2.3. Résumé

On peut faire internaliser le photosensibilisateur ou le chromophore dérivé dans de l'anthracène dans différents types de cellules. La captation de ces molécules dépend du type de Pluronic utilisé et est maximum pour le Pluronic F68. Une internalisation rapide et continue du produit a été observée sur les différentes lignées cellulaires étudiées. Cette captation plus rapide pourrait s'expliquer par un relargage plus rapide du chromophore par le Pluronic F68 (plus hydrophile que le Pluronic F127). On peut également supposer que le Pluronic rentre dans les cellules en même temps que le photosensibilisateur. Des études montrant une internalisation des molécules de Pluronic F68 dans les liposomes de certaines cellules ont été réalisées<sup>60</sup>.

L'accumulation du photosensibilisateur dans le cytoplasme rend possible une utilisation en photothérapie dynamique. Les résultats obtenus ici semblent encourageants et permettent d'envisager des essais de photothérapie à deux photons.

## Chapitre VIII. Perspective : Vectorisation des nanoparticules

Comme on l'a vu dans le Chapitre III, La vectorisation des nanoparticules par un peptide ou un autre agent de ciblage peut permettre de cibler de manière spécifique un certain type cellulaire et ouvre un champ important d'applications.

### VIII.1. Fonctionnalisation des nanoparticules

On peut envisager une vectorisation des nanoparticules en modifiant les terminaisons des Pluronic (figure VIII-1). La stratégie employée ici consiste à transformer les fonctions alcools (-OH) situées aux extrémités des segments hydrophiles des Pluronic en fonctions aldéhydes (-COH). Ce type de fonction en surface des nanoparticules doit permettre d'attacher ensuite de manière covalente un peptide ou un anticorps par l'intermédiaire d'une fonction amine (-NH<sub>2</sub>) en formant une base de Schiff.

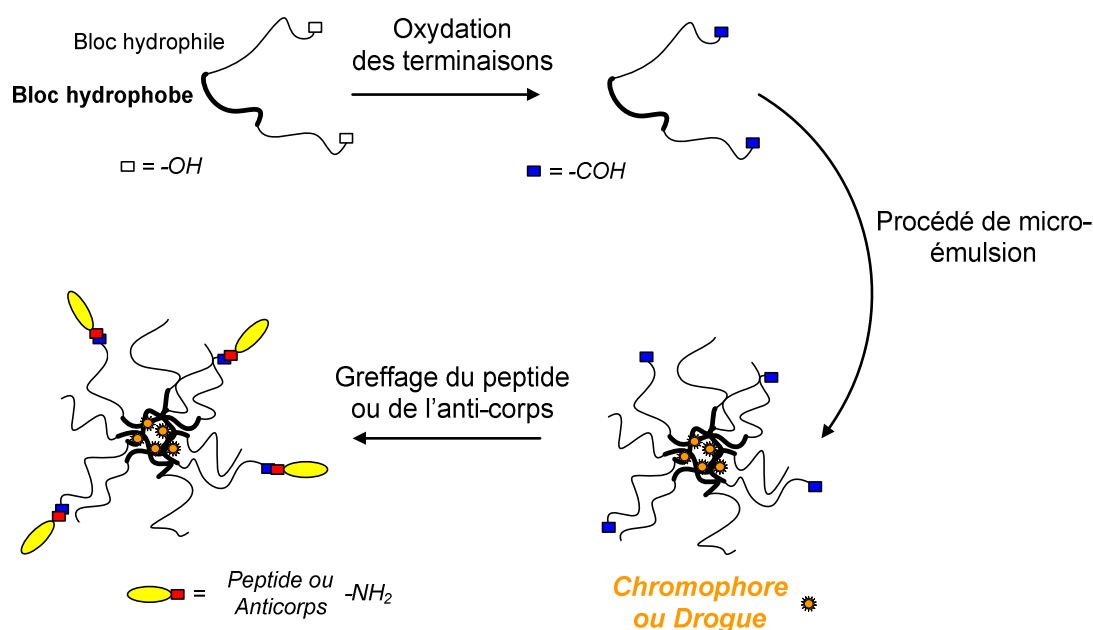
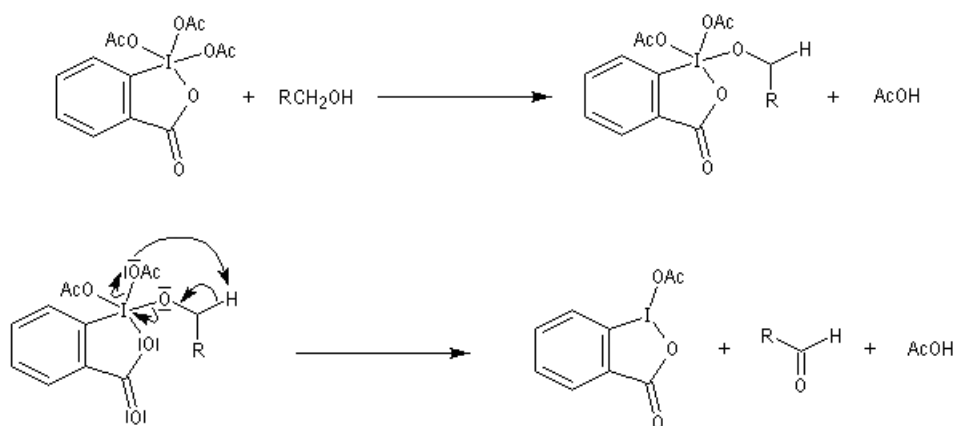


Figure VIII-1. Stratégie de ciblage envisagée

### VIII.1.1. Oxydation des fonctions –OH des Pluronic

La première étape consiste à modifier les terminaisons alcools des Pluronic. Pour cela, on a utilisé le Dess-Martin periodinane (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one). Ce réactif permet d'oxyder des fonctions alcools pour les transformer en fonctions aldéhydes (figure VIII-2).



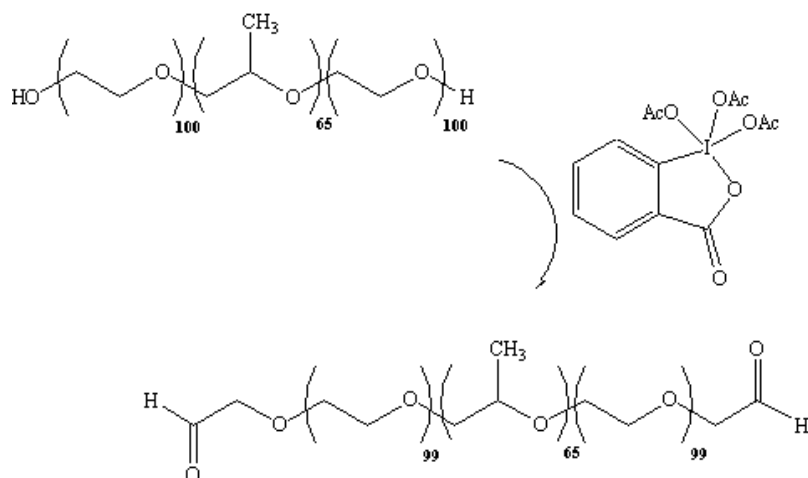
**Figure VIII-2.** Mécanisme d'oxydation par le Dess-Martin periodinane

#### • Protocole expérimental

On a fait réagir du Pluronic F127 ( $M_w = 12600\text{g/mol}$ ,  $1\text{mM}$ ) avec du Dess-Martin en ( $M_w = 424\text{g/mol}$ ,  $c = 2,4\text{ mM}$ ) dans  $100\text{mL}$  de dichlorométhane pendant  $24\text{h}$  sous agitation magnétique à température ambiante (figure VIII-3).

Le Pluronic a été ensuite extrait à travers l'hexane :

- On ajoute  $100\text{ mL}$  d'hexane (miscible avec le dichlorométhane) avant d'évaporer le dichlorométhane au rotavapor.
- L'étape est répétée une seconde fois en ajoutant  $400\text{mL}$  d'hexane pour bien éliminer tout le dichlorométhane.
- Une fois le dichlorométhane évaporé, le Pluronic non soluble dans l'hexane précipite
- Quand l'hexane commence à s'évaporer, le récipient a été plongé dans la glace pour faciliter la précipitation du Pluronic.
- On a récupéré ensuite le Pluronic par filtration à travers un verre fritté. Le réactif de Dess Martin soluble dans l'hexane est ainsi éliminé. La poudre a été enfin séchée sous vide primaire pendant  $24\text{h}$ .



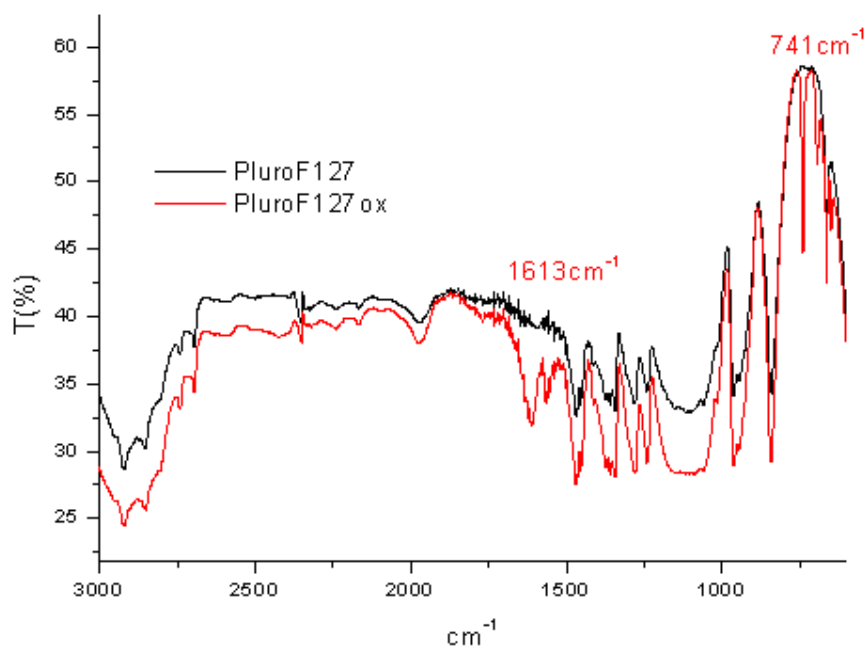
**Figure VIII-3.** Réaction d'oxydation du PluronicF127

- **Rendement de la réaction**

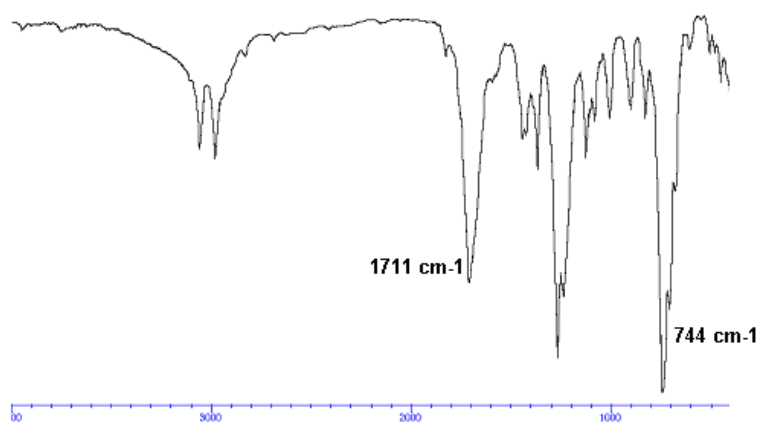
L'expérience a été réalisée pour 1,26g de PluronicF127 et 106mg de Dess-Martin periodinane dans 100mL de dichlorométhane (DessMartin en excès de 20% par rapport au nombre de fonction –OH). On a obtenu 1,22 g de produit après réaction, soit un rendement massique de 97%. Cependant, il est possible que du Dess Martin periodinane soit encore présent.

- **Analyse par spectro IR**

Pour caractériser la pureté du produit, des spectres IR des poudres de PluronicF127 et de Pluronic F127 oxydé ont été réalisés dans des pastilles de KBR (figure VIII-4). La vibration du -COH se trouve en théorie à  $1730\text{cm}^{-1}$  et n'est pas visible sur les spectres, ce qui paraît normal. Celle-ci est probablement noyée dans le bruit de fond. Cependant, des pics supplémentaires apparaissent sur le spectre IR du Pluronic F127 oxydé à  $740$  et  $1613\text{cm}^{-1}$ . Ces raies supplémentaires peuvent être attribuées aux doubles liaisons CC du réactif de Dess-Martin (figure VIII-5).



**Figure VIII-4.** Spectres IR sur pastille de KBR du Pluronic F127 ou du produit de l'oxydation du Pluronic F127 par le réactif de Dess-Martin.



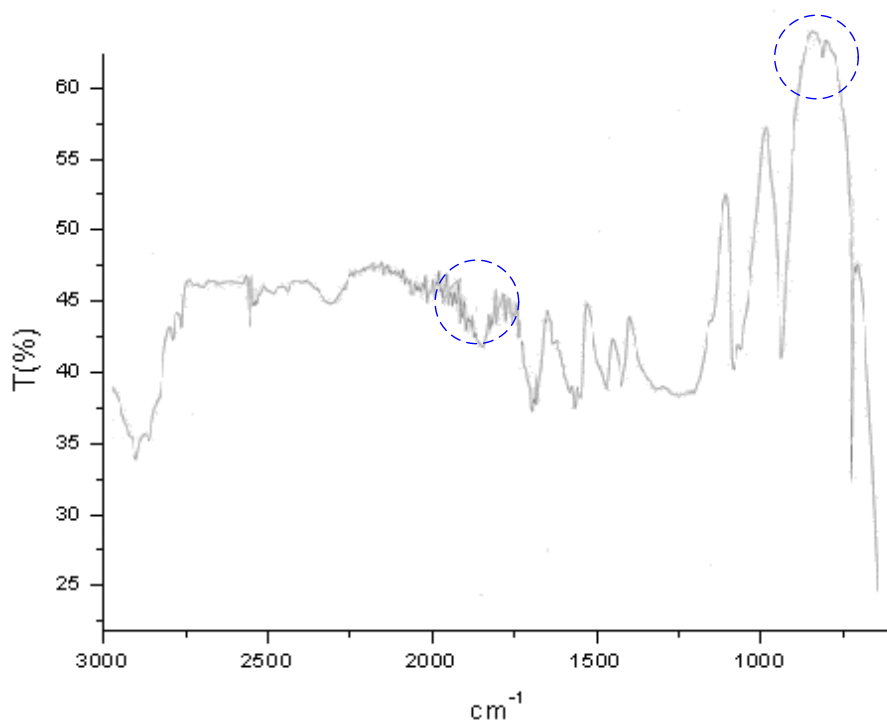
**Figure VIII-5.** Spectre IR du DessMartin

Pour les utilisations en biologie, il est important de diminuer au maximum les résidus indésirables dans le but de conserver le caractère biocompatible de nos marqueurs. Une étape supplémentaire de purification du produit a été réalisée.

### VIII.1.2. Purification du produit

Un montage Soxhlet a été utilisé pour purifier le produit de l'oxydation du pluronic par le réactif de Dess-Martin. Ce montage permet de rincer le produit obtenu avec de l'hexane. Le pluronic non soluble dans l'hexane reste dans le filtre alors que les impuretés sont solubilisées et passent dans le ballon.

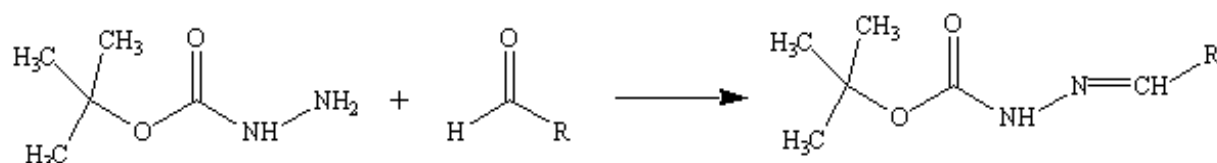
Après 24h de rinçage à l'hexane, on remplace ce dernier par du dichlorométhane. On élimine ainsi les impuretés qui ont été solubilisées dans l'hexane et on récupère le Pluronic dans le dichlorométhane. Le Pluronic oxydé est enfin extrait à travers l'hexane comme décrit précédemment. Après purification, le spectre IR (figure VIII-6) montre que l'on élimine les résidus indésirables. Les pics à  $1613$  et  $742\text{ cm}^{-1}$  ne sont plus présents.



**Figure VIII-6.** Spectres IR sur pastille de KBR du Pluronic oxydé après purification

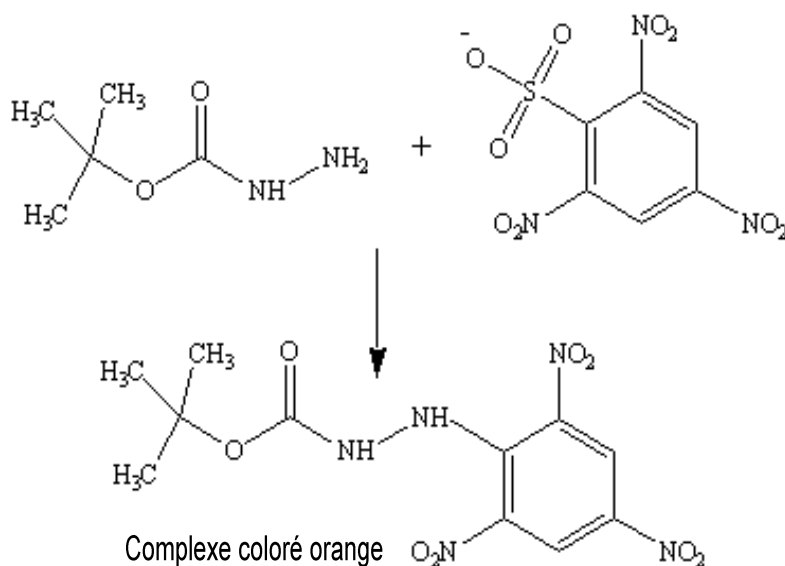
### VIII.1.3. Dosage des fonctions aldéhydes

Il est possible de doser le nombre de fonctions aldéhydes présentes sur les Pluronic oxydés. Ce dosage consiste à faire réagir un excès de ter-butyle carbazate (TBC) qui va se lier de manière covalente sur les fonctions aldéhydes des Pluronic oxydés (figure VIII-7).



**Figure VIII-7.** Réaction entre le TBC et une fonction aldéhyde

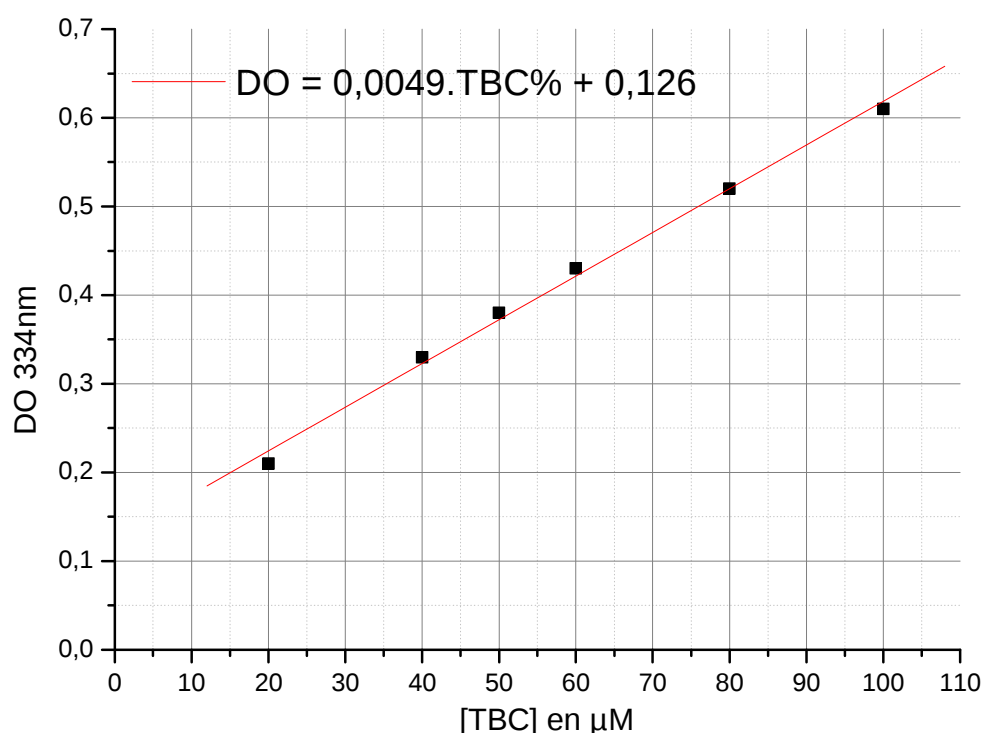
On peut alors doser l'excès de TBC qui n'a pas réagi avec de l'acide picrylsulfonique (acide trinitro-2,4,6 benzenesulfonique, TNBSa). L'acide picrylsulfonique forme un complexe coloré orange avec le ter-butyl carbazate (figure VIII-8). On peut par ce procédé mesurer la concentration en TBC qui n'a pas réagi en réalisant des mesures d'absorbance.



**Figure VIII-8.** Réaction entre le TBC et le TNBSa

- **Dosage du complexe TBC/TNBSa**

On a fait réagir 2mL de TBC ( $0.02\text{mM} < [\text{TBC}] < 0.1\text{mM}$ ) dans un tampon phosphate pH8), avec 1mL de TNBSa (0.01% (w/v) dans le tampon phosphate pH8) pendant 2h sous agitation à 50°C. En fin de la réaction on a acidifié la solution en ajoutant 1mL d'HCl 1M pour stabiliser le complexe puis la DO de la solution à 334nm a été mesurée. La droite d'étalonnage présente sur la figure VIII-9 a été obtenue.



**Figure VIII-9.** Droite d'étalonnage TBC/TNBSa

- **Dosage des fonctions aldéhydes des pluronics oxydés**

On a fait réagir du TBC (1mM) en présence de Pluronic oxydé a pH 4 pendant 24h. La solution a ensuite été diluée par 10 dans le tampon pH8 et l'excès de TBC qui n'a pas réagi a été dosé par le TNBSa comme décrit précédemment. En supposant que la réaction entre le TBC et les aldéhydes des Pluronic est totale, on peut ainsi déduire le pourcentage de fonctions alcools transformées en fonctions aldéhydes.

Le dosage a été réalisé pour deux concentrations en Pluronic oxydé (tableau VIII-1). Environ 18 % de fonctions alcools ont été oxydées en fonctions aldéhydes dans les conditions

expérimentale de la section VIII.1.1 (2,4 moles de réactif de Dess Martin pour 1 mole de Pluronic). D'autres conditions d'oxydation de Pluronic ont été essayées (0.5 et 5 moles de réactif de Dess-Martin pour 1 mole de Pluronic) avec dans ce cas un faible pourcentage de fonction aldéhyde obtenu (<1%).

| Concentration en Pluronic | DO à 334 nm | excès deTBC qui n'a pas réagit | pourcentage de fonctions aldéhydes sur les Pluronic |
|---------------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1,27 mM                   | 0,38        | 0,55 mM                        | $(1-0,55)/(2*1,27) = 19 \%$                         |
| 1,08 mM                   | 0,45        | 0,66 mM                        | $(1-0,66)/(2*1,08) = 16\%$                          |

**Tableau VIII-1.** Résultat du dosage du Pluronic oxydé par le réactif de Dess-Martin

## VIII.2. Conclusion

On peut venir modifier la surface des micelles en oxydant les terminaisons alcool des Pluronic. Dans le cas du Pluronic F127, on peut venir mettre jusqu'à 20 % de groupement aldéhyde sur les terminaisons des Pluronic. Ces modifications ne changent pas trop les propriétés des copolymères qui peuvent toujours servir à la réalisation de micro-émulsion.

Dans le cadre des applications en imagerie in vivo, le peptide RGD pourrait être greffé à la surface des micelles pour cibler l'angiogénèse et les cellules tumorales de manière spécifique. Le peptide RGD cible de manière spécifique les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  particulièrement impliquées dans l'angiogénèse. Les cellules endothéliales qui forment les parois des néovaisseaux expriment en grande quantité cette intégrine et sont donc accessibles depuis la circulation sanguine<sup>61</sup>.

## Conclusions générale et perspectives

L'utilisation des Pluronic et du procédé de micro-émulsion permet d'encapsuler de manière générique des colorants hydrophobes solubles dans le chloroforme. On obtient ainsi des concentrations allant de 0,1 à 0,3 g.l<sup>-1</sup> en chromophore dans des solutions aqueuses de Pluronic (10 à 20 g.l<sup>-1</sup>).

Pour imager la vascularisation, un dérivé de di-stryl benzene à forte section efficace d'absorption a été utilisé. La solubilisation dans les micelles de Pluronic F68 permet au chromophore de circuler sur des temps assez longs dans le système sanguin. On obtient de cette façon un marquage homogène et similaire à celui obtenu avec la RhodamineB-Dextran 70 kDa. On peut imager à des profondeurs comparables (600 µm) et sur des temps aussi longs (> 1heure) avec chacun des marqueurs. En environnement tumoral, les micelles de Pluronic permettent au chromophore de rester intravasculaires au contraire de la RhodamineB-Dextran 70 kDa qui diffuse à travers les parois de l'endothélium vasculaire. Cette aptitude rend les marqueurs à base de Pluronic intéressants pour l'imagerie du volume sanguin fonctionnel des tumeurs en microscopie bi-photon. On peut ainsi réaliser le suivi de la vascularisation lors de la croissance tumorale ou de traitements anti-vasculaires sans être gêné par la diffusion du colorant dans les tissus de la tumeur.

Le procédé de microémulsion a aussi été utilisé pour transporter un photosensibilisateur dans des cellules in vitro. Une internalisation rapide et continue du produit a été observée sur les différentes lignées cellulaires étudiées, permettant ainsi une utilisation du photosensibilisateur en photothérapie dynamique.

Enfin, on a montré qu'il était possible de modifier la surface des micelles pour envisager une fonctionnalisation par le RGD peptide.

## Références bibliographiques

1. P. Sarrazin, L. Valecce, D. Beneventi, D. Chaussy, L. Vurth and O. Stephan, "Photoluminescent Paper Based on Poly(fluorene-co-fluorenone) Particles Adsorption on Modified Cellulose Fibers," *Advanced Materials* 19(20), 3291-3295 (2007)
2. F. R. Maxfield, "Measurement of vacuolar pH and cytoplasmic calcium in living cells using fluorescence microscopy," *Methods Enzymol* 173(745-771) (1989)
3. M. Sip, P. Herman, J. Plasek and V. Hroudá, "Transmembrane potential measurement with carbocyanine dye diS-C3-(5): fast fluorescence decay studies," *J Photochem Photobiol B* 4(3), 321-328 (1990)
4. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression," *Science* 263(5148), 802-805 (1994)
5. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss, "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics," *Science* 307(5709), 538-544 (2005)
6. M. A. Walling, J. A. Novak and J. R. Shepard, "Quantum dots for live cell and in vivo imaging," *Int J Mol Sci* 10(2), 441-491 (2009)
7. M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau and A. Triller, "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking," *Science* 302(5644), 442-445 (2003)
8. J. L. Pelley, A. S. Daar and M. A. Saner, "State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots," *Toxicol Sci* 112(2), 276-296 (2009)
9. W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," *Science* 248(4951), 73-76 (1990)
10. Y. Tomita, N. Kubis, Y. Calando, A. Tran Dinh, P. Meric, J. Seylaz and E. Pinard, "Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia," *J Cereb Blood Flow Metab* 25(7), 858-867 (2005)
11. M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprünge," *Ann. Phys.* 9(273-295) (1931)
12. C. Xu and W. W. Webb, "Measurement of two-photon absorption cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm," *J. Opt. Soc. Am. B* 13(3), 481-491 (1996)
13. M. Albota, D. Beljonne, J. L. Bredas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Rockel, M.

Rumi, G. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu and C. Xu, "*Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections*," Science 281(5383), 1653-1656 (1998)

14. S. J. Chung, M. Rumi, V. Alain, S. Barlow, J. W. Perry and S. R. Marder, "*Strong, low-energy two-photon absorption in extended amine-terminated cyano-substituted phenylenevinylene oligomers*," J Am Chem Soc 127(31), 10844-10845 (2005)

15. G. M. Lanza and S. A. Wickline, "*Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy*," Prog Cardiovasc Dis 44(1), 13-31 (2001)

16. J. V. Frangioni, "*In vivo near-infrared fluorescence imaging*," Curr Opin Chem Biol 7(5), 626-634 (2003)

17. K. Konig, "*Multiphoton microscopy in life sciences*," J Microsc 200(Pt 2), 83-104 (2000)

18. K. Svoboda and R. Yasuda, "*Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience*," Neuron 50(6), 823-839 (2006)

19. P. S. Tsai, J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden and D. Kleinfeld, "*Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels*," J Neurosci 29(46), 14553-14570 (2009)

20. C. B. Schaffer, B. Friedman, N. Nishimura, L. F. Schroeder, P. S. Tsai, F. F. Ebner, P. D. Lyden and D. Kleinfeld, "*Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion*," PLoS Biol 4(2), e22 (2006)

21. J. F. Cryan and A. Holmes, "*The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety*," Nat Rev Drug Discov 4(9), 775-790 (2005)

22. B. D. Murphy, X. Chen and T. Y. Lee, "*Serial changes in CT cerebral blood volume and flow after 4 hours of middle cerebral occlusion in an animal model of embolic cerebral ischemia*," AJNR Am J Neuroradiol 28(4), 743-749 (2007)

23. P. Verant, C. Ricard, R. Serduc, J. C. Vial and B. van der Sanden, "*In vivo staining of neocortical astrocytes via the cerebral microcirculation using sulforhodamine B*," J Biomed Opt 13(6), 064028 (2008)

24. C. Ricard, J. C. Vial, J. Douady and B. van der Sanden, "*In vivo imaging of elastic fibers using sulforhodamine B*," J Biomed Opt 12(6), 064017 (2007)

25. P. Verant, R. Serduc, B. Van Der Sanden, C. Remy and J. C. Vial, "*A direct method for measuring mouse capillary cortical blood volume using multiphoton laser scanning microscopy*," J Cereb Blood Flow Metab 27(5), 1072-1081 (2007)

26. Z. Bencokova, L. Pauron, C. Devic, A. Joubert, J. Gastaldo, C. Massart, J. Balosso and N. Foray, "*Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin*," J Neurooncol 86(1), 13-21 (2008)

27. J. Wang, L. Ho, L. Chen, Z. Zhao, W. Zhao, X. Qian, N. Humala, I. Seror, S. Bartholomew, C. Rosendorff and G. M. Pasinetti, "*Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease*," J Clin Invest 117(11), 3393-3402 (2007)
28. S. Dedeurwaerdere, K. Vonck, P. Van Hese, W. Wadman and P. Boon, "*The acute and chronic effect of vagus nerve stimulation in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS)*," Epilepsia 46 Suppl 5(94-97) (2005)
29. C. Ricard, M. Fernandez, J. Gastaldo, L. Dupin, L. Somveille, R. Farion, H. Requardt, J. C. Vial, H. Elleaume, C. Segebarth and B. van der Sanden, "*Short-term effects of synchrotron irradiation on vasculature and tissue in healthy mouse brain*," J Synchrotron Radiat 16(Pt 4), 477-483 (2009)
30. R. Serduc, P. Verant, J. C. Vial, R. Farion, L. Rocas, C. Remy, T. Fadlallah, E. Brauer, A. Bravin, J. Laissue, H. Blattmann and B. van der Sanden, "*In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature*," Int J Radiat Oncol Biol Phys 64(5), 1519-1527 (2006)
31. E. L. Bearer and L. Orci, "*Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study*," J Cell Biol 100(2), 418-428 (1985)
32. F. Braet and E. Wisse, "*Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review*," Comp Hepatol 1(1), 1 (2002)
33. P. Carmeliet and R. K. Jain, "*Angiogenesis in cancer and other diseases*," Nature 407(6801), 249-257 (2000)
34. D. Granot, Y. Addadi, V. Kalchenko, A. Harmelin, L. A. Kunz-Schughart and M. Neeman, "*In vivo imaging of the systemic recruitment of fibroblasts to the angiogenic rim of ovarian carcinoma tumors*," Cancer Res 67(19), 9180-9189 (2007)
35. D. Lyden, K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, K. A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra and S. Rafii, "*Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*," Nat Med 7(11), 1194-1201 (2001)
36. H. F. Dvorak, J. A. Nagy, J. T. Dvorak and A. M. Dvorak, "*Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules*," Am J Pathol 133(1), 95-109 (1988)
37. R. K. Jain, "*Transport of molecules across tumor vasculature*," Cancer Metastasis Rev 6(4), 559-593 (1987)
38. G. M. Tozer, S. M. Ameer-Beg, J. Baker, P. R. Barber, S. A. Hill, R. J. Hodgkiss, R. Locke, V. E. Prise, I. Wilson and B. Vojnovic, "*Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy*," Adv Drug Deliv Rev 57(1), 135-152 (2005)

39. M. J. Levene, D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, R. P. Molloy and W. W. Webb, "*In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue*," J Neurophysiol 91(4), 1908-1912 (2004)
40. V. P. Torchilin, "*Multifunctional nanocarriers*," Adv Drug Deliv Rev 58(14), 1532-1555 (2006)
41. M. Ferrari, "*Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*," Nat Rev Cancer 5(3), 161-171 (2005)
42. S. M. Moghimi and J. Szebeni, "*Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*," Prog Lipid Res 42(6), 463-478 (2003)
43. O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie and R. Langer, "*Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*," Proc Natl Acad Sci U S A 103(16), 6315-6320 (2006)
44. A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayashi, "*Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*," J Biosci Bioeng 100(1), 1-11 (2005)
45. A. Vargas, B. Pegaz, E. Debeve, Y. Konan-Kouakou, N. Lange, J. P. Ballini, H. van den Bergh, R. Gurny and F. Delie, "*Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos*," Int J Pharm 286(1-2), 131-145 (2004)
46. H. Pinto-Alphandary, A. Andremont and P. Couvreur, "*Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*," Int J Antimicrob Agents 13(3), 155-168 (2000)
47. N. Nasongkla, X. Shuai, H. Ai, B. D. Weinberg, J. Pink, D. A. Boothman and J. Gao, "*cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery*," Angew Chem Int Ed Engl 43(46), 6323-6327 (2004)
48. H. L. Wong, R. Bendayan, A. M. Rauth, Y. Li and X. Y. Wu, "*Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles*," Adv Drug Deliv Rev 59(6), 491-504 (2007)
49. S. Q. Liu, Y. W. Tong and Y. Y. Yang, "*Thermally sensitive micelles self-assembled from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) for controlled delivery of paclitaxel*," Mol Biosyst 1(2), 158-165 (2005)
50. E. V. Batrakova and A. V. Kabanov, "*Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*," J Control Release 130(2), 98-106 (2008)
51. U. Boas and P. M. Heegaard, "*Dendrimers in drug research*," Chem Soc Rev 33(1), 43-63 (2004)

52. Y. Liu, M. K. Shipton, J. Ryan, E. D. Kaufman, S. Franzen and D. L. Feldheim, "Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers," *Anal Chem* 79(6), 2221-2229 (2007)
53. A. Burns, H. Ow and U. Wiesner, "Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology," *Chem Soc Rev* 35(11), 1028-1042 (2006)
54. M. Y. Kozlov, N. S. Melik-Nubarov, E. V. Batrakova and A. V. Kabanov, "Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes," *Macromolecules* 33(3305-3313 (2000)
55. M. A. James-Smith, D. Shekhawat, B. M. Moudgil and D. O. Shah, "Determination of drug and fatty acid binding capacity to pluronic f127 in microemulsions," *Langmuir* 23(4), 1640-1644 (2007)
56. P. Najechalski, Y. Morel, O. Stéphan and P. L. Baldeck, "Two-photon absorption spectrum of poly(fluorene)," *Chem Phys Lett* 343(1-2), 44-48 (2001)
57. S. J. K. Pond, M. Rumi, M. D. Levin, T. C. Parker, M. W. Day, J.-L. Brédas, S. R. Marder and J. W. Perry, "One- and Two-Photon Spectroscopy of Donor-Acceptor-Donor Distyrylbenzene Derivatives: Effect of Cyano Substitution and Distortion from Planarity," *2002 106(47)*, 11470-11480 (2002)
58. M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, F. Yuan and A. Chilkoti, "Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers," *J Natl Cancer Inst* 98(5), 335-344 (2006)
59. J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen," *Photochem Photobiol* 53(4), 549-553 (1991)
60. A. Gigout, M. D. Buschmann and M. Jolicœur, "The fate of Pluronic F-68 in chondrocytes and CHO cells," *Biotechnol Bioeng* 100(5), 975-987 (2008)
61. E. Ruoslahti and E. Engvall, "Integrins and vascular extracellular matrix assembly," *J Clin Invest* 99(6), 1149-1152 (1997)