



HAL
open science

Fonctionnalisation de nanoparticules à base de gadolinium à visée thérapeutique

Jessica Morlieras

► **To cite this version:**

Jessica Morlieras. Fonctionnalisation de nanoparticules à base de gadolinium à visée thérapeutique. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10058 . tel-01082785

HAL Id: tel-01082785

<https://theses.hal.science/tel-01082785>

Submitted on 14 Nov 2014

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.

Année 2013

THESE

Pour obtenir de grade de

Docteur de l'Université de Lyon – Université Claude Bernard Lyon 1

Spécialité : Chimie

Institut Lumière Matière, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

Présentée et soutenue publiquement le 17 avril 2013

Par Jessica MORLIERAS

**FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES A BASE DE
GADOLINIUM A VISEE THERAPEUTIQUE**

Rapporteurs :

Muriel BARBERI-HEYOB, Chargée de Recherche (HdR), Université de Nancy

Fabrice GOUBARD, Professeur, Université de Cergy-Pontoise

Examineurs :

Olivier TILLEMENT, Professeur, Université Lyon 1

Directeur de thèse

François LUX, Maître de Conférences, Université Lyon 1

Directeur de thèse

Jean-Michel CHEZAL, Professeur, Université d'Auvergne

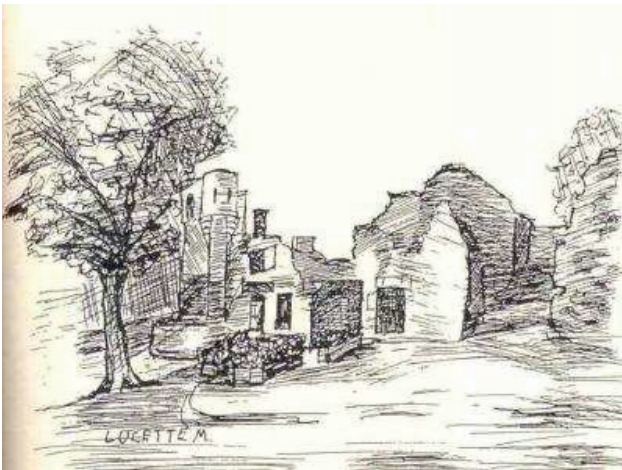
Laurent DAVID, Professeur, Université Lyon 1

Céline FROCHOT, Directrice de Recherche, ENSIC Nancy

A la plus tendre des grands-mères,

LA GLANE A ORADOUR

*A mes chers disparus
en ce jour du 10 juin 1944
à Oradour-sur-Glane*



*Illustration représentant une des granges
d'Oradour-sur-Glane où des hommes
furent assassinés et l'Arbre de la Liberté
à côté du lieu de supplice.*

C'est ma rivière enchantresse.
Mon village l'a pour Déesse.
Le Bourg Martyr et le Nouveau
Sont réunis par son cours d'eau.

Sous les saules à l'ombre creuse
Sa cascade est toujours joyeuse.
Lorsque mon cœur a du chagrin
Elle me chante son refrain.

Je vais cueillir près de sa rive
Une fleur quand le soir arrive,
Chaque année à la Fête-Dieu,
Et le dix Juin, jour de l'Adieu...

Lucette MORLIERAS, née GOURCEAU
Ecrivain, poète, auteur, compositeur
25/12/1921 – 29/11/2012

Remerciements

La réalisation de cette thèse a été pour moi l'occasion de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais les citer toutes sans dépasser le nombre de pages raisonnablement admis pour ce genre de travail. Chacune d'entre elles a, de près ou de loin, apporté une contribution positive à sa finalisation. Ma reconnaissance est, sur ce point, énorme à leur égard.

Je pense à Marie-France Joubert, Directrice de l'Institut Lumière Matière (ILM), pour m'avoir accueillie au laboratoire. Je tiens également à remercier Olivier Tillement, Directeur de l'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux), qui a dirigé ce travail de thèse : merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe, d'avoir mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires, d'avoir initié de nombreuses collaborations fructueuses et de m'avoir fait profiter de son inépuisable créativité scientifique ! Une pensée particulière pour François Lux, qui a co-encadré cette thèse et que je remercie vivement pour son suivi, son oreille attentive et ses précieux conseils qui ont permis d'améliorer les différentes versions de ce travail. Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Stéphane Roux, ancien membre de l'équipe FENNEC et désormais Professeur à l'Université de Franche-Comté, pour m'avoir recrutée et permis d'intégrer l'équipe, ainsi qu'à Pascal Perriat, Professeur à l'INSA de Lyon, qui fait presque partie de l'équipe, pour les nombreux échanges scientifiques que nous avons pu avoir lors de la caractérisation des nanoparticules.

Un grand merci à Muriel Barberi-Heyob, Chargée de Recherche à l'Université de Nancy et à Fabrice Goubard, Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Jean-Michel Chezal, Professeur à l'Université d'Auvergne, Laurent David, Professeur à l'Université de Lyon et Céline Frochot, Directrice de Recherche à l'ENSIC de Nancy d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe FENNEC, anciens et actuels, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse et grâce à qui une atmosphère joyeuse règne au sein des laboratoires. Je pense à ma bichette (et à Teddy) qui se reconnaîtra(/ont), à mon NicoKro et ses trois princesses, à Chrichri, Céline et leur petite Coralie, à Brice, Elodie et leur petit ange, et à Céline, Christophe et leurs deux bavards, que je ne remercierai jamais assez pour leur bonne humeur, leur soutien dans les galères et nos grands moments de folie ! Merci également à Lucie, Thomas, Fabien et Charles pour tous nos fous-rires et pour avoir rendu plus qu'agréables ces 2 années passées ensemble ! Merci aussi à Anna, Antho, Alex, Matteo, Marie, Laurence, Mario, Christian et Dalila avec qui j'ai travaillé dans un environnement particulièrement chaleureux !!!

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations fructueuses ; par conséquent, je souhaite remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai été amenée à travailler.

Commençons par les plus proches : merci à la « partie bio » de l'équipe FENNEC de l'ILM, et plus particulièrement à Marc Janier et sa « girl team » : Jakeline, Pauline, Aurélie et Imen : merci pour tous les bons moments passés en votre compagnie, les longues heures au milieu des souris et des rats, votre disponibilité et vos explications souvent utiles à une néophyte de la biologie comme moi !

Merci également à l'équipe Spectrométrie des Biomolécules et Agrégats de l'ILM, et plus particulièrement Rodolphe Antoine, Claire et Charles (oui toi Charles Truillet) pour les expériences de Spectrométrie de Masse qui ont permis de mieux caractériser nos nanoparticules.

Une pensée spéciale pour Laurence Heinrich-Balard, Amandine Roux et Richard Cohen de la Faculté de Pharmacie de Lyon pour les études de ciblage de la mélanine réalisées sur le BIAcore® et leur gentillesse.

Un grand merci à Sandrine Dufort et Jean-Luc Coll de l'Institut Albert Bonniot de Grenoble pour le travail colossal fourni sur le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Une pensée particulière pour l'équipe de Clermont-Ferrand : je souhaite profondément remercier Jean-Michel Chezal que j'ai encore du mal à tutoyer malgré les relances, ainsi qu'Elisabeth Miot-Noirault et Aurélien Vidal pour leurs nombreux efforts sur la synthèse des vecteurs de mélanine et de protéoglycanes, le radiomarquage des nanoparticules et les études de ciblage avec les nanoparticules vectorisées, mais aussi pour leur accueil chaleureux dans leurs locaux et leur disponibilité.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de découvrir l'enseignement et je tiens à remercier les personnes aux côtés desquelles j'ai beaucoup appris, notamment Patrick, Vincent et Claire de l'INSA de Lyon, et Catherine.

Je remercie également les personnes qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche et qui m'ont énormément appris : je pense à Jalila Simaan et Marius Régliez du laboratoire Biosciences à Marseille, ainsi qu'à Juan Manuel Herrera Martínez et Enrique Colacio Rodríguez du laboratoire de Chimie de Coordination et d'Analyse Structurale de Grenade (Espagne) : merci pour votre encadrement, votre accompagnement tout au long de mes études, et surtout, merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes piliers, ceux qui m'ont encouragée et soutenue, ceux qui se sont toujours inquiétés du bon déroulement de mes études et ceux grâce à qui je me trouve sur la dernière ligne droite aujourd'hui : mes amies, ma famille et mon homme.

Un grand merci à mon petit groupe de bichettes : Elise, Flora, Sabine, Irène, Marie, Adeline, Sophie et Cindy ! Merci d'être toujours là !!!!

Une tendre pensée à ma famille et plus particulièrement à mon Papa et mes petites sœurs (Sista et Mini-moi) pour leurs encouragements perpétuels !!! Une énorme pensée à mon grand-père, qui ne pourra pas se déplacer, pour son éternel enthousiasme. Une douce pensée pour mon neveu qui devrait voir le jour fin mars : bienvenue dans la famille ! Enfin, une pensée émue pour ma grand-mère que je garde toujours près de moi, dans mon cœur.

Last but not least : la plus tendre des pensées est pour toi, qui a été à mes côtés dans les meilleurs moments comme dans les plus difficiles. I owe you everything !

Résumé

Les SRPs (Small Rigid Platforms) sont des nanoparticules de taille inférieure à 5 nm, constituées d'une matrice de polysiloxane, à la surface de laquelle sont greffés de manière covalente des complexes de gadolinium. Les SRPs ont été développées pour des applications en imagerie multimodale, notamment en imagerie par résonance magnétique, en scintigraphie et en imagerie par fluorescence, ainsi que pour des applications en théranostic, et plus particulièrement, en radiosensibilisation.

L'objectif de la thèse consiste à fonctionnaliser les SRPs par des entités de ciblage, capables d'identifier et de se lier à des récepteurs surexprimés par les tumeurs ou par l'endothélium qui leur est associé. Plus précisément, trois molécules ciblantes ont été retenues : (i) le c(RGDfK) – un pentapeptide cyclique contenant le motif Arg-Gly-Asp ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de cellule endothéliale pour les protéines de la matrice extracellulaire et surexprimée par de nombreuses cellules cancéreuses, (ii) une molécule dérivée de la quinoxaline – ciblant la mélanine, sur-exprimée par de nombreux types de mélanomes (cancers de la peau), et (iii) un pyridinium – ciblant les protéoglycanes, sur-exprimés par le chondrosarcome (cancer du cartilage).

Les différentes molécules ciblantes ont alors été greffées en surface des SRPs afin d'optimiser leur accumulation et leur rétention au sein des tumeurs, et par conséquent, d'augmenter le potentiel de ces SRPs en tant qu'agents théranostiques. Le couplage covalent des différents vecteurs aux SRPs et leur quantification ont été mis en évidence par diverses techniques de caractérisation physicochimiques et complémentaires. Enfin, le ciblage des nanoparticules vectorisées a été démontré par plusieurs tests *in vitro* et/ou *in vivo* lors de nombreuses collaborations pour les trois différents vecteurs.

Abstract

SRPs (Small Rigid Platforms) are sub-5 nanometre nanoparticles, composed of a polysiloxane network surrounded by gadolinium chelates. SRPs have previously demonstrated their efficiency for multimodal imaging and theranostic applications, especially magnetic resonance imaging, scintigraphy, fluorescence imaging, and radiosensitization.

The purpose of this thesis deals with the functionalization of these SRPs by targeting entities able to recognize and to bind to receptors that are over-expressed by tumours or by the matching endothelium. More specifically, three targeting molecules drew our attention: (i) c(RGDfK) – a cyclic pentapeptide containing the Arg-Gly-Asp motif, able to target the $\alpha_v\beta_3$ integrin, an endothelial cell receptor for the proteins of the extracellular matrix and frequently expressed by tumour cells, (ii) a quinoxaline derivative – targeting melanin, which is over-expressed by melanomas (skin cancers) and (iii) a pyridinium moiety – targeting proteoglycans, which are over-expressed in chondrosarcoma (cartilage cancer).

The different targeting molecules were then grafted to the SRPs in order to maximize their accumulation and retention in tumours with the aim to enhance the SRP efficiency as theranostic agents. The covalent coupling of the different targeting molecules to the SRPs and their quantification were performed by various physicochemical characterization techniques. Finally, the targeting of the functionalized SRPs was highlighted by several *in vitro* and/or *in vivo* assays thanks to numerous successful collaborations.

Table des matières

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	33
I. CHAPITRE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	39
I.1. CANCER – GENERALITES ET ENJEUX	43
I.1.1. DE LA CELLULE SAINTE AU CANCER...	43
I.1.2. LE CANCER EN QUELQUES CHIFFRES	45
I.2. DIAGNOSTIC DU CANCER	46
I.2.1. LES DIFFERENTES MODALITES D'IMAGERIE MEDICALE	47
I.2.2. LES LIMITES DE L'IMAGERIE MEDICALE	51
I.2.3. VERS UNE IMAGERIE MULTIMODALE	52
I.3. TRAITEMENT DU CANCER PAR RADIOTHERAPIE	54
I.3.1. GENERALITES	54
I.3.2. PRINCIPE	55
I.3.3. DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS IONISANTS	56
I.3.4. AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE	58
I.3.5. VERS LA RADIOSENSIBILISATION	59
I.3.6. VERS DES AGENTS THERANOSTIQUES	60
I.4. OPTIMISATION PHYSICOCHIMIQUE DES AGENTS D'IMAGERIE, DE THERAPIE OU THERANOSTIQUES ET CIBLAGE DES TUMEURS	61
I.4.1. OPTIMISATION PHYSICOCHIMIQUE DES NANOSTRUCTURES UTILISEES COMME AGENTS D'IMAGERIE, DE THERAPIE OU THERANOSTIQUES EN VUE D'UN CIBLAGE PASSIF	63
I.4.2. CIBLAGE ACTIF	68
I.4.3. VERS UNE NANOPARTICULE IDEALE	73

<u>I.5. CONCEPTION DE NANOPARTICULES HYBRIDES MULTIFONCTIONNELLES CIBLANTES A BASE DE GADOLINIUM, COMBINANT IMAGERIE ET THERAPIE</u>	74
I.5.1. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE	75
I.5.2. FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE	77
I.5.3. VECTORISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM, PLATEFORMES MULTIFONCTIONNELLES POUR L'IMAGERIE MEDICALE ET LA THERAPIE	82
<u>II. CHAPITRE 2 - ETUDES DE PREVECTORISATION : OPTIMISATION DES REACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE ET EVALUATION DE L'ACCESSIBILITE DES SITES DE GREFFAGE</u>	91
<u>II.1. REACTION DE COUPLAGE PEPTIDIQUE</u>	96
II.1.1. GENERALITES	97
II.1.2. AGENTS DE COUPLAGE	97
II.1.3. CONDITIONS DE LA REACTION DE COUPLAGE PEPTIDIQUE	98
II.1.4. REACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE DE PETITES MOLECULES AUX SRPs – STRATEGIES DE SYNTHÈSE	99
<u>II.2. ESTIMATION DU NOMBRE DE LIGANDS DOTA VACANTS PAR NANOPARTICULE</u>	107
II.2.1. PRINCIPE GENERAL	107
II.2.2. PARTIE EXPERIMENTALE	111
<u>II.3. ETUDE DE L'ACCESSIBILITE DES FONCTIONS AMINES PRIMAIRES DU RESEAU DE POLYSILOXANE</u>	113
II.3.1. CHOIX DU FLUOROPHORE POUR FONCTIONNALISER LES SRPs VIA LES FONCTIONS AMINES PRIMAIRES DU RESEAU DE POLYSILOXANE	113
II.3.2. GREFFAGE DE LA CY5.5 AUX NANOPARTICULES ET CARACTERISATIONS	119
<u>II.4. CONCLUSION</u>	125

III. CHAPITRE III - FONCTIONNALISATION DES SRPs AVEC UN PEPTIDE CYCLIQUE CONTENANT LE MOTIF RGD POUR LE CIBLAGE DE L'INTEGRINE A_vB₃	129
III.1. INTRODUCTION	133
III.1.1. L'ANGIOGENESE	133
III.1.2. L'INTEGRINE A _v B ₃	134
III.1.3. DIFFERENTES APPLICATIONS DES PEPTIDES CONTENANT LE MOTIF RGD	135
III.1.4. OPTIMISATION DE LA STRUCTURE, DE LA CONFORMATION SPATIALE ET DE LA COMPOSITION DU PEPTIDE CONTENANT LE MOTIF RGD	135
III.1.5. PRESENTATION MULTIMERIQUE DU PEPTIDE POUR UNE AFFINITE POUR L'INTEGRINE A _v B ₃ ACCRUE	139
III.2. ARTICLE	139
III.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	173
III.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DU C(RGDfK) AUX SRPs	173
III.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DU C(RGDfK) AUX SRPs	178
III.4. CONCLUSION	186
IV. CHAPITRE IV - FONCTIONNALISATION DES SRPs AVEC DES MOLECULES DERIVEES DE LA QUINOXALINE POUR LE CIBLAGE DE LA MELANINE	189
IV.1. INTRODUCTION	193
IV.1.1. LE MELANOME	193
IV.1.2. LA MELANINE, UNE CIBLE DE CHOIX POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU MELANOME – STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES	193
IV.1.3. PRESENTATION DES MOLECULES CIBLANT LA MELANINE	197
IV.1.4. MOLECULES FINALES SELECTIONNEES POUR LE COUPLAGE AUX SRPs EN VUE D'UN CIBLAGE ACTIF DE LA MELANINE	197
IV.1.5. VALIDATION IN VITRO DE L'AFFINITE DES SRPs FONCTIONNALISEES PAR LES MOLECULES CIBLANTES DERIVEES DE LA QUINOXALINE POUR LA MELANINE	199

IV.2. ARTICLE	204
IV.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	218
IV.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DES MOLECULES CIBLANTES 1, 2 ET 3, DERIVEES DE LA QUINOXALINE, AUX SRPs	218
IV.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DES MOLECULES CIBLANTES 1, 2 ET 3, DERIVEES DE LA QUINOXALINE, AUX SRPs	222
IV.4. CONCLUSION	226
V. CHAPITRE V - FONCTIONNALISATION DES SRPs AVEC UN AMINOPROPYLPYRIDINIUM POUR LE CIBLAGE DES PROTEOGLYCANES	229
V.1. INTRODUCTION	232
V.1.1. CARTILAGE : STRUCTURE ET COMPOSITION	232
V.1.2. EXPLOITATION DE L’AFFINITE AMMONIUMS QUATERNAIRES / PROTEOGLYCANES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU CHONDROSARCOME	234
V.2. ARTICLE	235
V.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	239
V.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DU 1-(3-AMINOPROPYL)PYRIDINIUM AUX SRPs	239
V.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DU 1-(3-AMINOPROPYL)PYRIDINIUM AUX SRPs	243
V.3.3. ETUDES IN VIVO MENEES DANS LE CADRE DU PROJET LANTHARAD (RESULTATS CONFIDENTIELS)	246
V.4. CONCLUSION	252
CONCLUSION	257
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	263

Liste des abréviations

Liste des abréviations**A**

Acm : Anticorps monoclonal (*anglais* : *mAb*)
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AI : Agent d'Imagerie
Al₂O₃ : Alumine (= Oxyde d'aluminium)
Ala : Alanine
Apt : Aptamère
APTES : 3-Aminopropyltriéthoxysilane
AQ : Amine Quaternaire
ARC : Association pour la Recherche sur le Cancer
Arg : Arginine
ARN : Acide Ribonucléique
Asp : Acide Aspartique
ATR : Attenuated Total Reflectance

B

B.M. : Bohr Magneton
Boc : *tert*-Butyloxycarbonyle
BSA : Bovine Serum Albumin
BZA : Benzamide

C

c(RADfK) : Pentapeptide Arg-Ala-Asp-D-Phe-Lys cyclique
c(RGDfK) : Pentapeptide Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys cyclique
CCD : Charge-coupled device (*français* : dispositif à couplage de charge)
CCl₄ : Tétrachlorométhane
CDB : Cassure Double Brin (*anglais* : DSB : Double Strand Break)
CDCl₃ : Chloroforme Deutééré
CD₃OD : Méthanol Deutééré
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CH₃CN : Acétonitrile
CH₃OH : Méthanol
CID : Collision Induced Dissociation (*français* : dissociation induite par collision)
CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer (*anglais* : *IARC*)
cp : Centipoise
cPept. : Peptide cyclique

cpm/g : Coups Par Minute par Gramme (d'organe)
CT : Computed Tomography (*français* : *TDM*)
Cy : Cyanine

D

Da : Dalton
dAb : domaine Antibody (*anglais* : *sdAb* ou *nanobody*)
DEG : Diéthylène Glycol
DELs : Diodes ElectroLuminescentes
(*français* : Radiothérapie par microfaisceaux X)
DH : Diamètre Hydrodynamique (*anglais* : *HD*)
DHI : 5,6-Dihydroxyindole
DHICA : Acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique
DL₅₀ : Dose Létale médiane
DMF : Diméthylformamide
DMEM : Dulbecco Modified Eagle's minimal essential Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DMSO-d₆ : Diméthylsulfoxyde Deutééré
DOTA : Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique
DOTA-GA : Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique – anhydride glutarique
DTPA : Acide diéthylènetriamine pentaacétique
DTPA-BA : Acide diéthylènetriamine pentaacétique – bis-anhydride

E

Eau régale : Mélange d'acide chlorhydrique avec de l'acide nitrique (v/v : 2/1)
EDC : Chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor (*français* : Récepteur de Facteur de Croissance Epidermique)
EPR : Enhanced Permeability and Retention
ESI : Electrospray Ionization
ESI : Electronic Supplementary Material
ESIONs : Extremely Small-Sized Iron Oxide Nanoparticles
EtOH : Ethanol

F

Fab : Fragment Antigen Binding
FBS : Foetal Bovine Serum
FC : Flow Cell (*français* : Canal de référence)
FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy
FDA : Food and Drug Administration
FENNEC : Formation et Elaboration de NaNomatériaux et Cristaux
FGF : Fibroblast Growth Factor
FTIR : Fourier Transformed Infrared Spectroscopy

G

G418 : Geneticin®
GAGs : Glycosaminoglycanes
Gal : Galactose
GalN : Galactosamine
GC : Gros Coeur
GdCl₃.6H₂O : Chlorure de gadolinium hexahydraté
GlcA : Acide glucuronique
GlcN : Glucosamine
Gly : Glycine

H

H₂O : Eau
Hb : Hémoglobine désoxygénée
HbO₂ : Hémoglobine oxygénée
HBS : HEPES buffer (*français* : tampon HEPES)
HBSS : Hanks Balanced Salt Solution
HCl : Acide chlorhydrique
HCOOH : Acide méthanoïque (= acide formique)
HD : Hydrodynamic Diameter (*français* : *DH*)
HEK293(β3) : Modèle cellulaire tumoral exprimant l'intégrine α_vβ₃; lignée de cellules rénales embryonnaires humaines
HEMCSS : Modèle cellulaire tumoral ; lignée de cellules de chondrosarcome humain
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2 (*français* : récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains)
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia-Inductible Factor (*français* : Facteur Induit par l'Hypoxie)
HNO₃ : Acide nitrique
HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I

IARC : International Agency for Research on Cancer (*français* : *CIRC*)
IBZA : N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide
IC₅₀ : Concentration Inhibitrice Médiane
ICF01012 : N-(2-diéthylaminoéthyl)-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide
ICG : IndoCyanine Green (*français* : *VIC*)
ICP-OES : Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy (*français* : Spectrométrie par torche à plasma – Spectrométrie d'émission optique)
IdoA : Acide Iduronique
ILM : Institut Lumière Matière
INCa : Institut National du Cancer
Iqnx : iodoquinoxaline
IR : Infrarouge
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique (*anglais* : *MRI*)
IT : Intratumoral(e)
ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography on Sillica Gel
IV : Intraveineux(/se)

K

KBr : Bromure de potassium
kDa : kiloDalton
keV : kiloélectron-Volt
kV : kiloVolt

L

LTQ : Linear Trap Quadrupole
Lys : Lysine

M

m/Z : Rapport masse / charge
mAb : Monoclonal Antibody (*français* : *Acm*)
MCA : Multiplicative Correlation Algorithm (*français* : Algorithme de Corrélation Multiplicatif)
MeV : MégaElectronVolt
MMPs : Matrix Metalloproteinases (*français* : Métalloprotéinases Matricielles)
mOsm : milliosmole

Mp : Melting point (*français* : température de fusion)
MPIOs : Micron-sized Particles of Iron Oxide
MRI : Magnetic Resonance Imaging (*français* : IRM)
MRT : Microbeam Radiation Therapy (*français* : Radiothérapie par microfaisceaux X)
MS : Mass Spectrometry (*français* : SM)
MS/MS : Tandem Mass Spectrometry (*français* : SM/SM)
MT1-MMP : Membrane Type-1 – Matrix Metalloproteinases (*français* : Métalloprotéinases Matricielles avec membrane de type-1)
MV : MegaVoltage

N

NaCl : Chlorure de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium
NGR : Asn-Gly-Arg
NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium
NHS : N-Hydroxysuccinimide
NMR : Nuclear Magnetic Resonance (*français* : Résonance Magnétique Nucléaire)
NMRD : Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion
NNI : National Nanotechnology Initiative

O

OD : Optical Density
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (*anglais* : WHO)

P

PBS : Phosphate Buffered Saline (*français* : tampon phosphate salin)
PC : Petit Coeur
PCS : Photon Correlation Spectroscopy
PEG : Polyéthylène Glycol
PET : Positron Emission Tomography (*français* : TEP)
PGs : Protéoglycanes
Phe : Phenylalanine
PLA : Poly(lactic acid)
PLGA : Poly(lactic-co-glycolic acid)
PMT : Photomultiplier Tube (*français* : photomultiplicateur)

Q

QA : Quaternary Ammonium (*français* : ammonium quaternaire)
QDs : Quantum Dots

R

RAD : Arg-Ala-Asp
RADfK : Arg-Ala-Asp-D-Phe-Lys
RAFT : Regioselectively Addressable Functionalized Template
RGD : Arg-Gly-Asp
RGDfK : Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys
RLU : Relative Light Units
ROIs : Regions Of Interest (*français* : régions d'intérêt)
RT : Radiothérapie
RT : Room Temperature (*français* : température ambiante)
RTX : Radiothérapie externe (*anglais* : XRT)
RU : Resonance Units (*français* : unités de résonance)
RX : Rayons X (*anglais* : X-rays)

S

scFv : Single Chain Variable Fragment
SCID : Severe Combined Immunodeficiency (*français* : Immunodéficience Combinée Sévère)
sdAb : single domain antibody = nanobody (*français* : dAb)
SI : Supporting Information
SiO₂ : Dioxyde de silicium
SM : Spectrométrie de Masse (*anglais* : MS)
SM/SM : Spectrométrie de Masse en tandem (*anglais* : MS/MS)
SPECT : Single-Photon Emission Computed Tomography (*français* : TEMP)
SPIO : SuperParamagnetic Iron Oxide
SRC : Swarm Rat Chondrosarcoma : Modèle cellulaire tumoral surexprimant les PGs ; lignée de cellules de chondrosarcome murin
SRE : Système Réticulo-Endothélial
SRPs : Small Rigid Platforms

T

TACO (= TDM) : Tomographie axiale calculée par ordinateur (*anglais* : CT)

TDM (= TACO) : Tomodensitométrie (*anglais* : CT)

TEL : Transfert d'Energie Linéaire (*anglais* : LET)

TEOS : Tetraéthoxysilane

TEP : Tomographie par Emission de Positons (*anglais* : PET)

TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique (*anglais* : SPECT)

TFA : Acide trifluoroacétique

TLC : Thin Layer Chromatography (*français* : Chromatographie sur Couche Mince)

TS/A-pc : Modèle cellulaire tumoral exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; lignée de cellules de carcinome mammaire murin

U

U-87 MG : Modèle cellulaire tumoral exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; lignée de cellules de glioblastome humain

uPAR : Urokinase Receptor

US : Ultrasons

USPIO : Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide

UV : Ultraviolet

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule – 1 (*français* : Molécule d'Adhésion des Cellules Vasculaires – 1)

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (*français* : Facteur de Croissance Endothélial Vasculaire)

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (*français* : Récepteur du Facteur de Croissance Endothélial Vasculaire)

VIC : Vert d'IndoCyanine (*anglais* : ICG)

W

WHO : World Health Organization (*français* : OMS)

WTY : Trp-Thr-Tyr

Introduction générale

Introduction générale

La lutte contre le cancer est un problème majeur de santé publique : c'est la première cause de mortalité dans les pays en voie de développement et la deuxième après les maladies cardiovasculaires dans les pays développés (Jemal *et al.*, 2011 ; GLOBOCAN, 2008). Près de 12,7 millions de cas de cancer et 7,6 millions de décès dus au cancer ont été recensés dans le monde en 2008, soit 13 % de la mortalité mondiale. En 2030, le nombre de décès dus au cancer pourrait avoisiner les 13,1 millions (OMS). En France, un homme sur deux et une femme sur trois se verra diagnostiqué un cancer avant 85 ans. Le cancer est la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme : 33 % des décès masculins et 24 % des décès féminins ont été provoqués par le cancer en 2004-2008 en France (Ligue contre le cancer).

Le cancer est une maladie particulièrement complexe, due à une instabilité génétique et à la succession de modifications moléculaires multiples. Les procédés biologiques se faisant à l'échelle nanométrique, il semble essentiel de travailler à cette même échelle pour combattre les cellules cancéreuses. Selon la « National Nanotechnology Initiative » américaine, l'univers des nanotechnologies concerne la compréhension et le contrôle de la matière à des dimensions comprises entre 1 et 100 nm approximativement, où des phénomènes uniques permettent des applications nouvelles, non réalisables avec de simples molécules à l'état brut ou des matériaux de base (NNI). Les avancées dans le domaine des nanotechnologies permettent de manipuler la matière à l'échelle moléculaire pour créer des particules avec de nouvelles propriétés chimiques, physiques et biologiques. Il est alors raisonnable d'imaginer que des tests capables de passer au crible des millions de molécules dans une goutte de sang seront mis en place dans un futur proche, afin de détecter une protéine révélatrice de la présence d'un type de cancer. Il est également possible d'envisager la conception de particules transporteuses de médicaments relargant leur contenu toxique uniquement après qu'elles ont pénétré la tumeur, ou encore, la commercialisation d'agents capables de contrôler l'efficacité du traitement administré au patient atteint d'un cancer. La nanomédecine s'inscrit dans une démarche thérapeutique novatrice car elle offre l'opportunité d'une médecine personnalisée. Encapsulés dans des véhicules de taille nanométrique, les agents d'imagerie et/ou de thérapie seraient capables de cibler uniquement les cellules cancéreuses. Ces nanotechnologies intelligentes à pouvoir ultra-ciblé ouvrent une nouvelle ère de la lutte contre le cancer. L'industrie pharmaceutique s'intéresse de plus en plus à ces véhicules de taille nanométrique car ils sont moins toxiques et plus spécifiques des tumeurs que les agents thérapeutiques conventionnels.

L'utilisation de nanotechnologies est désormais répandue dans le domaine des applications en oncologie et ne cesse de susciter de l'intérêt dans le milieu de la recherche, notamment en termes d'imagerie et de thérapie. Les nanoparticules dédiées à des applications en oncologie sont sources d'espoirs et de perspectives prometteuses pour un diagnostic précoce et précis du cancer ainsi que pour un traitement efficace tout en limitant les effets indésirables.

Les propriétés inhérentes aux nanoparticules leur confèrent d'indéniables avantages sur les agents moléculaires et reposent sur un concept majeur : leur rapport surface sur volume étant élevé, la proportion d'atomes de surface par unité de volume est augmentée, générant une surface

spécifique optimale (très grande réactivité des atomes de surface). Les nanoparticules sont des « véhicules » auxquels il est possible d'incorporer des agents d'imagerie et/ou de thérapie (Doane *et al.*, 2012 ; Mahmood *et al.*, 2012). Ces nano-objets sont composés de quelques centaines ou milliers d'atomes et, par conséquent, apportent sur leur site d'action un plus grand nombre d'éléments actifs (imagerie, thérapie, ciblage) par objet que la plupart des espèces moléculaires. De plus, de par leur taille, les nanoparticules circulent dans le sang plus longtemps que les agents d'imagerie ou de thérapie conventionnels car elles évitent l'élimination par voie rénale et s'affranchissent des problèmes de diffusion systémique observés pour les agents moléculaires ; elles sont néanmoins suffisamment petites pour pénétrer la vascularisation tumorale. Leur capacité à atteindre sélectivement leur cible permet aux médecins de travailler avec des doses plus faibles donc moins toxiques. Le ciblage des tumeurs permet de diminuer le taux de « piégeage » des agents d'imagerie ou de thérapie dans les tissus sains et d'augmenter leurs taux d'accumulation et de rétention dans les tumeurs. Ce phénomène améliore l'efficacité de ces agents et, dans le cas des agents thérapeutiques, réduit les effets indésirables sur le patient (Blanco *et al.*, 2011 ; Cabral *et al.*, 2011). La fonctionnalisation des nanoparticules avec des entités de ciblage capables d'identifier et de se lier à des récepteurs surexprimés par les tumeurs ou par l'endothélium qui leur est associé permet de maximiser la localisation et la rétention des nanoparticules dans les tumeurs (Blanco *et al.*, 2011).

Bien que les nanoparticules ciblantes aient mis du temps à entrer en phase clinique, leur potentiel en tant que nouvelle génération d'agents d'imagerie et/ou de thérapie reste immense. L'injection par intraveineuse de tels agents doit composer avec les obstacles suivants : les interactions avec les composants du sang, la captation par le système réticuloendothélial, l'élimination rénale, la toxicité et l'aptitude à cibler les cellules d'intérêt (Guo *et al.*, 2012). En effet, les propriétés physicochimiques des nanoparticules comme la taille, la géométrie, la forme, la chimie et la charge de surface, l'hydrophobie, la rigidité et la composition interne sont autant de paramètres qui ont une influence directe sur leur accumulation dans les organes, les tissus ou les cellules et sont donc à optimiser pour la conception de nanoparticules efficaces (Kamaly *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011).

Les recherches dans le domaine des nanomédecines ciblantes sont nombreuses et ces efforts doivent être perpétués dans l'idée de les transposer du laboratoire au lit du patient (Kamaly *et al.*, 2012). L'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux) de l'ILM (Institut Lumière Matière) est spécialisée depuis plusieurs années dans la conception de nanoparticules hybrides à base de gadolinium à visée thérapeutique.

Les propriétés physicochimiques des SRPs (Small Rigid Particles) synthétisées par l'équipe FENNEC, et plus particulièrement leur taille (< 5 nm), répondent aux exigences pré-requises des agents théranostiques, à savoir : (i) une longue circulation dans le sang pour une accumulation optimale au sein de la tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) et (ii) une évacuation par voie rénale pour un meilleur contraste (différence de concentration) entre tissus sains et tissus tumoraux (Lux *et al.*, 2011).

Les SRPs sont des plateformes multifonctionnelles, prometteuses pour des applications en imagerie médicale et en thérapie : elles s'inscrivent dans une optique dite « théranostique ». En effet, les SRPs ont récemment démontré leur capacité à être détectées par 3 techniques d'imagerie

médicale différentes, à savoir, l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), la TEMP (Tomographie d'Emission MonoPhotonique) et l'imagerie optique et s'avèrent prometteuses pour des applications en radiothérapie (Lux *et al.*, 2011 ; Le Duc *et al.*, 2011 ; Mowat *et al.*, 2011). Pour résumer, elles associent différentes modalités d'imagerie de manière à aboutir à un diagnostic plus précoce et plus précis, elles sont susceptibles de rendre le traitement par radiothérapie plus efficace et elles permettraient de suivre l'évolution du traitement par ces mêmes modalités d'imagerie.

L'optimisation de ces nanoparticules en tant qu'agents théranostiques passe par leur vectorisation dans le but d'obtenir un ciblage actif. En effet, pour que l'efficacité de l'agent théranostique soit maximale, la quantité de SRPs dans la tumeur et le rapport en élément théranostique entre les tissus tumoraux et les tissus sains doivent être maximums (Le Duc *et al.*, 2011). La fonctionnalisation des SRPs par des entités de ciblage permettrait de maximiser leur accumulation et leur rétention au sein des tumeurs.

L'objectif de ces travaux de thèse a consisté à améliorer le ciblage des SRPs pour une meilleure efficacité de ces nanoparticules en tant qu'agents d'imagerie multimodale et agents de thérapie.

Dans une première partie, nous développerons (i) les généralités et enjeux du cancer, (ii) les atouts et faiblesses des différentes modalités d'imagerie, (iii) le principe général du traitement par radiothérapie et ses perspectives, (iv) les diverses possibilités d'optimisation des propriétés physicochimiques des agents d'imagerie et/ou de thérapie, puis (v) la conception des nanoparticules hybrides à base de gadolinium combinant imagerie et thérapie.

La seconde partie sera ensuite consacrée à une étude de pré-vectorisation des nanoparticules, c'est-à-dire à la description des stratégies de greffage mises en place pour coupler les entités ciblantes de manière covalente aux SRPs, puis à l'estimation du nombre de sites de greffage disponibles et accessibles en surface des SRPs.

Les trois chapitres suivants présenteront le greffage covalent de trois molécules ciblantes différentes aux SRPs, la caractérisation de ce greffage et les résultats de ciblage obtenus pour les nanoparticules vectorisées. Le troisième chapitre sera consacré à la vectorisation des SRPs par un pentapeptide cyclique ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ – récepteur de cellule endothéliale pour les protéines de la matrice extracellulaire, le quatrième à la vectorisation par une molécule ciblant la mélanine – surexprimée par le mélanome (cancer de la peau), et le dernier à la vectorisation par une molécule ciblant les protéoglycanes – surexprimés par le chondrosarcome (cancer du cartilage). Les SRPs vectorisées par chacune des entités de ciblage font l'objet d'articles publiés ou en cours de publication. Les troisième, quatrième et cinquième chapitres seront alors présentés sous forme d'articles.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Etude bibliographique

INTRODUCTION GENERALE	33
I.1. CANCER – GENERALITES ET ENJEUX	43
I.1.1. DE LA CELLULE SAINTE AU CANCER...	43
I.1.2. LE CANCER EN QUELQUES CHIFFRES	45
I.2. DIAGNOSTIC DU CANCER	46
I.2.1. LES DIFFERENTES MODALITES D'IMAGERIE MEDICALE	47
I.2.2. LES LIMITES DE L'IMAGERIE MEDICALE	51
I.2.3. VERS UNE IMAGERIE MULTIMODALE	52
I.2.3.1. LES PLATFORMES MULTIMODALES	52
I.2.3.2. LES SONDAS MULTIMODALES	53
I.2.3.3. PERSPECTIVES DE L'IMAGERIE MEDICALE	54
I.3. TRAITEMENT DU CANCER PAR RADIOTHERAPIE	54
I.3.1. GENERALITES	54
I.3.2. PRINCIPE	55
I.3.3. DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS IONISANTS	56
I.3.3.1. RAYONNEMENTS DE PHOTONS	56
I.3.3.2. RAYONNEMENTS PARTICULAIRES	57
I.3.4. AMELIORATION DE LA RADIOTHERAPIE	58
I.3.5. VERS LA RADIOSENSIBILISATION	59
I.3.6. VERS DES AGENTS THERANOSTIQUES	60
I.4. OPTIMISATION PHYSICOCHIMIQUE DES AGENTS D'IMAGERIE, DE THERAPIE OU THERANOSTIQUES ET CIBLAGE DES TUMEURS	61
I.4.1. OPTIMISATION PHYSICOCHIMIQUE DES NANOSTRUCTURES UTILISEES COMME AGENTS D'IMAGERIE, DE THERAPIE OU THERANOSTIQUES EN VUE D'UN CIBLAGE PASSIF	63
I.4.1.1. DIAMETRE HYDRODYNAMIQUE	64
I.4.1.2. FORME	67

I.4.1.3. CHARGE DE SURFACE	67
I.4.1.3. HYDROPHOBIE, RUGOSITE ET RIGIDITE	68
I.4.2. CIBLAGE ACTIF	68
I.4.2.1. LES DIFFERENTS TYPES DE VECTEURS	70
I.4.2.2. DEUX STRATEGIES DE CIBLAGE ACTIF : LE CIBLAGE DES CELLULES CANCEREUSES OU LE CIBLAGE DES CELLULES ENDOTHELIALES	72
I.4.3. VERS UNE NANOPARTICULE IDEALE	73

I.5. CONCEPTION DE NANOPARTICULES HYBRIDES MULTIFONCTIONNELLES CIBLANTES A BASE DE GADOLINIUM, COMBINANT IMAGERIE ET THERAPIE **74**

I.5.1. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE	75
I.5.1.1. SYNTHÈSE DU CŒUR A BASE D'OXYDES DE GADOLINIUM	75
I.5.1.2. ENROBAGE DU CŒUR OXYDE PAR UNE COUCHE DE POLYSILOXANE	75
I.5.2. FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE	77
I.5.2.1. FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE PAR UN POLYMERE HYDROPHILE NON CHARGE : LE PEG	77
I.5.2.2. FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM A STRUCTURE CŒUR-COQUILLE PAR DES MOLECULES HYDROPHILES, COURAMMENT UTILISEES EN IRM, EN TEMP, ET/OU EN TEP : LE DTPA ET LE DOTA	78
I.5.3. VECTORISATION DES NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM, PLATEFORMES MULTIFONCTIONNELLES POUR L'IMAGERIE MEDICALE ET LA THERAPIE	82
I.5.3.1. NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM POUR L'IMAGERIE MEDICALE, PLATEFORMES MULTIMODALES	82
I.5.3.2. NANOPARTICULES HYBRIDES A BASE DE GADOLINIUM POUR UN EFFET RADIOSENSIBILISANT EN RADIOTHERAPIE	85
I.5.3.3. VECTORISATION DES SRPs EN VUE DE L'OBTENTION D'UN CIBLAGE ACTIF ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	86

I.1. Cancer – Généralités et enjeux

Le mot « cancer » provient du latin *cancer*, signifiant crabe, apparenté au grec ancien *karkinos* désignant une écrevisse. Ce nom aurait été donné par Hippocrate, considéré comme le « Père de la médecine », qui visualisait la tumeur et ses vaisseaux environnants comme un crabe, demeurant enfoncé dans le sable avec ses pattes. Nous en savons désormais bien plus sur le cancer que les anciens Grecs, mais le cancer reste une maladie des plus redoutées car c'est l'une des premières causes de mortalité dans le monde (Jemal *et al.*, 2011).

Dans la lutte contre le cancer, les nanotechnologies (taille comprise entre 1 et 100 nm selon la NNI) présentent de nouvelles approches de diagnostic et de traitement, non réalisables avec les technologies conventionnelles (NNI). Ces nouveaux outils, conçus à des tailles bien inférieures à celles des cellules humaines, sont susceptibles de rendre les chercheurs et les cliniciens capables de détecter le cancer à des stades plus précoces, de le traiter avec plus de précision et moins d'effets secondaires, et éventuellement d'arrêter le développement de la maladie avant qu'elle ne puisse causer des dommages (NCI).

I.1.1. De la cellule saine au cancer...

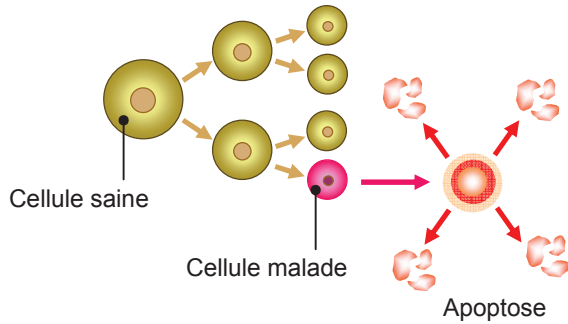
Selon Robert Hooke, la cellule est l'unité de base de la vie (Hooke, 1665). Le corps est constitué de plus de 60 000 milliards de cellules ; en règle générale, lorsque le corps en a besoin, les cellules se dédoublent de façon contrôlée et ordonnée pour produire de nouvelles cellules et remplacer celles qui sont en fin de vie ou défaillantes. Les tissus conservent au fil du temps leur forme et leurs fonctions respectives. Toute cellule est programmée pour se multiplier puis pour mourir : il existe un équilibre fragile entre le nombre de nouvelles cellules créées et le nombre de cellules qui disparaissent. Cette programmation est régie par le noyau de la cellule et ce sont les gènes, à travers l'ADN contenu dans les chromosomes, qui commandent le noyau de la cellule (NCI ; Sanofi-Aventis).

Cependant, il arrive parfois que les gènes subissent une altération (mutation) suite à une agression ou un dommage causé par un agent environnemental (cancérogènes chimiques, rayonnements, virus, etc.) ou par un facteur héréditaire (Jackson *et al.*, 2009). Le noyau transmet alors des ordres anormaux, pouvant conduire à la production de protéines modifiées, plus nombreuses ou plus rares, capables ou non d'activer les mêmes voies. Parfois, la cellule ne perçoit aucune modification : le changement reste silencieux ; parfois, la cellule se dérègle : elle se multiplie de façon désordonnée et non contrôlée (Figure I.1). Les cellules transformées transmettent alors l'ensemble de leurs informations aux cellules issues des différentes divisions cellulaires. L'équilibre naturel entre la prolifération des cellules et leur mort est rompu, ce qui peut être dû soit à une croissance cellulaire anarchique, soit à la perte de la capacité de la cellule à s'autodétruire (Aly, 2012 ; Spencer *et al.*, 2011). Ce déséquilibre entraîne la formation d'une masse de tissu cellulaire supplémentaire, appelée tumeur (Ligue contre le Cancer ; Sanofi-Aventis).

Selon leur capacité ou leur incapacité à se propager par invasion ou métastase, les tumeurs peuvent être malignes (cancéreuses) ou bénignes (non cancéreuses). A l'inverse des tumeurs

bénignes, incapables de se développer par invasion ou par métastase et qui grandissent localement, les tumeurs malignes peuvent envahir les tissus voisins, pénétrer les vaisseaux sanguins et métastaser à différents endroits. Par définition, le terme cancer s'applique uniquement aux tumeurs malignes (NCI).

Division cellulaire de cellules saines



Division cellulaire de cellules cancéreuses

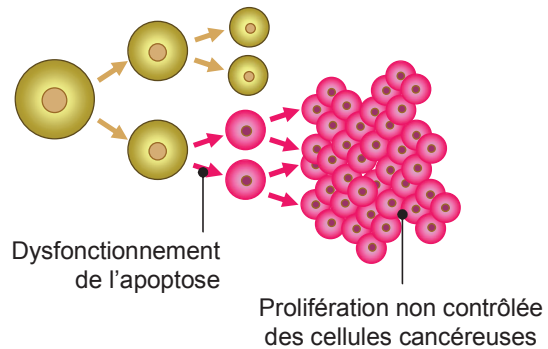


Figure I.1. Croissance des cellules cancéreuses. Adaptée de University of Virginia

Les tumeurs malignes sont dites monoclonales : elles proviennent d'une simple et unique cellule. Si le cancer naît d'une seule cellule, la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse ne peut s'expliquer par une transition unique et abrupte. La transformation maligne est un processus multi-étapes, provoqué par l'accumulation consécutive d'altération des gènes (Figure I.2).

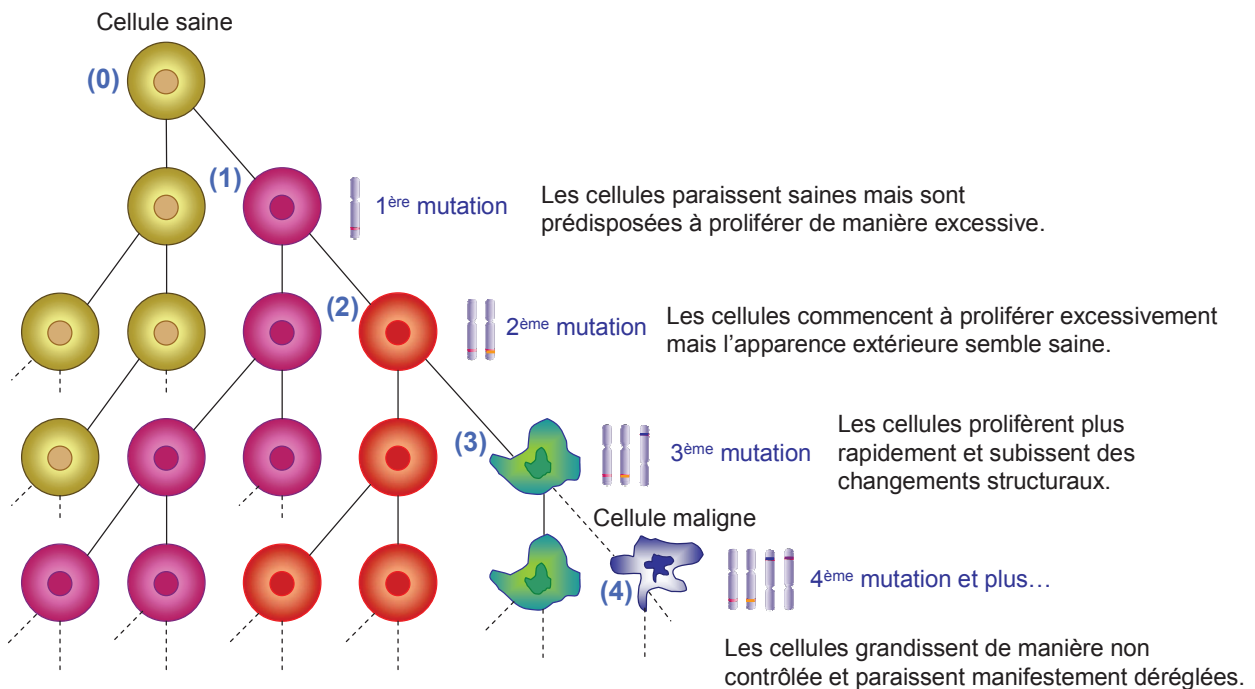


Figure I.2. Emergence d'une cellule cancéreuse à partir de mutations d'une cellule saine. Adaptée de Kennesaw State University

Comme l'illustre la Figure I.2, la cellule fille (1) acquiert – ou hérite de – la mutation à l'origine du cancer ; ce défaut est transmis aux générations suivantes. La cellule descendante (2) acquiert la

seconde mutation puis la cellule descendante suivante (3) acquiert la troisième mutation et ainsi de suite. Lorsque la cellule accumule assez de mutations (4), la cellule devient maligne et provoque le cancer. Des cellules peuvent être considérées comme cancéreuses lorsque la cellule saine a subi au moins deux mutations (Kennesaw State University). Cependant, l'émergence d'une population de cellules malignes résulte de l'effet cumulatif de 5 à 10 modifications génétiques. En règle générale, il existe six altérations principales pouvant être impliquées dans la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse. Ces altérations comprennent : l'autonomie en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'échappement à l'apoptose, un potentiel de reproduction illimitée, une angiogénèse soutenue et l'invasion des tissus (atteinte et destruction des tissus adjacents) ainsi que la métastase (propagation dans d'autres zones de l'organisme via la lymphe ou le sang) (Aly, 2012).

Ce processus peut être court, mais il est souvent lent : 10 à 30 ans peuvent s'écouler entre la genèse de la première cellule anormale et l'apparition d'une tumeur d'environ 1 cm³ (Sanofi-Aventis). Aussi, on utilise le terme « tumeur » à partir d'un regroupement de 100 000 cellules (Ligue contre le cancer). Si la tumeur est le résultat d'un processus évolutif mettant en jeu des générations successives de cellules, tendant progressivement vers une prolifération cancéreuse, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués restent au cœur des débats (Visvader, 2011). De par la nature multi-étapes de l'oncogenèse et les mutations successives des gènes, chaque tumeur présente une hétérogénéité marquée en termes de morphologie cellulaire, d'indice de prolifération, de lésions génétiques et de réponse thérapeutique (Visvader, 2011 ; Nguyen *et al.*, 2012 ; Longo, 2012 ; Gerlinger *et al.*, 2012 ; Abeylath *et al.*, 2011).

1.1.2. Le cancer en quelques chiffres

Le cancer est la première cause de mortalité dans les pays en voie de développement et la deuxième après les maladies cardio-vasculaires dans les pays développés (Jemal *et al.*, 2011). Près de 12,7 millions de cas de cancer et 7,6 millions de décès dus au cancer ont été recensés dans le monde en 2008, soit 13 % de la mortalité mondiale (Debergh *et al.*, 2012). D'ici à 2030, le nombre de décès dus au cancer pourrait avoisiner les 13,1 millions (OMS). Les cancers engendrant le plus de décès sont les cancers du poumon, du foie, de l'estomac, du côlon, du sein et du col de l'utérus ; ils diffèrent selon le sexe (Tableau I.1).

Cancers les plus fréquents	
Homme	Femme
Poumons et bronches (~17%)	Sein (~23%)
Prostate (~14%)	Colorectal (~9%)
Colorectal (~10%)	Col de l'utérus (~9%)
Estomac (~10%)	Poumons et bronches (~9%)

Cancers ayant causé le plus de décès	
Homme	Femme
Poumons et bronches (~23%)	Sein (~14%)
Foie (~11%)	Poumons et bronches (~13%)
Estomac (~11%)	Colorectal (~9%)
Colorectal (~8%)	Col de l'utérus (~8%)

Tableau I.1. Estimation de fréquence et mortalité des cas de cancers dans le monde en 2008. (GLOBOCAN 2008 ; Jemal *et al.*, 2011)

L'augmentation du nombre de cas de cancers est la conséquence de l'accumulation de plusieurs facteurs : l'accroissement de la population, l'allongement de la durée de vie, l'augmentation de la fréquence des cancers avec l'âge, mais aussi l'hérédité, l'environnement et le mode de vie. Les principaux facteurs de risques comportementaux et alimentaires sont le tabagisme, la surconsommation d'alcool, un indice de masse corporelle élevé, l'inactivité physique et la faible consommation de fruits et légumes (OMS).

Si le cancer est aujourd'hui une des premières causes de mortalité dans le monde, il existe depuis de nombreuses années, les premières traces écrites datant des Egyptiens. C'est seulement au cours des dernières décennies que les origines moléculaires de cette maladie ont été découvertes. Or, c'est grâce à une meilleure compréhension des caractéristiques moléculaires et des voies de signalisation sous-jacentes au cancer que nous sommes désormais capables de générer des outils « intelligents ». Les nanotechnologies sont susceptibles de changer radicalement notre façon de diagnostiquer, d'imager et de traiter le cancer. Le développement de nanosystèmes comprenant une ou plusieurs fonctions cliniques peut réduire considérablement l'impact du cancer (Jemal *et al.*, 2011 ; OMS) ; les différentes fonctions regroupées au sein de ces outils de taille nanométrique comprennent : (i) la détection du cancer aux stades les plus précoces, (i) sa localisation plus précise au sein de l'organisme, (ii) la distribution spécifique de médicaments anticancéreux aux cellules malignes, et (iv) la vérification de l'action de ces médicaments sur les cellules cancéreuses (NCI).

I.2. Diagnostic du cancer

Pendant de nombreuses années, la chirurgie et la biopsie, c'est-à-dire le retrait d'une partie du tissu pour une évaluation microscopique, étaient les seuls moyens de détecter les tumeurs et d'observer leur croissance (Weissleder, 2002). Au cours des dernières décennies, les avancées considérables en imagerie médicale ont nettement amélioré la qualité du diagnostic (Goutayer, 2008). La médecine moderne a régulièrement recours à des technologies d'imagerie de pointe pour confirmer la présence du cancer mais aussi pour localiser le site primaire (site d'origine du cancer) et les sites secondaires (métastases) s'ils existent.

L'imagerie médicale joue un rôle clé dans la lutte contre le cancer car elle permet entre-autres de (Pericleous *et al.*, 2012 ; Frangioni, 2008 ; Hillman, 2006 ; NEMA, 2006 ; Weissleder, 2002) :

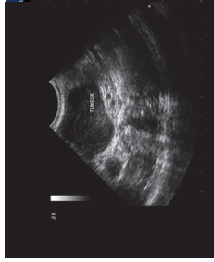
- détecter, diagnostiquer et évaluer le stade d'avancement du cancer,
- aider au choix du traitement du cancer,
- observer l'efficacité ou l'inefficacité du traitement,
- surveiller les cas de récurrence du cancer,
- faciliter la recherche médicale, et plus particulièrement celle qui s'intéresse à la découverte de traitements et aux innovations thérapeutiques améliorant les soins délivrés aux patients.

1.2.1. Les différentes modalités d'imagerie médicale

Six modalités d'imagerie médicale sont mises à disposition des cliniciens pour le diagnostic, l'évaluation de l'avancement et le traitement du cancer : les rayons X (radiographie standard et tomodensitométrie (TDM)), les ultrasons (US, et plus particulièrement : l'échographie), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP), la tomographie par émission de positons (TEP) et l'imagerie optique (Figure I.3) (Frangioni, 2008). Chacune de ces techniques se différencie par ses caractéristiques physiques, sa résolution, sa sensibilité et le type de tissu qu'elle image, ainsi que par le type d'agents d'imagerie auquel elle a recours (Tableau I.2) (Alric, 2012 ; Debergh *et al.*, 2012 ; Hahn *et al.*, 2011 ; Baker, 2010 ; Weissleder *et al.*, 2008).

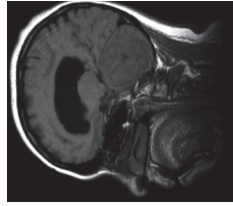
Les systèmes d'imagerie peuvent être regroupés selon l'énergie qu'ils utilisent pour acquérir des informations visuelles (RX, positons, photons, ultrasons), selon la résolution spatiale qu'ils atteignent (macroscopique à microscopique), ou encore selon le type d'information obtenue (anatomique, physiologique, cellulaire ou moléculaire). Les modalités d'imagerie macroscopique (TDM, IRM, US) fournissant des informations anatomiques et physiologiques sont actuellement largement répandues dans les domaines cliniques et précliniques. Les systèmes permettant d'acquérir des informations moléculaires sont apparus plus tard dans le domaine clinique : ces modalités incluent la TEMP et la TEP ; d'autres, comme l'imagerie optique sont encore en développement (usage clinique améliorable) (Weissleder *et al.*, 2008).

Des ondes acoustiques à hautes fréquences (généralement > 10 MHz) sont utilisées pour générer des images basées sur des échographies.



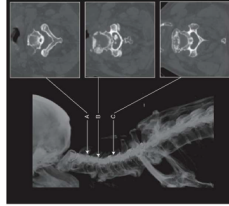
US

L'IRM est une méthode d'imagerie qui utilise des ondes radio en présence d'un champ magnétique pour extraire des informations sur les atomes d'hydrogène contenus dans l'organisme. Elle fournit des images anatomiques mais renseigne également sur l'état physicochimique des tissus, le débit, la diffusion et les mouvements.



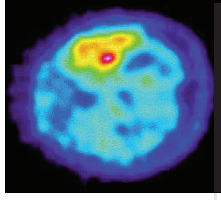
IRM

Les RX générés passent à travers divers types de tissus et sont déviés ou absorbés à différents degrés. La TDM utilise les RX pour obtenir des images 3D par rotation de la source de RX autour du patient et mesure l'intensité de RX transmis aux différents angles.

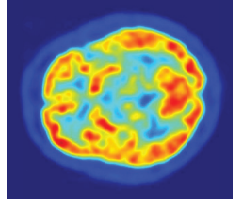


RX (TDM)

TEMP



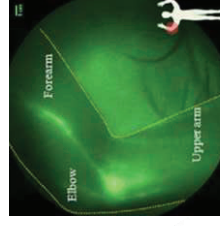
Un ensemble de détecteurs de photons effectuent une rotation autour du patient pour acquérir des données à plusieurs angles selon la localisation de radionucléides émetteurs γ . (décomposition des isotopes par émission de photons γ d'énergie comprise entre 30 et 300 keV).



La TEP détecte des radionucléides lors de leur décomposition par émission de positon β^+ . Le positon émis s'annihile avec un électron libre, et deux photons γ , de 511 keV chacun sont éjectés sur une même direction, dans un sens opposé (180°).

TEP

Imagerie optique



L'approche consiste à détecter un fluorophore émettant dans le proche-IR, injecté par voie intraveineuse. Jusqu'à présent, l'imagerie par fluorescence est très peu utilisée pour le diagnostic. Elle est plus adaptée pour imager les cancers de surface ou les cancers exposés chirurgicalement (imagerie per-opératoire).

Figure 1.3. Les différentes modalités d'imagerie. (Weissleder, 2002)

Technique	Signal mesuré	Type de rayonnement	Résolution spatiale	Profondeur maximale	Sensibilité (mol/L d'Al)	Temps d'acquisition	AI : Agents d'imagerie à base de...	Coût	Usage clinique
TDM	RX	ionisant	1-2 mm (clinique) 50 µm (préclinique)	pas de limite	10^{-3}	min	molécules iodées	€€	oui
<i>Avantages : Technique rapide, fournissant des images de coupes transversales</i> <i>Inconvénients : Faible résolution des tissus mous</i>									
IRM	relaxivité des ^1H	non-ionisant	1 mm (clinique) 50 µm (préclinique)	pas de limite	$10^{-5}-10^{-6}$	min - h	complexes paramagnétiques, particules ferromagnétiques	€€€	oui
<i>Avantages : Technique n'utilisant pas de rayonnement ionisant, et fournissant des images de haute résolution des tissus mous</i> <i>Inconvénients : Faible sensibilité</i>									
US	ondes ultrasonores	non-ionisant	50 µm (préclinique)	mm-cm	10^{-5}	s - min	microbulles de gaz	€€	oui
<i>Avantages : Technique rapide et inoffensive (pas de rayonnement ionisant)</i> <i>Inconvénients : Faible contraste / Technique peu adaptée pour les organes contenant de l'air</i>									
TEMP	photons γ (30 à 300 keV)	ionisant	10 mm (clinique) 1-2 mm (préclinique)	pas de limite	$10^{-10}-10^{-11}$	min - h	molécules radiomarquées ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{201}Tl)	€€€	oui
<i>Avantages : Technique sensible et pouvant fonctionner avec différents radionucléides à la fois (distinction possible entre les divers radionucléides)</i> <i>Inconvénients : Faible résolution / Nécessite un agent radioactif</i>									
TEP	paires de photons γ (511 keV, 180°)	ionisant	5 mm (clinique) 1-2 mm (préclinique)	pas de limite	$10^{-11}-10^{-12}$	min - h	molécules radiomarquées (^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{64}Cu)	€€€€	oui
<i>Avantages : Technique très sensible</i> <i>Inconvénients : Faible résolution / Nécessite un agent radioactif / Détection d'un seul radionucléide à la fois</i>									
Imagerie optique	lumière fluorescente proche-IR	non-ionisant	<5 mm (clinique) 1-2 mm (préclinique)	< 10 cm	$10^{-9}-10^{-12}$	s - min	fluorophores émettant dans le proche-IR	€-€€	en développement
<i>Avantages : Technique simple à utiliser, inoffensive, et permettant d'observer des événements moléculaires spécifiques</i> <i>Inconvénients : Faible profondeur de pénétration</i>									

Tableau I.2. Caractéristiques des différentes modalités d'imagerie : atouts (encadrés en vert) et limites (encadrés en rouge). Les coûts sont basés sur le prix des systèmes d'imagerie des Etats-Unis : € < 100 000 \$US, €€ : 100 000-300 000 \$US, €€€ : 300 000 \$US selon la revue de Weissleder (Debergh et al., 2012 ; Baker, 2010 ; Liu et al., 2010 ; Weissleder et al., 2008 ; Hahn et al., 2011 ; Cheon et al., 2008)

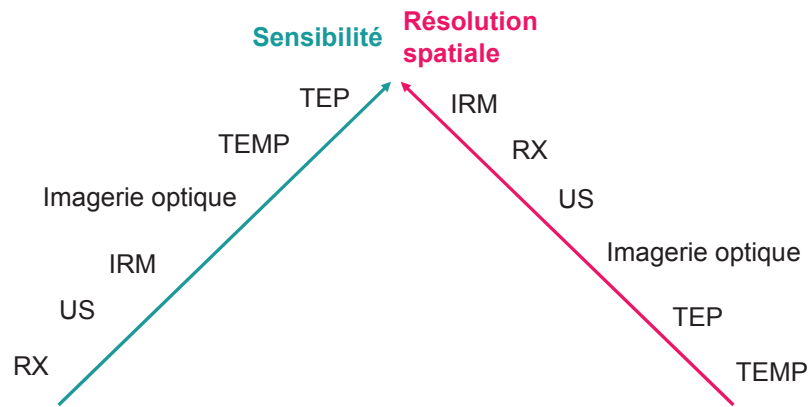


Figure I.4. Echelles relatives de sensibilité et de résolution spatiale des différentes modalités d'imagerie.

Les technologies d'imagerie doivent répondre à certains critères : elles doivent être quantitatives (de manière absolue ou relative), hautement résolues, détaillées, normalisées, numériques, sensibles aux perturbations moléculaires au sein du système et permettre un suivi dynamique (visualisation de l'image en temps réel) (Weissleder *et al.*, 2008). Or, les modalités d'imagerie médicale ne peuvent pas être sensibles et hautement résolues à la fois (Figure I.4) (Louie, 2010 ; Liu *et al.*, 2010 ; Jennings *et al.*, 2009).

1.2.2. Les limites de l'imagerie médicale

Bien qu'ils ne se ressemblent pas, tous les cancers ont un point commun : ils se développent à partir d'une seule cellule anormale. Le corps humain contient environ 10^{14} cellules. Pour discerner la genèse d'une tumeur, le seuil de détection d'un appareil d'imagerie médicale devrait donc être fixé à 10^{-14} . Or, de nos jours, une tumeur est détectée à partir de 10^9 cellules (~ 1 g, ~ 1 cm³). Ainsi, du point de vue de l'imagerie, le terme rémission signifie littéralement qu'il existe entre 0 et 10^9 cellules malignes dans le corps du patient. Par conséquent, les modalités d'imagerie actuelles et leurs agents d'imagerie ont encore beaucoup de progrès à réaliser dans le domaine de l'oncologie (Frangioni, 2008).

Le développement d'agents d'imagerie spécifiques de tumeurs est une tâche particulièrement difficile car il doit prendre en compte trois critères :

- l'affinité entre l'agent d'imagerie et la tumeur, et le rapport de cette constante d'affinité sur la concentration de sites ciblés ;
- la biodistribution et l'élimination : toutes deux dépendent directement de la nature, du diamètre hydrodynamique, du rapport charge/masse et de l'hydrophobie de l'agent d'imagerie. Le diamètre hydrodynamique (DH) et le rapport charge/masse influent particulièrement sur la vitesse à laquelle l'agent d'imagerie se répand de l'espace vasculaire à la tumeur et sur la rapidité du bruit de fond à être éliminé (Choi *et al.*, 2007).
- le rapport signal/bruit (critère le plus important) : les techniques d'imagerie médicale reposent toutes sur ce simple concept. L'objectif, dans le cas d'un cancer, est

d'augmenter autant que possible le signal généré par les agents d'imagerie (agents de contraste ou radiotraceurs) au niveau des cellules cancéreuses par rapport au bruit, causé par un signal non-spécifique ou par les cellules saines environnantes.

L'optimisation d'un agent d'imagerie dans ces trois dimensions est une tâche incontestablement compliquée (Frangioni, 2008). De plus, la création d'un rapport signal sur bruit adéquat pour la détection de cellules tumorales est gênée par certaines barrières. Premièrement, les modalités d'imagerie médicale sont limitées en termes de sensibilité ou de résolution (Tableau I.2) et empêchent la détection de petits clusters de cellules anormales. De plus, les artéfacts dus aux mouvements physiologiques deviennent problématiques pour les tumeurs de petite taille. Ensuite, le corps présente de nombreux obstacles au ciblage effectif des agents d'imagerie (ou thérapeutiques) vectorisés, notamment les inhibiteurs présents dans le plasma, la petite taille des pores endothéliaux (DH ~ 5 nm) qui contraint la biodistribution de ces agents, et les membranes basales qui agissent comme des barrières pour la détection de cancers pré-invasifs. Enfin, nombre de tumeurs solides possèdent une pression hydrostatique élevée, ce qui empêche l'infiltration homogène des agents d'imagerie (ou thérapeutiques) (Frangioni, 2008).

1.2.3. Vers une imagerie multimodale

Les modalités d'imagerie présentent chacune des atouts uniques et des limites (Tableau I.2) (Cheon *et al.*, 2008). L'association de plusieurs modalités à des agents d'imagerie adéquats conduit à une orthogonalité du diagnostic (Louie, 2010 ; Jennings *et al.*, 2009). Le regroupement informatique des données – *a priori* indépendantes – fournies par les différentes techniques d'imagerie est susceptible d'améliorer considérablement la sensibilité et la résolution de l'image (Park *et al.*, 2009 ; Fass, 2008). Dans cette optique, des plateformes combinant plusieurs de ces technologies – notamment la TEMP-TDM, la TEP-TDM, la TEP-IRM – et des sondes multimodales adaptées à ces technologies bimodales se développent et améliorent la reconstruction et la visualisation des données (Weissleder *et al.*, 2008).

1.2.3.1. Les plateformes multimodales

- TEP / IRM :

Parmi les plateformes bimodales, la TEP-IRM est susceptible de fournir les informations les plus complètes, combinant l'importante sensibilité de la TEP avec l'excellente résolution anatomique et le contraste des tissus mous apportés par l'IRM (Figure I.4) (Jennings *et al.*, 2009). Les données peuvent être acquises simultanément, plutôt que séquentiellement, ce qui fait l'avantage de cette plateforme TEP/IRM (Debergh *et al.*, 2012).

- TEMP ou TEP / imagerie optique :

Au stade préclinique, la tendance est à la combinaison de l'imagerie optique avec l'imagerie nucléaire (Debergh *et al.*, 2012 ; Jennings *et al.*, 2009). L'imagerie optique est la modalité la plus

couramment utilisée en imagerie moléculaire préclinique car c'est la moins coûteuse. Cependant, l'obtention d'informations anatomiques étant limitée par la profondeur des tissus, il est intéressant de la coupler à d'autres modalités d'imagerie médicale.

Les trois techniques (TEMP, TEP et imagerie optique), hautement sensibles, sont assez similaires. En effet, elles sont basées sur la détection de photons émis par une source injectée au patient (cas de la TEMP et de l'imagerie optique) ou produits suite à la réaction d'annihilation du positon émis par la source injectée au patient avec un électron du milieu (cas de la TEP) par des capteurs positionnés autour du patient. En revanche, l'énergie des photons γ obtenus à partir des radionucléides aussi bien en TEMP (30-300 keV) qu'en TEP (511 keV) diffère de celle des photons émis par les fluorophores (1,3 à 2 eV) (Azhdarinia *et al.*, 2012). D'autre part, pour ces trois modalités, le signal mesuré est directement proportionnel au procédé biologique observé. L'objectif de cette combinaison imagerie optique / imagerie nucléaire est de développer une machine comprenant un seul et unique détecteur capable de détecter à la fois les photons émis par la source fluorescente et les photons γ émis par la source radioactive (Culver *et al.*, 2008 ; Cherry, 2006). Un autre scénario où cette approche bimodale pourrait être particulièrement utile serait la localisation de la tumeur par un scan TEP du corps entier, puis la localisation plus précise de la position par imagerie optique lors de l'opération chirurgicale pour la résection de la tumeur (Zhang *et al.*, 2011).

Les progrès en imagerie ont permis de passer d'une simple investigation morphologique à l'analyse détaillée de la physiologie d'une tumeur (Debergh *et al.*, 2012). Actuellement, les systèmes d'imagerie moléculaire permettent de localiser la tumeur au sein de l'organisme. A terme, on peut espérer que certains de ces systèmes puissent également contribuer à la visualisation de l'expression et de l'activité de molécules spécifiques, de cellules et de procédés biologiques dont dépend le comportement d'une tumeur et/ou sa réponse aux médicaments thérapeutiques (Weissleder *et al.*, 2008). La normalisation et la validation clinique de nouvelles modalités d'imagerie devrait être une priorité de la thérapie oncologique clinique (Debergh *et al.*, 2012).

1.2.3.2. Les sondes multimodales

Bien que le développement de sondes multimodales ne soit pas systématiquement nécessaire, ces dernières offrent d'indéniables avantages : une seule sonde permet d'assurer le même signal pharmacocinétique et de co-localisation pour deux modalités différentes. De plus, le patient est affranchi d'un stress supplémentaire dû à une injection supplémentaire, pouvant provoquer l'élimination de l'agent de la circulation sanguine (Louie, 2010).

La sensibilité des modalités d'imagerie pouvant varier jusqu'à 3 ordres de grandeur, l'objectif majeur de ces sondes multimodales consiste à équiper la sonde de différents agents d'imagerie dans les quantités nécessaires. Les recherches dédiées aux sondes multimodales se sont alors multipliées : la complexité des synthèses varie de la simple encapsulation à la conjugaison d'agents commerciaux et les tailles obtenues vont de la petite molécule aux systèmes nanométriques. Les supports de ces sondes multimodales peuvent être des liposomes, des lipoprotéines, des nanoparticules (à base d'oxydes de fer, de quantum dots, de lanthanides, d'or, de cœurs magnétiques, de silice, de polymères, etc. (Park *et al.*, 2009)), des macromolécules, des petites

molécules organiques, etc. Idéalement, l'association de plusieurs agents d'imagerie ne devrait pas affecter leur efficacité respective ; c'est donc sur ce point que le support des sondes multimodales tient un rôle majeur (Louie, 2010).

I.2.3.3. Perspectives de l'imagerie médicale

L'imagerie médicale est un des piliers de la lutte contre le cancer et l'obtention d'informations complémentaires *via* des systèmes d'imagerie multimodale permettrait d'améliorer chacune des phases du traitement de la maladie. Idéalement, les techniques d'imagerie multimodale et les sondes multimodales appropriées combinées devraient fonctionner en synergie pour atteindre une résolution et une sensibilité élevées de l'activité biologique (Louie, 2010). Ceci permettrait de détecter le cancer à un stade plus avancé et par conséquent, de réduire le taux de mortalité lié à certains cancers (Fass, 2008).

I.3. Traitement du cancer par radiothérapie

Il existe trois grandes catégories de traitement du cancer : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Pour certains types de cancers, la maladie peut également être traitée par hormonothérapie, immunothérapie, thérapie ciblée, photothérapie dynamique, etc. Selon les cas, ces différentes modalités peuvent être prescrites seules ou combinées, simultanément ou successivement (e-cancer).

Le présent travail de thèse ayant une perspective d'application en radiothérapie, ce traitement est décrit brièvement au sein de ce chapitre. Le rayonnement est un agent physique utilisé pour détruire les cellules cancéreuses ; il est appelé « rayonnement ionisant » car il forme des ions (espèces chimiques électriquement chargées) et dépose de l'énergie dans les cellules des tissus à travers lesquels il passe. Cette énergie déposée est capable de tuer les cellules cancéreuses ou de causer des changements génétiques aboutissant à la mort des cellules cancéreuses. Les autres formes de rayonnements comme les ondes radio, les microondes et les ondes lumineuses sont dites « non-ionisantes » car elles n'ont pas autant d'énergie et ne sont pas capables de former des ions. La radiothérapie est un traitement fréquemment prescrit : elle concerne plus d'un patient sur deux atteint d'un cancer (Baskar *et al.*, 2012 ; Begg *et al.*, 2011).

I.3.1. Généralités

Il existe trois types de radiothérapie : la radiothérapie externe (RTX), la curiethérapie (ou radiothérapie interne) et la radiothérapie métabolique. En RTX, les rayons sont émis par une source externe à l'organisme. Le faisceau de rayons est dirigé sur la zone tumorale : les rayons traversent la peau et pénètrent l'organisme pour atteindre la tumeur. La RTX est la forme la plus courante des radiothérapies. En curiethérapie, les rayonnements sont émis par une source radioactive implantée directement à l'intérieur du corps du patient. Enfin, pour la radiothérapie métabolique, la substance radioactive est administrée au patient par voie orale ou par injection intraveineuse et celle-ci se fixe préférentiellement sur les cellules cancéreuses pour les détruire (ARC ; INCa, 2009).

Lorsqu'un rayonnement ionisant pénètre le corps humain, une partie du rayonnement est absorbée (partie « utile » du rayonnement), une autre est déviée de son chemin (dépendant de nombreux facteurs) et une autre encore continue son chemin. La dose de rayons absorbée s'exprime en Gray (Gy) et représente la dose d'énergie absorbée par unité de matière – ce qui est donc totalement différent de l'énergie des rayons émis. 1 Gy correspond à une énergie de 1 J absorbée par une masse de 1 kg (INCa, 2009). Actuellement, un régime typique de radiothérapie consiste à adresser au patient des fractions quotidiennes de 1,5 à 3 Gy sur plusieurs semaines (Baskar *et al.*, 2012 ; Connell *et al.*, 2009). A titre indicatif, une dose de 5 Gy administrée en une fois sur l'ensemble du corps d'une personne représente une dose létale pour 50% des sujets (DL₅₀) (INCa, 2009). La diffusion quant à elle, c'est-à-dire la propagation du rayonnement en dehors de son chemin, explique pourquoi les régions situées à proximité de la zone visée par le rayonnement ionisant peuvent recevoir des doses parasites d'irradiation.

1.3.2. Principe

Le principe de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants se matérialisent sous la forme d'un faisceau d'ondes ou de particules suffisamment énergétiques pour ôter les électrons de leur enveloppe électronique : c'est l'ionisation. Les rayons déposent leur énergie dans les cellules des tissus à travers lesquels ils passent. L'énergie déposée peut détruire les cellules cancéreuses ou causer des modifications génétiques provoquant la mort de la cellule (Baskar *et al.*, 2012).

Le rayonnement ionisant agit sur les tissus en trois étapes : la première est physique, la seconde physicochimique et la dernière biologique. L'étape physique est de très courte durée (10^{-13} s). Elle fait référence aux ionisations et aux excitations moléculaires suite au dépôt d'énergie lors du passage du rayon. Cette phase est suivie par une étape physicochimique pouvant durer de quelques secondes à quelques minutes. Les molécules ionisées ou excitées réagissent entre elles et avec les molécules environnantes. Enfin, lors de l'étape biologique, les rayonnements ionisants altèrent la structure des macromolécules, provoquant la perturbation des fonctions principales de la vie cellulaire. Cette phase peut s'étaler sur plusieurs mois (Pharmacology).

Les rayonnements peuvent détruire les cellules cancéreuses selon plusieurs mécanismes, tous ayant pour but de priver ces cellules de leur multiplication et/ou de les tuer (Connell *et al.*, 2009). Comme la plupart des traitements anticancéreux, la radiothérapie parvient à ses fins en provoquant différentes morts cellulaires. Elle ne détruit pas les cellules immédiatement : cela peut prendre des heures, des jours voire des semaines de traitement avant que les cellules cancéreuses ne meurent (Baskar *et al.*, 2012). Bien que l'altération de l'ADN soit généralement considérée comme le principal moyen d'aboutir à la létalité cellulaire radio-induite, de nombreux mécanismes non apparentés à l'ADN peuvent également être impliqués dans les réponses cellulaires aux irradiations ; parmi eux : (i) la production radio-induite de céramide (molécule de la membrane cellulaire) à partir de la sphingomyéline dérivée de la membrane plasmique et (ii) l'activation de voies de signalisation

intracellulaires (signalisation radio-induite de l'EGFR par exemple (Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique)) (Connell *et al.*, 2009).

1.3.3. Différents types de rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants sont répartis en deux catégories : les photons (rayonnements électromagnétiques) et les rayonnements particulaires (chargés ou non). Les différentes formes de rayonnements n'ont pas toutes la même énergie. Les rayonnements de plus haute énergie pénètrent plus profondément dans les tissus. Le radio-oncologue choisit le type et l'énergie de rayonnement les plus adaptés au cancer du patient.

1.3.3.1. Rayonnements de photons (rayons X ou γ)

Les faisceaux de photons de haute énergie (rayonnements électromagnétiques) sont de loin la forme de rayonnement la plus couramment utilisée pour le traitement du cancer. Les photons peuvent être émis soit lors de réarrangements d'électrons issus de tubes de RX ou d'accélérateurs linéaires, soit lors de désintégrations nucléaires, comme celles du ^{60}Co , de ^{192}Ir et du ^{137}Cs (Pharmacology).

Les photons n'ont pas de masse : ils se propagent en ligne droite ; ils n'ont pas de charge et interagissent par conséquent de manière aléatoire avec la matière (Tableau I.3). La probabilité pour un photon de subir un phénomène d'interaction avec un élément atténuateur dépend de l'énergie $h\nu$ du photon et du numéro atomique Z de l'élément atténuateur. En général, l'effet photoélectrique prédomine pour les photons de basse énergie, l'effet Compton aux énergies intermédiaires et la production de paires pour les photons de haute énergie (Figure I.5) (Podgorsak, 2005).

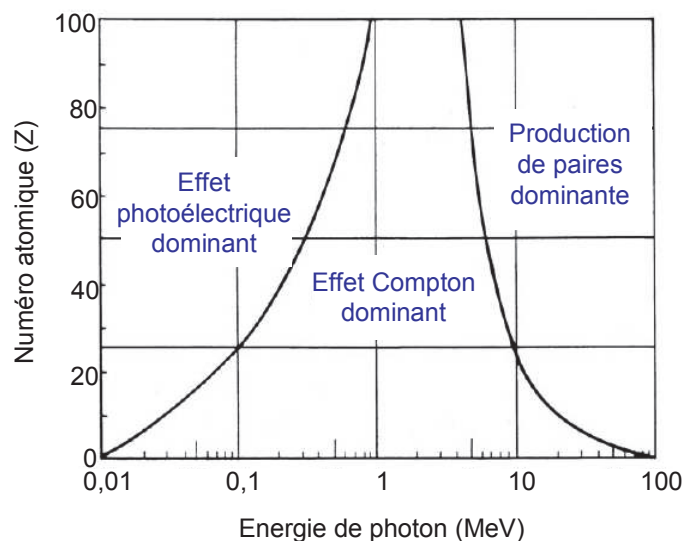


Figure I.5. Régions de prédominance des trois principales formes d'interaction des photons avec la matière. La courbe de gauche représente le domaine où les coefficients atomiques pour l'effet photoélectrique et pour l'effet Compton sont égaux ; la courbe de droite représente le domaine où les coefficients atomiques pour l'effet Compton et pour la production de paires sont égaux. Adaptée de Podgorsak, 2005.

I.3.3.2. Rayonnements particuliers

Les rayonnements particuliers peuvent être chargés comme les électrons, les protons, les ions lourds, ou non chargés comme les neutrons.

Les faisceaux d'électrons sont produits par des accélérateurs linéaires. Les électrons ne pénétrant pas dans les tissus profonds, ils sont particulièrement utiles pour le traitement de tumeurs proches de la surface du corps (Figure I.6 ; Tableau I.3) (Baskar *et al.*, 2012).

Les faisceaux de protons sont une forme de rayonnements particuliers plus récente, offrant une meilleure distribution de dose grâce à leur profil unique d'absorption par les tissus, connu sous le nom de « pic de Bragg » (étroit) (Figure I.6) (Terasawa *et al.*, 2009). Ils causent peu de dommages au niveau des tissus à travers lesquels ils passent et excellent dans la destruction des cellules situées à la fin de leur trajectoire. Les protons permettent de déposer une énergie destructrice maximale au niveau de la tumeur tout en minimisant les dommages au niveau des tissus sains au cours de leur passage. Ils sont donc particulièrement adaptés pour les tumeurs pédiatriques et les tumeurs chez les adultes situées près de structures critiques comme la moelle épinière ou les tumeurs proches du crâne, où les tissus sains doivent nécessairement être épargnés. La protonthérapie nécessite un équipement hautement spécialisé ; elle est systématiquement utilisée pour certains types de cancer mais requiert des recherches supplémentaires pour le traitement d'autres types de cancers.

Les neutrons se propagent linéairement à travers la matière et ont d'ailleurs une efficacité biologique 3 à 4 fois supérieure à celle des photons (Tableau I.3). Cependant, leur utilisation a diminué ces dernières années en partie à cause des problèmes à focaliser les rayons sur la cible visée. Etant donné que les neutrons peuvent causer plus de dommages sur l'ADN que les photons, les effets sur les tissus sains peuvent être plus graves. Les faisceaux doivent alors être positionnés avec précaution et les tissus sains, protégés. Les faisceaux de neutrons peuvent être utiles lorsque d'autres formes de rayonnements ne marchent pas : ils sont essentiellement efficaces sur les tumeurs pour lesquelles l'approvisionnement en oxygène est faible (tumeurs récurrentes).

Les faisceaux d'ions carbone sont aussi appelés faisceaux d'ions lourds car ils utilisent des particules plus lourdes que les protons ou les neutrons. Parce que ces particules sont si lourdes, elles peuvent causer plus de dommages au niveau de la cellule cible que les autres formes de rayonnements. Comme les protons, les ions carbone ont la particularité de déposer une faible dose en surface et la majorité de leur énergie dans les derniers millimètres de leur trajectoire, au sein de la tumeur ; les tissus situés derrière la tumeur reçoivent très peu de rayons. La dose de rayons est donc précisément localisée sur la tumeur et ce phénomène est connu sous le nom de pic de Bragg (Figure I.6) (Pharmacology ; Terasawa *et al.*, 2009). Les ions carbone cumulent donc les avantages : leur absorption par les tissus est comparable à celle des protons et leur efficacité biologique est semblable à celle des neutrons (Tableau I.3). Cependant, leurs effets au niveau des tissus sains environnant la tumeur peuvent être sérieux. Actuellement, ce type de rayonnement n'est disponible que dans très peu de centres dans le monde, notamment en Allemagne, au Japon et en Italie.

Type de rayonnement	Modalité	Charge	Efficacité biologique	Localisation de la dose maximale	Remarques
RX ou rayons γ	Photons γ	0	1,0 (référence)	proche de la surface	interactions aléatoires avec la matière
Electrons	Electron	-1	1,0	proche de la surface	les e^- ne pénètrent pas : tissus + profonds que la tumeur épargnés
Protons	Proton	1	1,1	en profondeur	absorption par les tissus (pic de Bragg) : tissus sains épargnés
Neutrons	Neutron	0	3,0 - 4,0	proche de la surface	parcours linéaire au sein de la matière
Ions	C^{6+} , He^{2+} , etc.	≥ 2	≥ 3	en profondeur	tous avantages confondus : absorption par les tissus comparables aux protons efficacité biologique comparable aux neutrons

Tableau I.3. Comparaison des différentes modalités de radiothérapie. L'efficacité biologique représente la dose (en Gy) de rayons relative nécessaire pour produire le même effet biologique que l'irradiation par photons (Terasawa *et al.*, 2009)

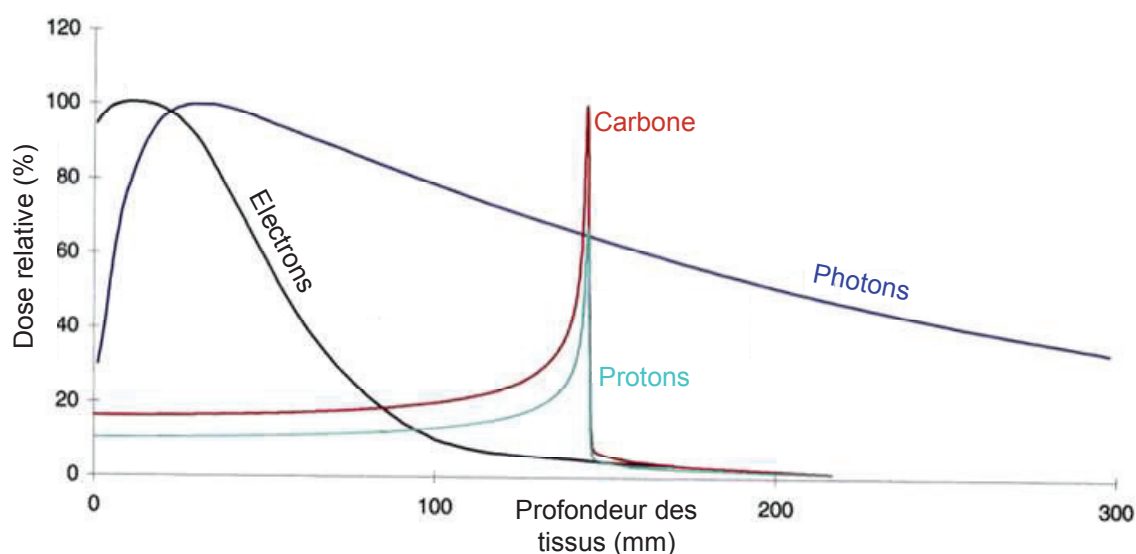


Figure I.6. Dépôt d'énergie par différentes particules lors de leur pénétration dans les tissus humains. Le profil de dépôt d'énergie des neutrons est semblable à celui des photons (Quantum diaries)

1.3.4. Amélioration de la radiothérapie

Les rayonnements émis lors d'une radiothérapie n'étant pas sélectifs, la dose d'irradiation administrée au patient est bien souvent inférieure à la dose nécessaire pour éradiquer la tumeur, de manière à épargner autant que possible les tissus sains. Ce sous-dosage est souvent à l'origine de récurrences du cancer.

L'amélioration du traitement par radiothérapie consiste d'une part à augmenter la destruction des cellules cancéreuses et d'autre part à diminuer les dommages causés sur les tissus sains (Begg *et al.*, 2011). Ces deux issues sont complémentaires et reposent sur quatre paramètres :

- l'exploitation de la différence des propriétés radiobiologiques des cellules saines et des cellules cancéreuses : les radiothérapeutes jouent sur la dose d'irradiation administrée ainsi que sur la durée et la fréquence d'exposition à l'irradiation (fractionnement du traitement) (Baskar *et al.*, 2012 ; Begg *et al.*, 2011 ; INCa, 2009) ;
- le choix des rayons selon leur efficacité biologique et leur profil de dépôt d'énergie lors de leur pénétration dans les tissus (Baskar *et al.*, 2012 ; Begg *et al.*, 2011 ; Terasawa *et al.*, 2009 ; Jackson *et al.*, 2009 ; Pharmacology) ;

- la radiosensibilisation, consistant à administrer un médicament au patient, de manière à rendre les cellules plus sensibles à la radiothérapie (Xu *et al.*, 2012 ; Lechtman *et al.*, 2011 ; Pradhan *et al.*, 2009 ; Carter *et al.*, 2007) ;
- le guidage de la thérapie par l'imagerie, reposant sur l'utilisation d'agents théranostiques (Kelkar *et al.*, 2011, Ma *et al.*, 2011).

1.3.5. Vers la radiosensibilisation

La radiothérapie consiste à délivrer une forte dose thérapeutique de rayonnements ionisants au sein du volume tumoral sans excéder la tolérance des tissus sains environnants (Rahman *et al.*, 2009). L'utilisation de la radiothérapie aux doses nécessaires pour détruire certaines tumeurs est alors limitée par les dommages intolérables sur les tissus sains voisins. L'administration d'éléments à haut numéro atomique (Z) au sein du volume tumoral ciblé est susceptible de rendre les cellules plus sensibles à la radiothérapie utilisant des rayonnements de photons de basse énergie (de l'ordre de 100 keV) (Figure I.5). En effet, les matériaux contenant des éléments à haut numéro atomique ont des propriétés d'absorption différentes de celles des tissus environnants et leur présence peut modifier la distribution en dose absorbée : il est ainsi possible d'augmenter la dose locale dans les régions où l'agent radiosensibilisant se situe, sans affecter les tissus sains (Smith *et al.*, 2012).

Des études antérieures ont profité de l'absorption préférentielle de certains agents de contraste par des tumeurs pour augmenter le ratio thérapeutique [dose délivrée / tolérance des tissus sains environnants] en modifiant les sections transversales d'interaction des photons de plus basse énergie à proximité de la zone tumorale, délivrant ainsi une forte dose très localisée à la tumeur. Lorsque la concentration en agents de contraste est maximale au sein du volume tumoral à traiter et minimale au niveau des tissus sains, le volume cible peut alors être irradié par des rayons X ; les rayons X utilisés ont une tension de l'ordre du kilovoltage car les effets photoélectriques sont dominants sur cette plage de tension (Figure I.5). Les agents de contraste à base d'éléments à haut numéro atomique comme l'iode ($Z = 53$) et le gadolinium ($Z = 64$) présentent une forte probabilité d'interaction de photons de basse énergie (~ 100 keV) par effet photoélectrique. Le transfert d'énergie linéaire (TEL) élevé et la courte portée des produits d'interaction photoélectrique (photoélectrons, rayons X caractéristiques, électrons Auger) produisent une augmentation de la dose localisée dans la tumeur. Il est donc possible d'observer une augmentation des dommages au niveau des cellules tumorales proches de l'agent radiosensibilisant (Rahman *et al.*, 2009 ; Carter *et al.*, 2007).

Aussi, de par sa biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*, l'or métallique ($Z = 79$) est utilisé depuis les années 1950. Depuis une vingtaine d'années, il fait l'objet de nombreuses recherches en tant qu'agent radiosensibilisant. Plusieurs essais de radiosensibilisation ont été réalisés avec des nanoparticules d'or comme agent radiosensibilisant : la forte absorption photoélectrique et les électrons secondaires causés par les rayons X ou γ peuvent accélérer les cassures de brins d'ADN, démontrant une amélioration flagrante de la radiothérapie par l'utilisation combinée de nanoparticules d'or et de rayons X (Zhang X.D. *et al.*, 2012 ; Hainfeld *et al.*, 2010 ; Roux *et al.*, 2010 ; Rahman *et al.*, 2009).

La limitation de la dose d'irradiation délivrée aux tissus sains est une préoccupation majeure dans toutes les procédures de radiothérapie. L'utilisation combinée d'un agent radiosensibilisant et de rayons X vise à détruire une même fraction de cellules que lors d'une radiothérapie classique (rayons X seuls) à la différence que les doses d'irradiation sont réduites. Par conséquent, si un même contrôle local peut être obtenu pour des doses d'irradiation externes d'un ordre de grandeur inférieur, les tissus sains sont moins exposés aux rayonnements (Rahman *et al.*, 2009).

1.3.6. Vers des agents théranostiques

La radiothérapie guidée par imagerie s'inscrit dans une logique dite « théranostique » ; ce terme général est employé pour les matériaux associant des modalités de thérapie à des modalités d'imagerie médicale (Kelkar *et al.*, 2011, Ma *et al.*, 2011).

Les matériaux théranostiques ont l'avantage d'allier au sein d'un seul et même objet des agents d'imagerie et de thérapie : ils permettent alors d'imager les tissus cancéreux et de délivrer des agents thérapeutiques efficaces à proximité des cellules tumorales, et ce, de manière simultanée, puis de suivre l'évolution du traitement. De plus, ils évitent les problèmes récurrents liés aux différences de biodistribution et de sélectivité lors de l'utilisation d'agents d'imagerie et de thérapie distincts (Kelkar *et al.*, 2011).

Jusqu'à présent, très peu d'agents théranostiques ont atteint les essais cliniques car ils en sont encore à un stade précoce de développement (Xie *et al.*, 2010). Actuellement, le problème majeur reste l'optimisation des concentrations des agents d'imagerie et de thérapie. Par exemple, pour les systèmes alliant l'imagerie nucléaire – particulièrement sensible – à des substances chimiothérapeutiques, comme la doxorubicine, les doses requises pour l'efficacité du traitement sont nettement supérieures à la concentration nécessaire en radiotraceur (10^{-10} à 10^{-12} mol/L d'Al) (plusieurs ordres de grandeur). Les médicaments associés à des agents de contraste à base de gadolinium pour l'IRM souffrent du problème inverse : la quantité requise en agent de contraste (10^{-5} à 10^{-6} mol/L d'Al) est bien supérieure à la dose thérapeutique nécessaire. Ces discordances peuvent néanmoins être surmontées par le développement d'agents thérapeutiques plus efficaces ou d'agents d'imagerie plus performants, pouvant alors être administrés à de plus faibles concentrations (Kelkar *et al.*, 2011 ; Stasinopoulos *et al.*, 2011 ; Bardhan *et al.*, 2011).

Bien qu'il soit relativement récent, le domaine des théranostiques se développe à une vitesse fulgurante. Ces agents multimodaux sont généralement des systèmes nanoparticulaires (liposomes, polymères, micelles, nanoparticules, anticorps, etc.) car leur taille nanométrique leur permet de prolonger leur temps de circulation dans le sang selon la fonctionnalisation de leur surface, de profiter des anomalies des tumeurs pour y pénétrer et d'y être retenus du fait de l'absence de drainage lymphatique dans les tumeurs (Cabral *et al.*, 2011 ; Kelkar *et al.*, 2011 ; Lammers *et al.*, 2011 ; Stasinopoulos *et al.*, 2011, Bardhan *et al.*, 2011). Ce phénomène de ciblage passif, connu sous l'acronyme anglais « EPR effect » (Enhanced Permeability and Retention effect), fait l'objet du paragraphe suivant car le ciblage des tumeurs joue un rôle primordial dans l'efficacité de ces agents.

I.4. Optimisation physicochimique des agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques et Ciblage des tumeurs

Le ciblage des sites tumoraux est l'objectif ultime de l'administration des agents d'imagerie, de thérapie ou théranostique (Kwon *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011). Les avantages du ciblage, et par conséquent, d'une application locale de ces agents, sont les suivants : une forte concentration dans la zone d'intérêt et une exposition systémique faible, de manière à réduire les effets secondaires (Kwon *et al.*, 2012 ; Manish *et al.*, 2011 ; Ruoslahti *et al.*, 2010). En effet, la distribution différentielle désirée de ces agent d'imagerie, de thérapie ou théranostiques dans les tumeurs est la meilleure manière d'augmenter leur efficacité, d'épargner le reste du corps et donc, de réduire significativement la toxicité globale (Caraglia *et al.*, 2012 ; Manish *et al.*, 2011 ; Koo *et al.*, 2011 ; Danhier *et al.*, 2010).

Pour traiter une tumeur de manière efficace, l'agent de thérapie doit être très majoritairement concentré au niveau de la tumeur et le plus faiblement possible dans le reste de l'organisme. Or cet agent, lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse, circule dans le sang, franchit les parois vasculaires et se répand dans l'interstitium, puis pénètre dans la tumeur (Figure 7). Généralement, moins de 5 % de la dose injectée parvient à la tumeur (Kwon *et al.*, 2012 ; Shah *et al.*, 2012).

Les agents de thérapie circulant dans le sang, l'atteinte de la cible (tumeur) dépend de l'irrigation sanguine de la cible en question, quelque soit l'endroit où elle se trouve. Lors de leur circulation dans le sang, une proportion importante d'agents de thérapie peut être captée par le système réticulo-endothélial constitué de la rate, du foie, de la moelle osseuse et des surrénales, mais aussi des cellules mobiles comme les macrophages. Par ailleurs, il arrive que les agents thérapeutiques se dégradent ou que le médicament s'échappe de son « véhicule » avant d'avoir atteint la cible : le « véhicule » continue de circuler, dépourvu du médicament, et devient inutile (Figure I.7) (Kwon *et al.*, 2012).

Les chances d'atteindre la tumeur peuvent être augmentées en prolongeant le temps de circulation de l'agent de thérapie dans le sang. Une solution consiste à synthétiser des « véhicules » macromoléculaires : en effet, plus le diamètre de l'ensemble macromoléculaire en question est grand, moins il est susceptible d'être éliminé par voie rénale ; son temps de circulation dans le sang s'en retrouve prolongé (Kwon *et al.*, 2012). Ceci explique le nombre accru de recherches sur les nanostructures, à base de composés organiques et/ou de matériaux inorganiques (Koo *et al.*, 2011).

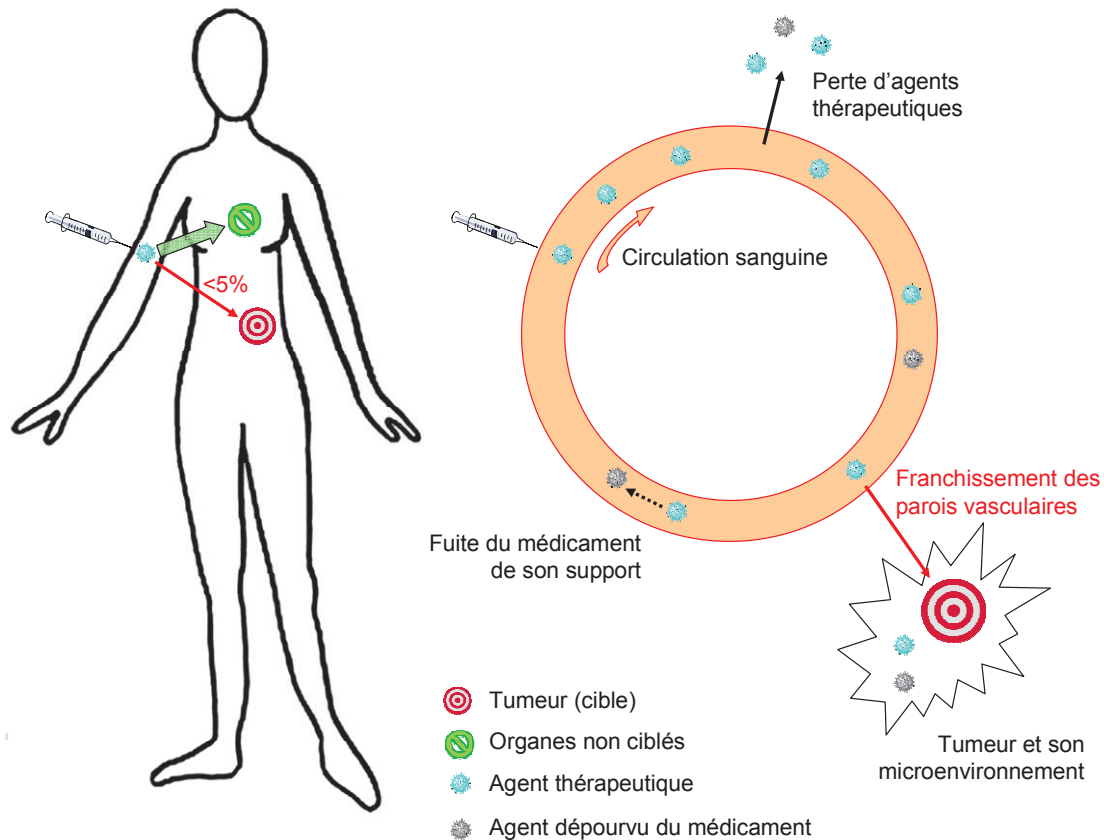


Figure I.7. Injection par voie IV de l'agent de thérapie au patient. L'agent en question circule dans le sang, franchit les parois vasculaires et se répand dans l'interstitium, puis pénètre dans la tumeur. Il est possible que le médicament contenu dans l'agent thérapeutique s'échappe de son support lors de sa circulation dans le sang. L'agent thérapeutique ayant réussi à pénétrer au sein de la tumeur doit faire face à un microenvironnement différent de celui des tissus sains. Adaptée de [Kwon et al., 2012](#).

L'ensemble des stratégies de ciblage proposées récemment peuvent être regroupées en deux grandes catégories : l'une passive, l'autre active ([Bae et al., 2011](#)). Ces termes ont pour objectif de différencier les systèmes présentant un vecteur (ciblage actif) de ceux n'en possédant pas (ciblage passif) ([Kwon et al., 2012](#)). Le ciblage passif est associé à l'effet EPR tandis que le ciblage actif désigne des interactions spécifiques entre les agents de thérapie et les cellules ciblées. Les cibrages passif et actif évoquent des phénomènes bien distincts : le premier (ciblage passif) est nécessaire à l'accumulation des nanostructures dans les tumeurs, le second (ciblage actif) sert à « ancrer » les nanostructures ciblantes au niveau de leur cible.

Les interactions ligand-récepteur ne peuvent se produire que si les deux composés sont distants de moins de 5 nm. Or, les nanostructures actuelles n'ont pas la capacité de se diriger d'elles-mêmes vers la tumeur. Pour atteindre leur cible, elles circulent dans le sang, et profitent des anomalies physio-pathologiques de la tumeur – à savoir une architecture du réseau vasculaire désordonnée et hautement perméable, une absence de drainage lymphatique, un pH extracellulaire diminué et une surexpression de nombreux antigènes, récepteurs et enzymes par les cellules tumorales ([Kaminskas et al., 2012](#)). Les nanostructures pénètrent alors dans la tumeur grâce à leurs propriétés physicochimiques par ciblage passif et le ciblage actif peut ensuite avoir lieu ([Bae et al., 2011](#) ; [Danhier et al., 2010](#)). Les cibrages passifs et actifs sont donc complémentaires (Figure I.8).

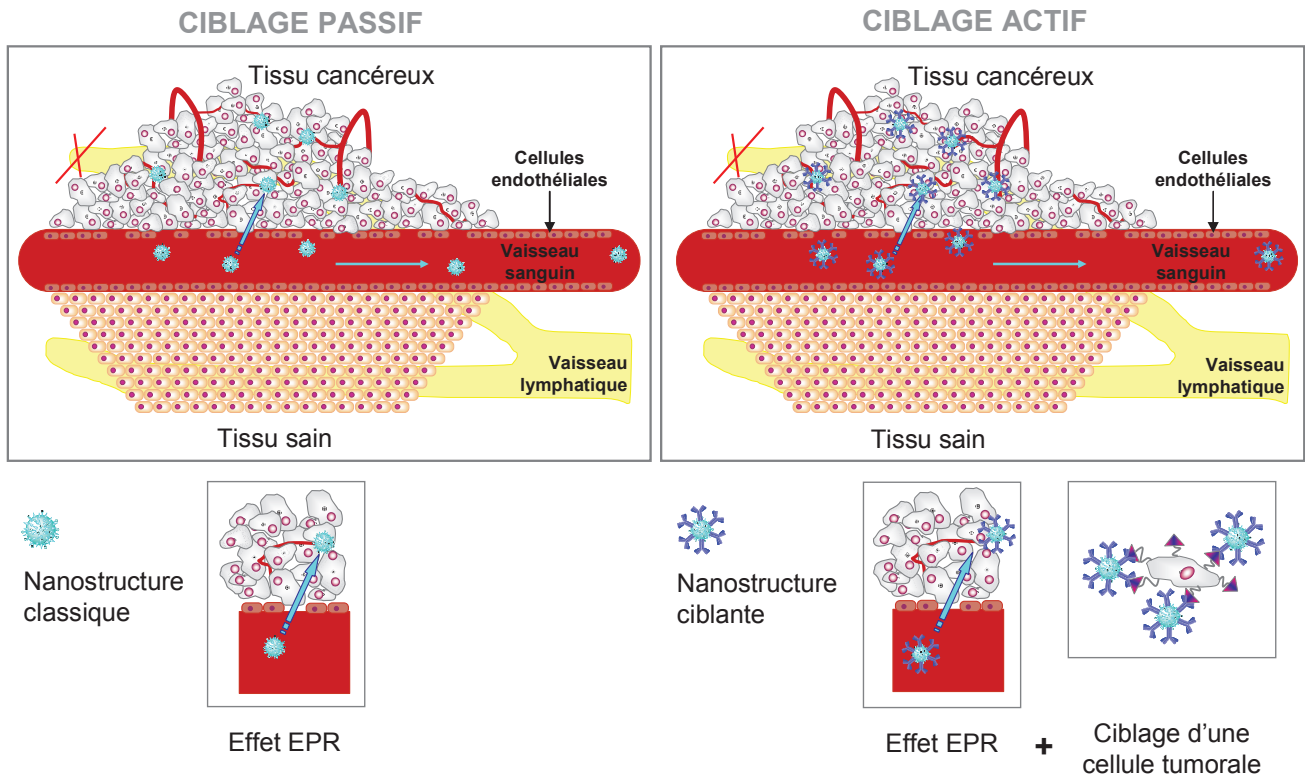


Figure I.8. Représentation de la complémentarité des ciblages passif et actif. Adaptée de Orive *et al.*, 2010.

1.4.1. Optimisation physicochimique des nanostructures utilisées comme agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques en vue d'un ciblage passif

Les propriétés physicochimiques des nanoparticules comme la taille, la géométrie, la forme, la chimie et la charge de surface, l'hydrophobie, la rigidité et la composition interne sont autant de paramètres qui ont une influence directe sur leur accumulation dans les organes, les tissus ou les cellules et sont donc à optimiser pour la conception de nanoparticules efficaces (Figure I.9) (Kamaly *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011).

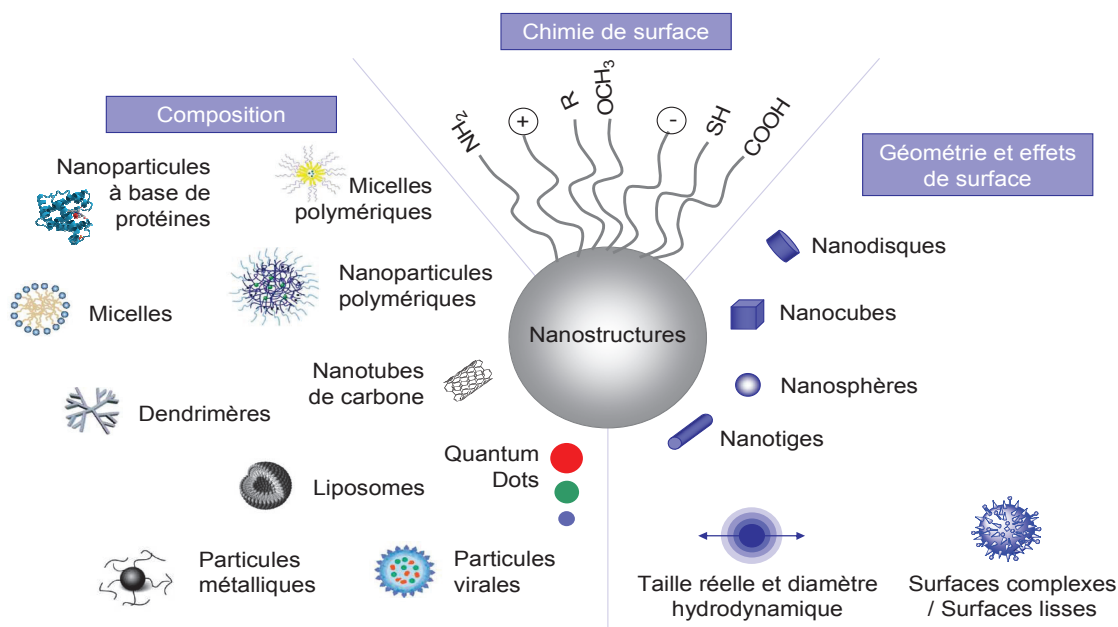


Figure I.9. Nanoparticules et leur caractéristiques bio-physico-chimiques affectant leur performance *in vitro* et *in vivo*. Adaptée de Kamaly *et al.*, 2012.

I.4.1.1. Diamètre hydrodynamique

Le diamètre hydrodynamique (DH) des agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques tient un rôle primordial dans leur comportement *in vivo*. Lorsqu'ils sont injectés par intraveineuse, les agents dont la taille est inférieure à 5 nm sont éliminés du sang par une rapide clairance rénale ; c'est le cas des petites molécules. Nous appellerons « petites molécules » les molécules organiques ou complexes présentant un DH inférieur à 1 nm et/ou un faible poids moléculaire ; c'est le cas de nombreux agents de contraste en IRM (Hermann *et al.*, 2008 ; Werner *et al.*, 2008), de radiotraceurs en TEMP (Lee Y.S. *et al.*, 2010 ; Wernick *et al.*, 2004) et en TEP (Tomasini *et al.*, 2012 ; Lee Y.S. *et al.*, 2010), de fluorophores en imagerie optique (Azhdarinia *et al.*, 2012 ; Schaafsma *et al.*, 2011) et d'agents chimiothérapeutiques (Drummond *et al.*, 1999). A l'inverse, les agents thérapeutiques dont le diamètre moyen avoisine le micromètre sont filtrés mécaniquement par les capillaires sinusoides et évacués par le système réticuloendothélial du foie et de la rate. Par conséquent, les nanoparticules dont la taille est comprise entre 10 et 500 nm sont susceptibles de circuler plus longtemps dans le sang et peuvent être employées en vue d'un ciblage passif (Koo *et al.*, 2011). En effet, leur DH est du même ordre de grandeur que les pores présents dans les vaisseaux sanguins et les systèmes d'élimination de l'organisme (Figure I.10) (Fox *et al.*, 2009).

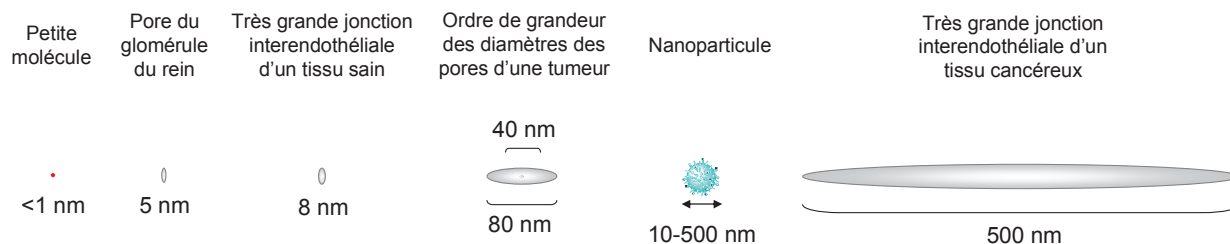


Figure I.10. Tailles relatives des petites molécules et nanoparticules comparées à celles des pores et ouvertures présents dans les vaisseaux sanguins et les systèmes d'élimination du corps. Adaptée de Fox *et al.*, 2009.

Lorsque le sang passe par les reins, le glomérule du rein élimine les solutés, les déchets et le surplus d'eau. Les systèmes macromoléculaires dont le DH est inférieur aux pores glomérulaires ($4 < DH < 14$ nm) s'infiltreront facilement dans les pores du glomérule du rein et sont éliminés *via* les urines. Ceux dont le DH est supérieur aux pores glomérulaires sont trop larges pour être excrétés et sont donc susceptibles d'être retenus au sein de l'organisme plus longtemps (Fox *et al.*, 2009).

Le foie et les composants du système réticuloendothélial peuvent également éliminer les systèmes macromoléculaires du sang. Au cours d'un processus appelé opsonisation, les opsonines (protéines) présentes dans le sang se lient aux particules étrangères pour que les cellules phagocytaires les reconnaissent plus facilement. Les opsonines se lient aisément aux agrégats et aux particules dont le DH avoisine les 200 nm ; les ensembles {opsonine/particule} sont évacués par le foie et la rate. Les opsonines ont tendance à se lier et à évacuer les particules hydrophobes et chargées plutôt que les substances hydrophiles et neutres (Fox *et al.*, 2009). L'encapsulation des particules par une couche de PEG (polyéthylène glycol), un polymère biocompatible et furtif, permet de protéger ces particules du système réticuloendothélial (Llevot *et al.*, 2012 ; Guo *et al.*, 2012 ; Perrault *et al.*, 2009). Cette couche protectrice hydrophile autour des particules crée des forces de répulsion électrostatiques qui repoussent les opsonines, ce qui bloque et repousse le processus d'opsonisation (Danhier *et al.*, 2010). D'autre part, le système réticuloendothélial peut éliminer les particules de manière indirecte, par dégradation ; ce procédé d'évacuation est particulièrement approprié pour les substances contenant des peptides ou des liaisons ester (Fox *et al.*, 2009).

Les agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques se propagent dans les tissus en passant à travers des jonctions intercellulaires par des vaisseaux post-capillaires et des capillaires discontinus au sein de la vascularisation des tissus. Dans les tissus sains, le mécanisme basique du transport de molécules dans l'interstitium est la diffusion à travers les petits interstices (2-6 nm) de la paroi endothéliale (Figure I.10). Les petites molécules sont transportées dans le corps selon ce mécanisme de diffusion. Les molécules présentes de manière extracellulaire dans l'interstitium peuvent être évacuées par le système lymphatique, qui replace ces molécules dans le sang (Kaminskas *et al.*, 2012 ; Fox *et al.*, 2009). Ce phénomène de diffusion dans tout l'organisme, malgré l'évacuation par drainage lymphatique, réduit la capacité des petites molécules à être spécifique d'une tumeur.

Le passage des agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques dans des tumeurs solides diffère du transport dans les tissus sains, en raison, notamment, de la plus grande taille de pores présents dans le système vasculaire tumoral (pouvant aller de 40-80 nm jusqu'au micromètre) (Figure 9) (Fox *et al.*, 2009). En effet, de par la construction rapide et désordonnée de structures vasculaires nouvelles, les tumeurs sont plus facilement perméables aux agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques que les tissus sains (Kaminskas *et al.*, 2012). Ce phénomène est connu sous le nom d'effet EPR et son mécanisme fondamental est exploité en vue d'un ciblage passif des macromolécules dans les tumeurs solides (Figure I.11) (Llevot *et al.*, 2012 ; Koo *et al.*, 2011). De plus, aux alentours des tumeurs à croissance rapide, le système lymphatique est défectueux ou absent, ce qui réduit les possibilités d'évacuation des macromolécules ayant pénétré dans la tumeur (Figure I.10). Enfin, les volumes interstitiels des tumeurs sont plus importants que ceux des tissus sains, ce

qui favorise aussi l'accumulation des macromolécules dans les tumeurs (Lammers *et al.*, 2012 ; Fox *et al.*, 2009 ; Danhier *et al.*, 2010).

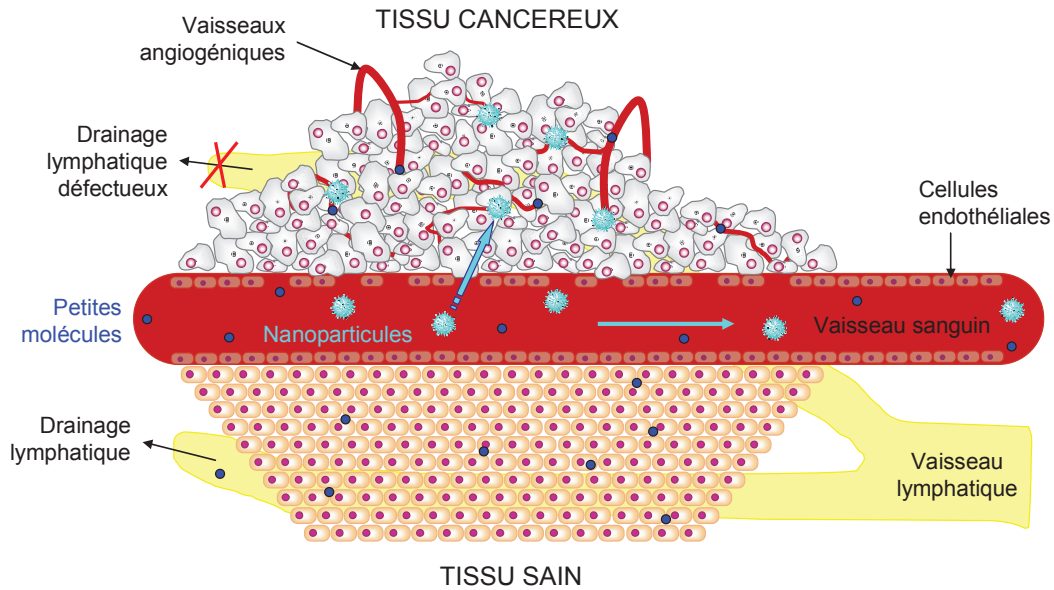


Figure I.11. Représentation schématique de l'effet EPR : les nanoparticules franchissent les parois vasculaires grâce à la perméabilité accrue du système vasculaire tumoral. Les nanoparticules sont retenues par la tumeur car le drainage lymphatique est défectueux voire absent. De ce fait, les nanoparticules peuvent s'accumuler au niveau de la tumeur, c'est ce qu'on appelle le ciblage passif. Adaptée de Fox *et al.*, 2009.

Les systèmes macromoléculaires dont la taille est supérieure aux interstices de la paroi endothéliale (> 5 nm) exploitent les anomalies physio-pathologiques tumorales et sont susceptibles de pénétrer au sein de la tumeur et d'y être retenus. Dans cette optique, le développement de nanostructures pour l'imagerie médicale et la thérapie constitue une approche pour s'affranchir de l'absence de spécificité des agents conventionnels : l'effet EPR est devenu une règle d'or, un principe directeur, car il est applicable à toutes les tumeurs à forte croissance, c'est-à-dire à tous les cancers exceptées les tumeurs hypovascularisées comme les cancers de la prostate ou du pancréas (Abeylath *et al.*, 2011). D'autre part, les nanostructures peuvent regrouper des fonctions uniques que de simples molécules ne pourraient pas présenter (Ruoslahti, 2012). Les nano-suppôts couramment décrits dans les littératures préclinique et clinique sont généralement des nanoparticules polymériques ou inorganiques (à base d'or, d'oxydes de fer, de silice, de lanthanides ou de QDs), des micelles polymériques, des supports à base de protéines, des liposomes, des dendrimères ou des médicaments conjugués à des polymères (Alexis *et al.*, 2010 ; Danhier *et al.*, 2010 ; Abeylath *et al.*, 2011 ; Llevot *et al.*, 2012 ; Lammers *et al.*, 2012).

Cependant, le ciblage passif connaît certaines limites. Premièrement, le ciblage passif dépend du degré de vascularisation de la tumeur et de l'angiogenèse, et par conséquent du type de tumeur et des sites anatomiques. D'autre part, la forte pression exercée par les fluides interstitiels au sein de la tumeur peut perturber l'accumulation passive des nanostructures et leur distribution homogène à travers la tumeur (forte pression au centre de la tumeur, diminuant petit à petit vers les périphéries) (Danhier *et al.*, 2010). Le ciblage passif peut alors être complété par un ciblage actif en vue d'accroître

la sélectivité et le potentiel des nanostructures pour l'imagerie médicale et la thérapie tout en limitant l'exposition systémique (Crielaard *et al.*, 2012 ; Kaminskas *et al.*, 2012 ; Aly, 2012 ; Abeylath *et al.*, 2011 ; Duncan *et al.*, 2010).

I.4.1.2. Forme

La forme des nanoparticules affecte directement leur taux d'internalisation cellulaire (Wang *et al.*, 2011). Les nanoparticules sphériques sont, par exemple, plus naturellement absorbées par les cellules que les nanotiges du fait de leur forme qui facilite les processus d'enveloppement des membranes cellulaires. La forme des nanoparticules influence également leur biodistribution *in vivo*. En effet, les nanoparticules non sphériques présentant des formes discoïdales et une longueur axiale similaire aux diamètres cellulaires sont susceptibles de circuler plus longtemps dans l'organisme que les nanoparticules sphériques (Kamaly *et al.*, 2012).

I.4.1.3. Charge de surface

La charge de surface des nanoparticules est un facteur clé qui contribue au ciblage non spécifique des cellules et des protéines lors de la circulation sanguine. Les nanoparticules disposant d'une surface chargée positivement sont rapidement évacuées de la circulation sanguine par les cellules du système réticuloendothélial (Joshi *et al.*, 2012). En effet, les nanoparticules à surface cationique peuvent interagir avec les groupements négativement chargés de la tête des phospholipides, des protéines et des glycanes à la surface des cellules, conduisant ainsi à l'endocytose ou à la pénétration directe de la membrane en surface des cellules. De la même façon, les nanoparticules négativement chargées sont également susceptibles de démontrer une capture cellulaire sélective, à la différence des nanoparticules à surface neutre (Kamaly *et al.*, 2012).

Les nanoparticules chargées présentent par conséquent des temps de demi-vie *in vivo* plus courts et des captures cellulaires non spécifiques en raison des interactions avec les protéines du sang, pouvant conduire à l'activation du système du complément. Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes ou membranaires du sang, principalement sécrétées par le foie, complétant la capacité des anticorps et des cellules phagocytaires à éliminer les pathogènes de l'organisme ; le système du complément fait partie du système immunitaire. Les nanoparticules présentant des fonctions amines en surface sont les plus susceptibles d'activer le complément ; au contraire, les nanoparticules présentant une surface avec des groupements méthoxy (surface neutre) sont les plus immuno-compatibles. De manière générale, les nanoparticules dont le potentiel de surface est inférieur à 15 mV démontrent une capture de macrophage minimale et circulent plus longtemps au sein de l'organisme : elles ont donc plus de temps pour atteindre la tumeur (Kamaly *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011).

I.4.1.3. Hydrophobie, rugosité et rigidité

L'hydrophobie est un facteur clé dans le ciblage des cellules. En effet, les nanoparticules plus hydrophobes que la membrane de la surface cellulaire sont plus facilement captées par les cellules : les surfaces hydrophobes tendent à conduire à de plus hauts niveaux d'adsorption des protéines (Kamaly *et al.*, 2012).

D'autre part, les effets de surface (surfaces rugueuses vs. surfaces lisses) influencent la fixation des nanoparticules à la cellule. La rugosité à l'échelle nanométrique se manifeste comme des protrusions locales ou des dépressions à la surface des nanoparticules, conduisant à la minimisation des forces répulsives entre la surface des cellules et celle des nanoparticules (Kamaly *et al.*, 2012).

Enfin, la rigidité des nanoparticules peut affecter leur profil de biodistribution *in vivo*. Les nanoparticules plus flexibles sont susceptibles de traverser les vaisseaux sanguins et les pores plus facilement que les nanoparticules rigides (Kamaly *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2011).

I.4.2. Ciblage actif

Les découvertes dans le domaine des nanomédecines ont démontré une nature à la fois évolutive et révolutionnaire. Jusqu'à présent, très peu de nanoparticules à ciblage actif ont atteint le stade du développement clinique, et aucune de ces nanoparticules ciblantes n'a encore été approuvée cliniquement à ce jour. La Figure I.12 illustre le développement de diverses nanoparticules ayant été approuvées pour l'usage chez l'humain ou servant actuellement pour des essais cliniques. Toutes les nanoparticules pour l'imagerie et/ou la thérapie et ayant été validées cliniquement sont considérées comme appartenant à la première génération de nanomédecines à ciblage passif (Kamaly *et al.*, 2012).

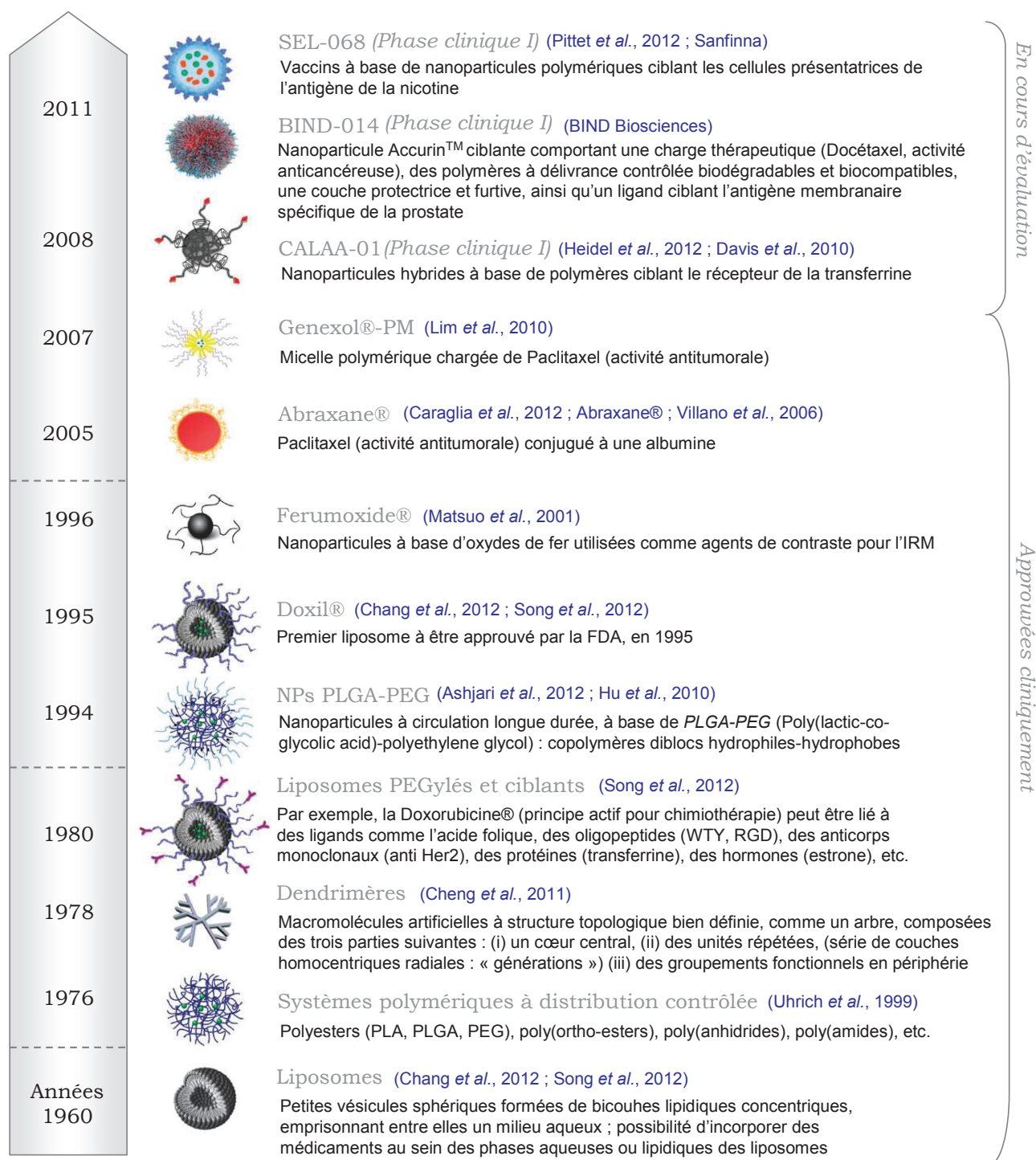


Figure I.12. Chronologie des débuts de la nanomédecine au stade clinique (liste non exhaustive). Adaptée de Kamaly *et al.*, 2012.

C'est l'approbation d'Abraxane® – nanoparticule à base de Paclitaxel (inhibiteur mitotique utilisé comme agent chimiothérapeutique) conjuguée à une albumine (ciblant la glycoprotéine gp60 exprimée à la surface des cellules endothéliales) – en 2005 par la Food and Drug Administration (FDA) qui a conduit à la validation clinique de la seconde génération de nanoparticules thérapeutiques : celles qui allient ciblage passif et actif. Abraxane® présente un taux de réponse tumorale et un temps de progression considérablement plus élevés que son analogue non ciblant

Taxol® – Paclitaxel formulé avec Cremophor El et de l'éthanol (Abraxane® vs. Taxol® : taux de réponse tumorale 33 % vs. 19 %, temps de progression : 23 semaines vs. 16,9 semaines pour les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique ne répondant pas à la polythérapie) (Kamaly *et al.*, 2012).

Le ciblage actif ne peut pas être dissocié du ciblage passif car il a lieu seulement après que les agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques se sont accumulés dans les tumeurs. Si l'effet EPR est une prémisse principale dans la conception des nanomédecines spécifiques des tumeurs pour des applications en imagerie et/ou en thérapie, certaines mises en garde sont à considérer. Par exemple, les tumeurs les plus grosses présentent une certaine hétérogénéité physio-pathologique qui empêche les nanoparticules de s'accumuler dans toute la tumeur, et en particulier au centre, où l'effet EPR n'est pas observé. D'autre part, le degré de perméabilité vasculaire diffère selon les tumeurs (toutes les tumeurs ne présentent pas d'effet EPR). De plus, la convection des nanoparticules depuis l'espace intravasculaire vers l'espace extravasculaire peut être limitée par la pression au niveau de l'interstitium tumoral et ce, malgré la perméabilité de la vascularisation tumorale. Ces problèmes peuvent être contournés par l'association des deux cibpages : passif et actif (Kamaly *et al.*, 2012).

I.4.2.1. Les différents types de vecteurs

Le mécanisme de ciblage actif tire profit des interactions hautement spécifiques entre le vecteur (ligand ciblant) et certains tissus ou antigènes à la surface des cellules pour augmenter l'accumulation et la rétention des particules dans les tumeurs. Plusieurs stratégies de conjugaison de vecteurs en surface des nanoparticules ont d'ailleurs été mises en place (Sun *et al.*, 2006). Les vecteurs sont choisis pour leur aptitude à se lier aux récepteurs surexprimés par des cellules tumorales ou par le système de vascularisation tumorale. Ces ligands spécifiques peuvent être (i) des protéines comme les anticorps monoclonaux (Acm) ou les fragments d'anticorps, (ii) des acides nucléiques comme les aptamères, ou (iii) d'autres ligands récepteurs comme des peptides, des petites molécules organiques, des vitamines ou des glucides (Figure I.13) (Lammers *et al.*, 2012 ; Ruoslahti, 2012 ; Kamaly *et al.*, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2008 ; Peer *et al.*, 2007 ; Imai *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2006).

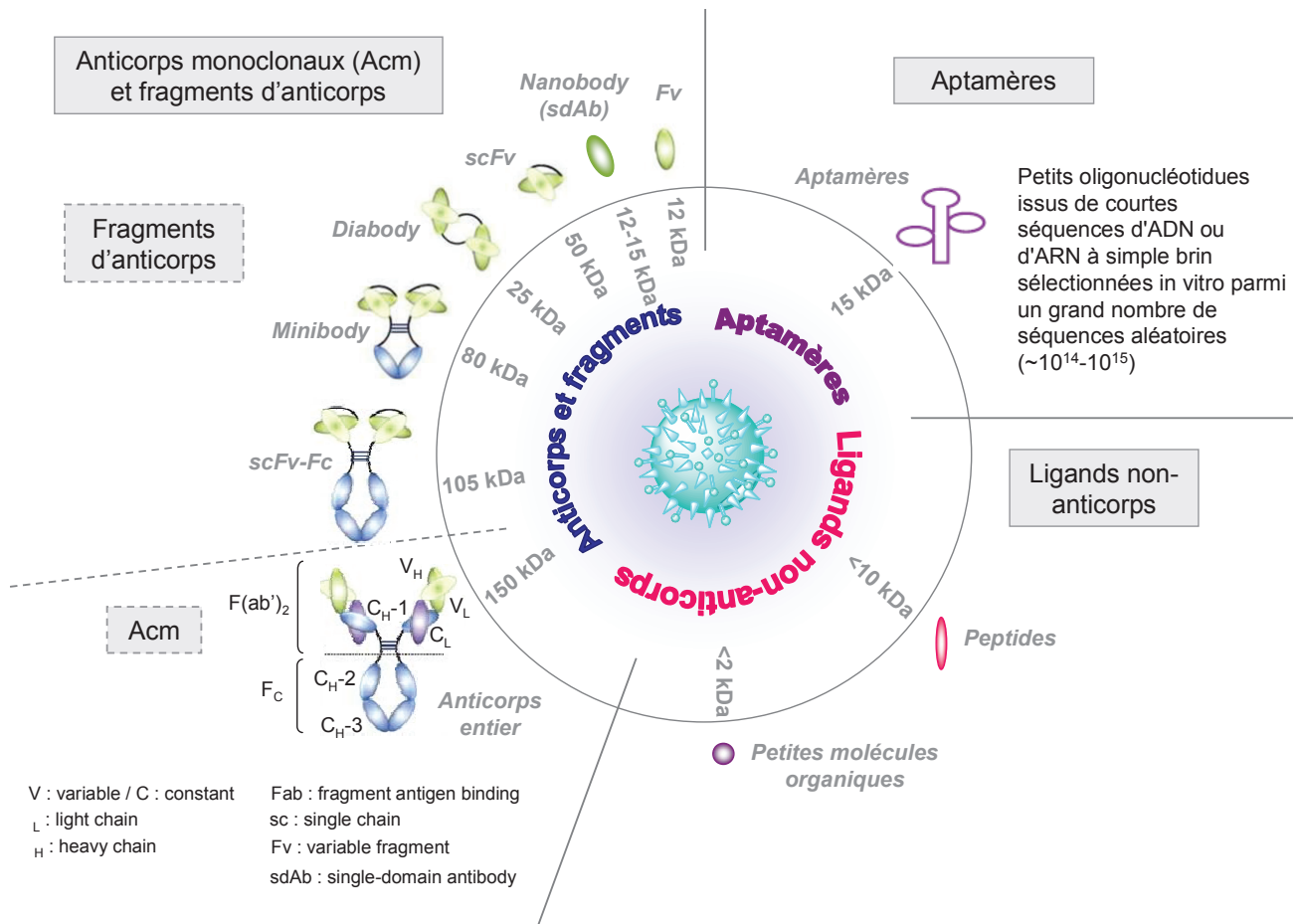


Figure I.13. Grandes catégories de ligands utilisés pour le ciblage actif et leurs représentations : (i) Anticorps monoclonaux (Acm) ou fragments d'anticorps : fragments d'anticorps à chaînes uniques variable et constante (scFv-Fc), minibodies, diabodies, fragments d'anticorps à chaîne unique variable (scFv), fragments variables (Fv) et nanobodies (dAb), (ii) aptamères (Apt) et (iii) ligands non-anticorps : peptides et petites molécules organiques. Adaptée de *Olafsen et al., 2010 ; Wang et al., 2008 ; Peer et al., 2007.*

Les anticorps monoclonaux ou les fragments d'anticorps ciblent un récepteur spécifique interférant dans les chemins de signalisation cellulaire ou régulant les proto-oncogènes (gènes impliqués dans le contrôle de la division cellulaire tumorale et à l'origine de la prolifération cellulaire excessive). La molécule active peut jouer à la fois le rôle de ligand ciblant et de médicament ou, seulement le rôle d'agent ciblant (*Danhier et al., 2010*).

Grâce à leurs deux sites de liaisons, les anticorps monoclonaux présentent une avidité de liaison élevée pour leur cible. Leur grande taille leur évite l'élimination par voie rénale et prolonge leur temps de circulation dans le sang. Les Acm ne sont pas sensibles à la dégradation par nucléase (contrairement à l'ADN, donc aux aptamères) et leur capacité à cibler des processus pathologiques a été largement démontrée par le succès de plusieurs Acm thérapeutiques comme rituximab, trastuzumab, cetuximab et bavituzumab. Cependant, bien que les anticorps monoclonaux soient approuvés cliniquement en tant qu'agents thérapeutiques et qu'ils soient largement étudiés dans l'optique d'un ciblage actif, leur utilisation reste limitée. En effet, ils présentent une faible distribution

dans les tumeurs à cause de leur taille imposante qui restreint la diffusion passive à travers les membranes des cellules endothéliales dans les capillaires. De plus, le processus de production d'anticorps n'est pas adaptable à grande échelle : la production en « batch to batch » reste le seul moyen de fabriquer les AcM ; par conséquent, des variations d'un lot à l'autre sont parfois observées et le coût de production est considérablement élevé. Les contaminations virales et bactériennes lors du processus de fabrication peuvent également affecter la qualité du produit. Enfin, les anticorps monoclonaux sont souvent immunogènes : ils provoquent des réactions immunitaires (Keefe *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2008 ; Peer *et al.*, 2007 ; Imai *et al.*, 2006).

Les fragments d'anticorps semblent plus sûrs que leurs homologues entiers lors des injections en systémique car ils présentent moins d'interactions de ciblage non spécifiques. Cependant, ils sont moins stables dans le temps que les anticorps entiers (Wang *et al.*, 2008 ; Peer *et al.*, 2007 ; Imai *et al.*, 2006).

Les aptamères sont dix fois plus petits que les anticorps monoclonaux et présentent moins d'immunogénicité (capacité à provoquer une réponse immunitaire spécifique), conduisant alors à une meilleure biodistribution. Grâce à leur plus petite taille, les aptamères pénètrent plus facilement dans les compartiments biologiques. Leur spécificité de ciblage et leur sensibilité est élevée. Leur synthèse chimique est transposable à grande échelle, ce qui rend leur production un peu moins coûteuse que celle des AcM ; d'autre part, les processus chimiques ne sont pas sujets aux contaminations virales et bactériennes. Néanmoins, l'utilisation des aptamères peut être limitée par certains inconvénients : de par leur plus faible taille, leur temps de circulation dans le sang est réduit et les aptamères non modifiés sont fortement sujets à la dégradation par nucléase du sérum (Keefe *et al.*, 2010).

Les ligands non-anticorps tels que les peptides ou les petites molécules organiques sont quant à eux rapidement disponibles, peu onéreux, facilement manipulables et non immunogènes : ils sont particulièrement adaptés au ciblage actif des nanoparticules (Yu *et al.*, 2012). De plus, la présentation multivalente de peptides sur une même nanoparticule est susceptible d'augmenter l'avidité de la nanoparticule vectorisée pour sa cible (Ruoslahti, 2012 ; Zhang X.X. *et al.*, 2012).

I.4.2.2. Deux stratégies de ciblage actif : le ciblage des cellules cancéreuses ou le ciblage des cellules endothéliales

Deux stratégies de ciblage actif se distinguent selon le type de cible cellulaire, à savoir : les cellules cancéreuses ou les cellules endothéliales (Lammers *et al.*, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010).

Dans le premier cas, il s'agit de cibler les récepteurs surexprimés en surface des cellules cancéreuses pour d'augmenter l'accumulation des nanostructures ciblantes dans la zone d'intérêt. (Danhier *et al.*, 2010).

La seconde stratégie consiste à cibler l'endothélium au sein des tumeurs solides. Un des objectifs de cette stratégie de ciblage des cellules endothéliales est la destruction des cellules tumorales induite par le manque d'oxygène et de nutriments par inhibition la croissance de la tumeur en l'empêchant de recruter de nouveaux vaisseaux sanguins. En gênant l'approvisionnement en sang de la tumeur, la taille et la capacité de la tumeur à métastaser peuvent être régulées. Les ligands

choisis ciblent et détruisent donc les vaisseaux sanguins nouvellement formés ou en cours de formation, et indirectement, les cellules tumorales que ces vaisseaux supportent, principalement au centre de la tumeur. Les avantages de cette stratégie de ciblage des cellules endothéliales sont nombreux. Premièrement, le ciblage passif par effet EPR n'est pas indispensable pour que les nanostructures ciblantes rencontrent leurs cibles. Ensuite, les risques éventuels de résistance sont réduits grâce à la stabilité génétique des cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales. Enfin, la plupart des récepteurs de cellules endothéliales sont exprimés quelque soit le type de tumeur, ce qui permet de traiter un large éventail de cancers (Lammers *et al.*, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010). Les principales cibles de l'endothélium tumoral comprennent :

- *VEGF* (facteur de croissance endothélial vasculaire) et ses récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, neuropiline-1 et neuropiline-2 (Weis *et al.*, 2011 ; Danhier *et al.*, 2010 ; Thomas, 2010) ;
- l'*intégrine* $\alpha_v\beta_3$ – une protéine transmembranaire surexprimée sur les cellules endothéliales et de nombreuses lignées tumorales, capable de lier des protéines de la matrice extracellulaire comme la vitronectine ou la fibronectine (Lammers *et al.*, 2012 ; Ruoslahti, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010),
- la *VCAM-1* (molécule d'adhésion des cellules vasculaires - 1) (Danhier *et al.*, 2010)
- les *MMPs* (Métalloprotéinases Matricielles) (Corti *et al.*, 2012 ; Lammers *et al.*, 2012 ; Ruoslahti, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010).

Le présent travail de thèse traite ces deux stratégies de ciblage actif (ciblage des cellules cancéreuses et/ou endothéliales) ; les vecteurs utilisés sont détaillés en fin de chapitre.

1.4.3. Vers une nanoparticule idéale

Bien que les nanoparticules ciblantes soient entrées tardivement en phase clinique, leur potentiel en tant que nouvelle génération d'agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques reste immense. Ces nouveaux systèmes comprenant des ligands ciblant inoffensifs, efficaces et spécifiques, des matériaux biocompatibles et un choix approprié d'agents d'imagerie et/ou de thérapie, sont susceptibles de fournir des traitements plus efficaces pour un grand nombre de maladies humaines et plus particulièrement, le cancer (Kamaly *et al.*, 2012).

La nanoparticule idéale répond à trois critères essentiels : (i) elle associe différentes modalités d'imagerie de manière à aboutir à un diagnostic plus précoce et plus précis, (ii) elle rend la thérapie plus efficace et (iii) elle permet de suivre l'évolution du traitement par ces mêmes modalités d'imagerie (Abeylath *et al.*, 2011). L'injection par intraveineuse de cet agent théranostique doit composer avec les obstacles suivants : les interactions avec les composants du sang, la captation par le système réticuloendothélial, l'élimination rénale, la toxicité, l'aptitude à cibler les cellules d'intérêt (Guo *et al.*, 2012).

Le développement de nanoparticules à visée thérapeutique doit également prendre en considération les critères suivants (Kamaly *et al.*, 2012) :

- l'utilisation de matériaux biocompatibles et biodégradables ou bio-éliminables,

- l'utilisation de méthodes de bio-conjugaison des vecteurs à la nanoparticule simples, efficaces et reproductibles avec un minimum d'étapes et de purification,
- l'optimisation des propriétés physico-chimiques des nanoparticules (Figure I.14) pour atteindre une libération optimale, un temps de circulation long au sein de l'organisme, une biodistribution adaptée, ainsi qu'une accumulation dans les tissus cibles maximale et une exposition systémique faible,
- la validation de la stabilité et une durée de vie prévisible des nanoparticules *in vivo*,
- le développement de processus adaptables à grande échelle pour la fabrication des nanoparticules en grande quantité pour le développement clinique et la commercialisation.

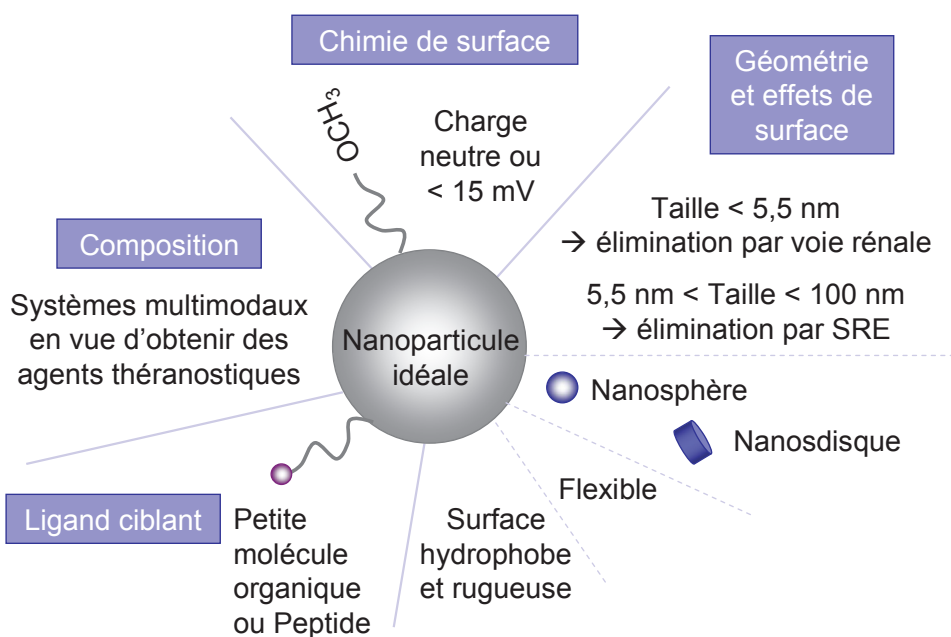


Figure I.14. Nanoparticule idéale et ses caractéristiques bio-physico-chimiques.

Les recherches dans le domaine des nanomédecines ciblantes sont nombreuses et ces efforts doivent être perpétués dans l'idée de les transposer du laboratoire au chevet du patient (Kamaly *et al.*, 2012 ; Lammers *et al.*, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010).

I.5. Conception de nanoparticules hybrides multifonctionnelles ciblantes à base de gadolinium, combinant imagerie et thérapie

L'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux) de l'ILM (Institut Lumière Matière) est spécialisée depuis plusieurs années dans la conception de nanoparticules hybrides à base de gadolinium à visée thérapeutique. Ce lanthanide a été choisi pour ses propriétés paramagnétiques (Caravan *et al.*, 1999) et son numéro atomique relativement élevé (Rahman *et al.*, 2009). Le gadolinium confère aux nanoparticules synthétisées la possibilité d'aboutir à un diagnostic

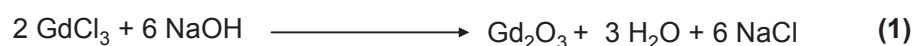
par IRM et de posséder des effets radiosensibilisants par radiothérapie et par thérapie à capture de neutrons par les isotopes du gadolinium (^{157}Gd et ^{155}Gd) (Roux *et al.*, 2010).

1.5.1. Synthèse de nanoparticules hybrides à base de gadolinium à structure cœur-coquille

La synthèse de nanoparticules hybrides à base de gadolinium a été développée et optimisée au sein du laboratoire (Bridot, 2007 ; Bazzi, 2004 ; Louis, 2004) et est désormais exploitée par la start-up Nano-H®. Les nanoparticules obtenues ont une structure cœur-coquille, le cœur étant constitué d'oxyde de gadolinium (Gd_2O_3) et étant enrobé par une couche de polysiloxane. Pour une meilleure compréhension, ces deux étapes de synthèse sont expliquées de manière succincte, puis les étapes suivantes de fonctionnalisation et de vectorisation des nanoparticules seront plus largement détaillées.

1.5.1.1. Synthèse du cœur à base d'oxydes de gadolinium

Le cœur d'oxyde de gadolinium est réalisé selon la réaction (1) :



La dimension du cœur oxyde peut être modulée suivant les conditions de synthèse. Une méthode permet d'obtenir des « petits cœurs », appelés « PC », de DH moyen de $(1,1 \pm 0,2)$ nm, l'autre à des « gros cœurs », nommés « GC », de DH moyen de $(3,5 \pm 0,8)$ nm. La synthèse du cœur est réalisée dans le diéthylène glycol (DEG) en raison de sa température d'ébullition élevée (245°C) et de son importante viscosité (39 cp) : il permet de contrôler la taille des cœurs et d'obtenir des formes sphériques de taille relativement homogène (faible dispersion de taille), sans agglomération (Bazzi, 2004).

1.5.1.2. Enrobage du cœur oxyde par une couche de polysiloxane

La couche de polysiloxane est obtenue à partir des silanes suivants : TEOS (40%) et d'APTES (60%) (Figure I.15). Cet enrobage a une double fonction : la protection du cœur oxyde et la fonctionnalisation de la nanoparticule (Louis *et al.*, 2005). Le premier rôle de la couche de polysiloxane est de protéger le cœur oxyde afin d'éviter la libération d'ions Gd^{3+} toxiques au sein de l'organisme et d'éviter l'agglomération des nanoparticules. Le second rôle de cette enveloppe est d'aménager la surface de la nanoparticule en vue d'une fonctionnalisation ultérieure. En effet, le bras aminopropyl de l'APTES permet de greffer des molécules d'intérêt comme des fluorophores organiques pour un suivi de la nanoparticule par imagerie optique, des PEG pour rendre la nanoparticule biocompatible et furtive, des ligands ciblant pour un ciblage actif, etc..

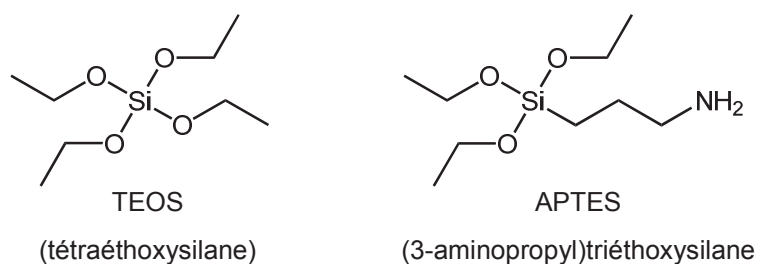


Figure I.15. Molécules de TEOS et d'APTES

L'étape d'enrobage du cœur oxyde consiste en plusieurs ajouts successifs d'APTES/TEOS (60/40 n/n). Cette étape est également réalisée dans le DEG. Les ajouts d'APTES/TEOS sont effectués en plusieurs fois, chaque ajout comprenant 0,5 Si par atome de Gd (soit 0,3 APTES / 0,2 TEOS / 1 Gd). Un réseau de polysiloxane réticulé est ainsi obtenu par réactions d'hydrolyse-condensation (eq. 2 et 3, Figure I.16).

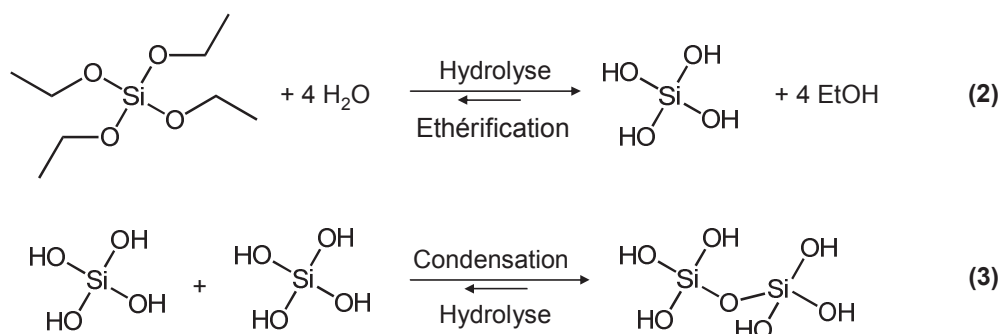


Figure I.16. Equations des réactions d'hydrolyse (2) et de condensation (3) du TEOS (Brinker, 1988).

Habituellement, les « PC » et « GC » sont respectivement enrobés par 8 et 4 couches de polysiloxane, conduisant aux appellations suivantes : « PC-4Si » pour « Petits Cœurs – 4 Si / 1 Gd » et « GC-2Si » pour « Gros Cœurs – 2 Si / 1 Gd ». Les solutions finales obtenues sont stables pendant plusieurs semaines à température ambiante, sans altération, quelque soit la nature du cœur. La couche de polysiloxane rend les nanoparticules biocompatibles et inertes biologiquement.

Ces nanoparticules hybrides à base de gadolinium étant destinées à des applications en IRM et en radiothérapie, les « GC-2Si » ont majoritairement été sélectionnées pour les étapes suivantes de fonctionnalisation car elles présentent la plus grosse taille de cœur et la plus fine couche de polysiloxane, laissant ainsi le gadolinium plus « visible » (Gd : agent de contraste positif pour l'IRM et possédant un effet radiosensibilisant en radiothérapie). Le DH moyen des nanoparticules hybrides à structure cœur-coquille GC-2Si obtenues est de $4,8 \pm 1,7$ nm, correspondant à un rendement d'enrobage du cœur par la matrice de polysiloxane de 43%. Les travaux de la thèse d'Anna Mignot permettent d'estimer à 550 le nombre moyen d'atomes de gadolinium et à 475 celui d'atomes de silice par nanoparticule (Mignot, 2012).

1.5.2. Fonctionnalisation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium à structure cœur-coquille

L'objectif premier de la fonctionnalisation est de rendre les solutions colloïdales de nanoparticules (structure cœur-coquille) obtenues dans le DEG stables dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire en milieu aqueux, à pH 7,4 et à une pression osmotique d'environ 300 mOsm. Le deuxième objectif est d'obtenir un ciblage (passif, voire passif et actif) de ces nanoparticules en milieu biologique. Cette thématique de fonctionnalisation a fait l'objet des thèses de Jean-Luc Bridot (Bridot, 2007) et d'Anne-Charlotte Faure (Faure, 2008).

Toutes les amines primaires apportées par le bras aminopropyl de l'APTES ne sont pas disponibles car certaines sont piégées au sein de la matrice de polysiloxane. Cependant, les amines primaires de surface peuvent servir de point d'ancrage aux différentes molécules d'intérêt. Le travail de thèse d'Anne-Charlotte Faure a consisté à modifier la surface des nanoparticules pour les rendre stables dans l'eau et en vue d'obtenir un ciblage *in vivo* (Faure, 2008).

1.5.2.1. Fonctionnalisation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium à structure cœur-coquille par un polymère hydrophile non chargé : le PEG

L'une des solutions pour rendre les nanoparticules hydrophiles consiste à modifier leur surface par du poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure I.17). La stabilité des nanoparticules dépend alors de la taille du PEG et de la densité de greffage. L'ajout de PEG affecte la biodistribution des nanoparticules *in vivo* : le PEG agit comme une barrière hydrophile empêchant l'adsorption par le système réticuloendothélial et réduit le taux d'élimination des nanoparticules par les cellules du système des phagocytes mononucléés (Llevot *et al.*, 2012 ; Perrault *et al.*, 2009).

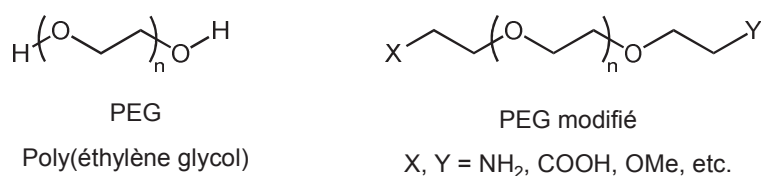


Figure I.17. Représentation du PEG et des PEG modifiés, n représentant le nombre d'unités éthylène glycol.

Les nanoparticules hydrophobes et chargées négativement sont plus sujettes à l'opsonisation que les nanoparticules hydrophiles et neutres en raison de l'adsorption accrue des opsonines à la surface des nanoparticules (Sheng *et al.*, 2009 ; Faure, 2008 ; Vonarbourg *et al.*, 2006). De nombreuses études ont alors été réalisées dans l'idée de concevoir des systèmes hydrophiles à charge de surface neutre. Parmi elles, l'ajout de PEG à la surface des nanoparticules a démontré la diminution évidente de la captation cellulaire du système des phagocytes mononucléés et par conséquent, un temps de circulation dans le sang plus élevé ; c'est d'ailleurs pourquoi les nanoparticules PEGylées sont considérées comme « furtives » (Llevot *et al.*, 2012 ; Guo *et al.*, 2012 ; Perrault *et al.*, 2009 ; Vonarbourg *et al.*, 2006). L'augmentation du temps de circulation des nanoparticules PEGylées maximise leurs chances d'atteindre les tumeurs et justifie le choix de cette stratégie en vue d'un ciblage passif (Chien *et al.*, 2012). Les PEG modifiés, grâce à leurs fonctions

terminales (-NH₂, -COOH, etc.), peuvent être greffés de manière covalente aux nanoparticules. Ces groupements terminaux affectent également la biodistribution des nanoparticules PEGylées par la charge de surface qu'ils apportent : les nanoparticules neutres étant moins sujettes à l'opsonisation, les PEG possédant une fonction -OMe en bout de chaîne présentent un grand intérêt pour la fonctionnalisation des nanoparticules et plus particulièrement dans le cadre d'un ciblage passif. Pour une stratégie de ciblage actif, il conviendra de choisir des PEG avec des fonctions terminales facilement modifiables comme les amines primaires ou les acides carboxyliques, de manière à pouvoir greffer de manière covalente le vecteur adéquat (Faure, 2008).

Grâce à leur fort pouvoir hydrophile, à leur flexibilité et à la neutralité du motif de répétition, les chaînes PEGylées forment un « nuage » de protection stérique hydrophile à la surface des nanoparticules, ce qui empêche les opsonines d'interagir avec les nanoparticules. L'efficacité de l'encapsulation des nanoparticules par des bras contre l'opsonisation et la phagocytose ayant été prouvée, de nombreux systèmes PEGylés ont été développés pour augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans le sang (Sheng *et al.*, 2009 ; Vonarbourg *et al.*, 2006).

Le PEG est un polymère hydrophile : le greffage covalent de chaînes PEGylées en surface des nanoparticules les rend biocompatibles et crée des forces de répulsion entre les nanoparticules et les protéines plasmatiques. Par ailleurs, Shah *et al.* ont montré que les chaînes PEGylées greffées sur les petites nanoparticules adoptaient une forme parabolique en raison de la forte surface de courbure, empêchant le groupement terminal d'être exposé aux protéines plasmatiques (Shah *et al.*, 2012). Cependant, le degré de PEGylation peut faire basculer l'équilibre entre hydrophilie et hydrophobie des nanoparticules. En effet, un fort degré de PEGylation conduit à l'instabilité et à l'agrégation des nanoparticules dans les fluides physiologiques. Il s'agit alors de trouver le meilleur compromis, pour lequel les chaînes PEGylées sont suffisamment nombreuses pour assurer une couche stérique hydrophile protectrice autour des nanoparticules, sans que les bras PEGylées ne se gênent entre eux, de manière à éviter l'instabilité des nanoparticules en milieu physiologique (Sheng *et al.*, 2009).

I.5.2.2. Fonctionnalisation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium à structure cœur-coquille par des molécules hydrophiles, couramment utilisées en IRM, en TEMP, et/ou en TEP : le DTPA et le DOTA

Comme le PEG, le DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique) et le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique) sont des molécules à caractère hydrophile (Figure I.18) (Othman *et al.*, 2011 ; Roux *et al.*, 2010 ; Corcoran *et al.*, 2010). Ces deux molécules sont d'ailleurs couramment utilisées en IRM, en TEMP et/ou en TEP comme ligands pour former des complexes avec certains ions d'intérêt comme le Gd³⁺, le Mn²⁺, l'¹¹¹In³⁺, le ^{99m}Tc⁴⁺, le ⁶⁸Ga³⁺, le ⁶⁴Cu²⁺, le ⁸⁶Y³⁺, etc. (Drahoš *et al.*, 2012 ; Wadas *et al.*, 2010 ; Hermann *et al.*, 2008).

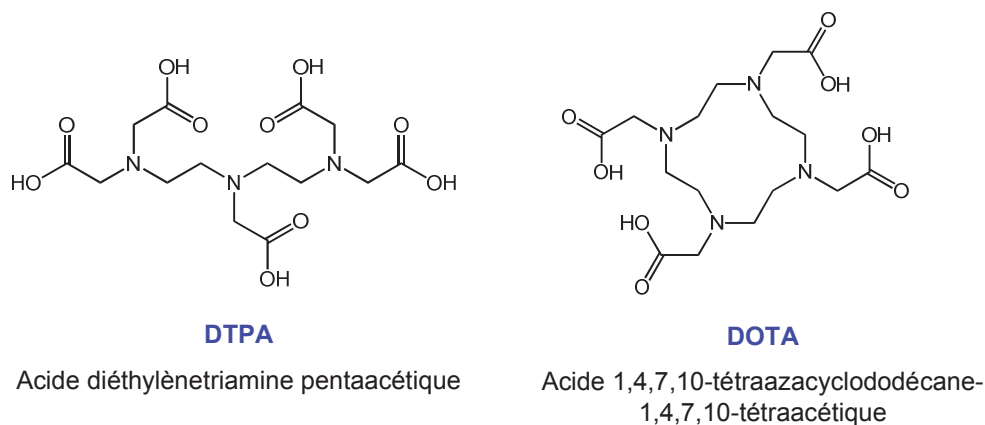


Figure I.18. Représentation du DTPA et du DOTA.

La synthèse des nanoparticules hybrides à base d'oxydes de gadolinium à structure cœur-coquille et leur fonctionnalisation avec le DTPA ou le DOTA ont été étudiées pendant la thèse d'Anna Mignot (Mignot, 2012). La fonctionnalisation, quelque soit la molécule hydrophile choisie (DTPA ou DOTA) est réalisée par couplage peptidique entre les fonctions acides carboxyliques de ces molécules et les fonctions amines primaires en surface des nanoparticules. Afin d'optimiser le rendement de greffage, la fonctionnalisation des nanoparticules est réalisée avec des formes « activées » du DTPA et du DOTA : il s'agit du DTPA-BA et du DOTA-GA (Figure I.19).

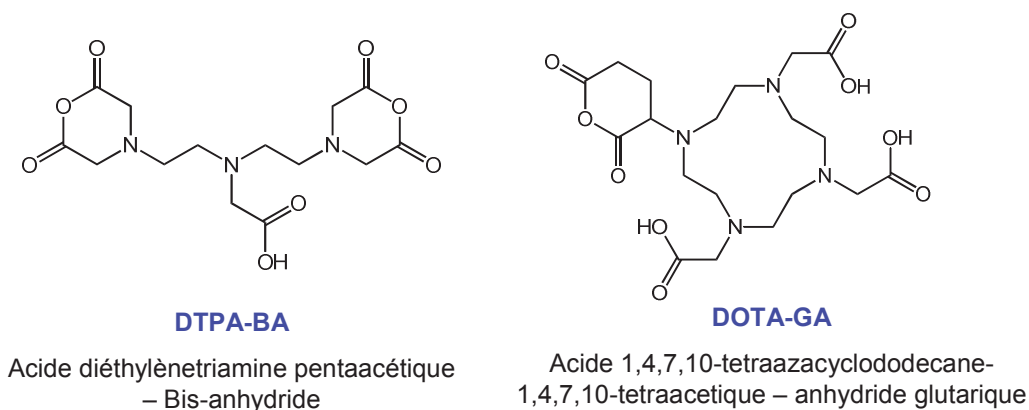


Figure I.19. Représentation du DTPA-BA et du DOTA-GA.

Dans le cas du DTPA-BA, 4 fonctions acides carboxyliques du DTPA ont été activées sous la forme de deux anhydrides. Le DTPA-BA, en présence d'amines primaires issues des nanoparticules, subit une addition nucléophile, engendrant l'ouverture du cycle et la formation d'une liaison amide. Le DTPA greffé à la nanoparticule présente alors 7 sites de coordination (3 fonctions amines tertiaires et 4 acides carboxyliques) disponibles pour la complexation d'ions métalliques d'intérêt. Le doublet non liant de l'oxygène issu de la liaison amide formée joue le rôle du 8^{ème} site de coordination ; celui-ci étant impliqué dans une délocalisation électronique, il est moins disponible.

Le DOTA-GA est un dérivé du DOTA dont un des bras acides carboxyliques est modifié et présente une anhydride. La réaction entre le DOTA-GA et les fonctions amines primaires des nanoparticules est similaire à celle avec le DTPA-BA. Lorsque le DOTA-GA est greffé à la nanoparticule, le ligand présente alors 8 sites de coordination (4 fonctions amines tertiaires et 4

fonctions acides carboxyliques) disponibles pour la complexation d'ions métalliques d'intérêt. Par conséquent, les nanoparticules fonctionnalisées avec du DOTA-GA présentent des ligands avec un site de coordination préférentiel supplémentaire pour la complexation d'autres ions par rapport aux nanoparticules fonctionnalisées avec du DTPA-BA.

Les anhydrides étant extrêmement réactifs vis-à-vis des nucléophiles, la présence d'eau conduit à leur l'hydrolyse et défavorise la formation de liaisons amides (les acides carboxyliques sont peu réactifs vis-à-vis des amines). Afin de pallier à ce problème, le DTPA-BA et le DOTA-GA sont préalablement dissous dans du DMSO anhydre puis ajoutés à la solution colloïdale de nanoparticules dans le DEG.

De manière surprenante, les nanoparticules fonctionnalisées avec le DTPA-BA ou le DOTA-GA présentent un DH moyen plus petit (2-3 nm) que les nanoparticules à structure cœur-coquille (4-5 nm), ce qui n'est pas le cas pour les nanoparticules fonctionnalisées avec le PEG (6-8 nm) (Figure I.20). Il semblerait que le DTPA et le DOTA, qui, contrairement au PEG, sont connus et fréquemment utilisés comme ligands dans la complexation d'ions Gd^{3+} pour une application en tant qu'agents de contraste pour l'IRM, jouent un rôle clé dans la diminution brutale de la taille des nanoparticules.

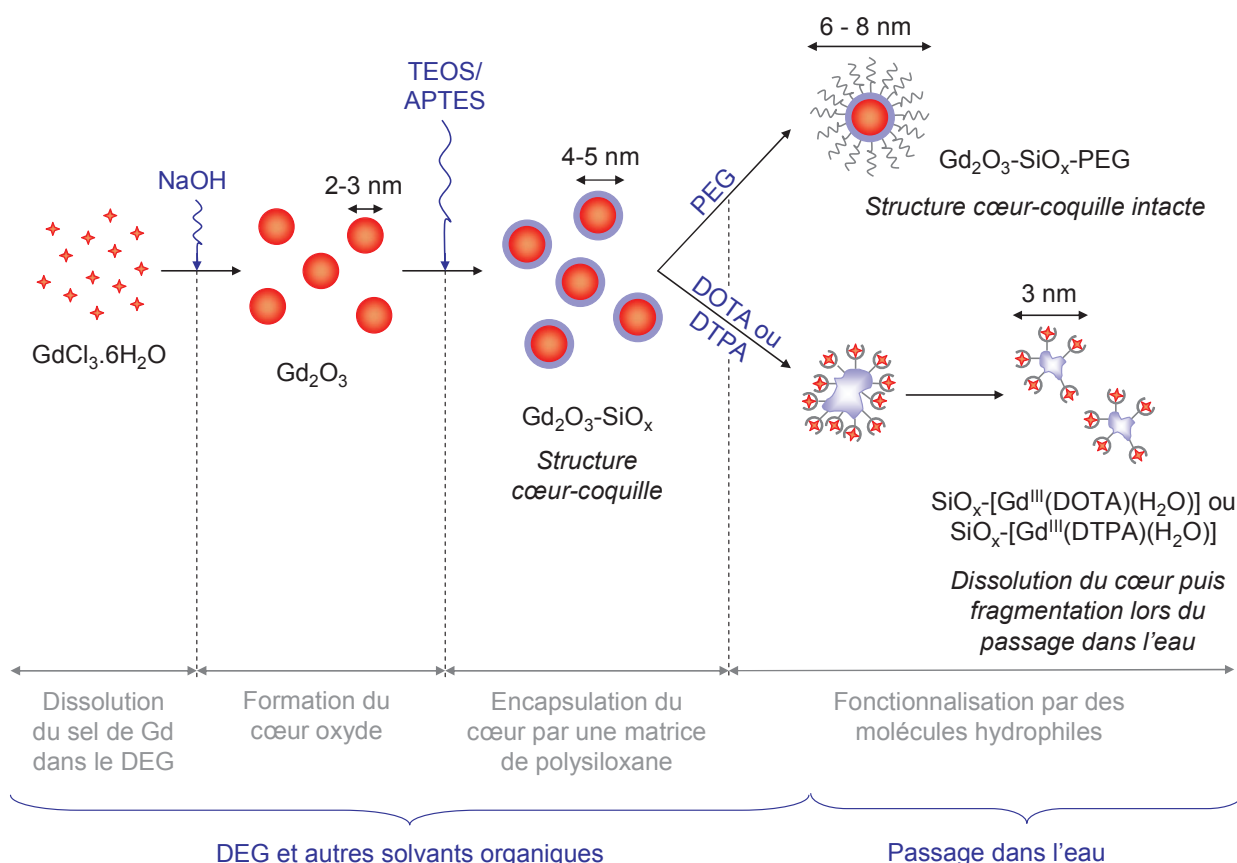


Figure I.20. Représentation des différentes étapes de synthèse des nanoparticules hybrides à base de gadolinium : synthèse du cœur oxyde, enrobage par une matrice de polysiloxane et fonctionnalisation par le PEG, le DOTA ou le DTPA.

Les travaux de thèse d'Anna Mignot ont démontré que le greffage du DTPA ou du DOTA à la surface des nanoparticules a provoqué la dissolution du cœur oxyde lors du passage des particules en milieu aqueux (étape de purification) (Mignot, 2012). De plus, la couche de polysiloxane étant

relativement fine (« GC-2Si » → 2 Si / 1 Gd), la présence d'éventuels défauts au sein de la matrice a pu favoriser la migration des ions Gd^{3+} du cœur vers l'extérieur de la nanoparticule ; ces ions sont chélatés par les molécules de DTPA ou de DOTA. La matrice de polysiloxane, alors dépourvue de tout support (absence de cœur) s'effondre sous forme de plusieurs fragments, donnant lieu à de petites nanoparticules qui seront désormais appelées « SRPs » (Small Rigid Particles). Les SRPs ne possèdent donc plus de cœur oxyde et la matrice de polysiloxane est devenue l'élément central de ces nanoparticules : elle supporte une dizaine de ligands DTPA ou DOTA, certains d'entre eux chélatant des ions Gd^{3+} , d'autres pouvant rester libres en vue d'une vectorisation ou de la complexation d'autres ions d'intérêt (Figure I.21).

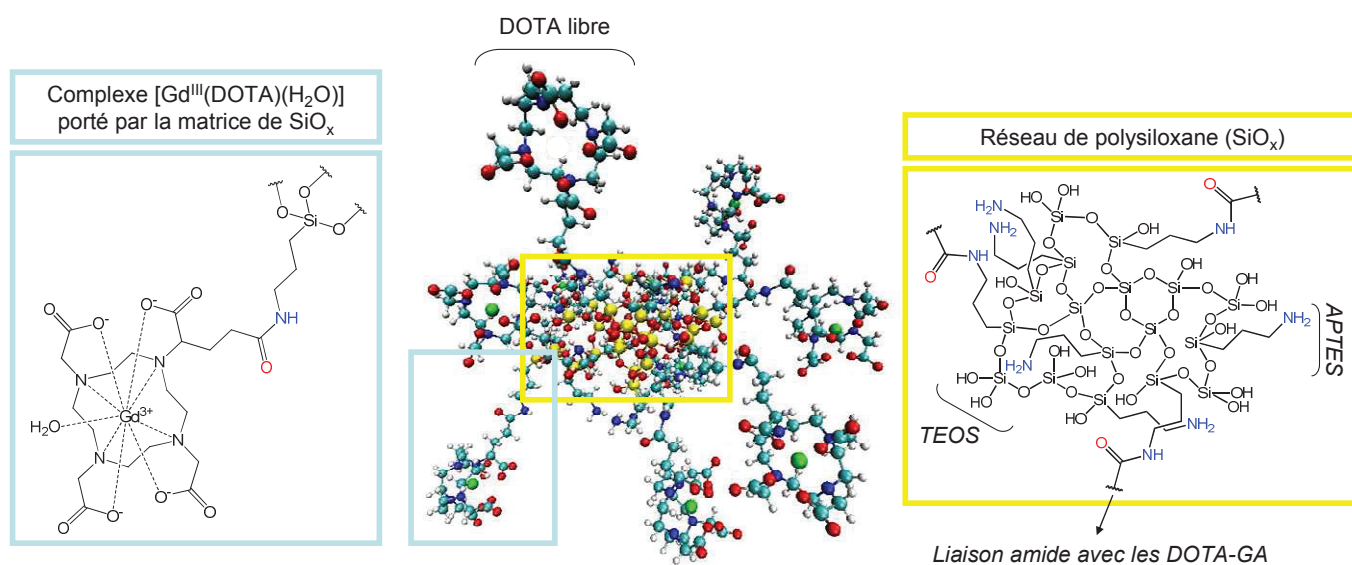


Figure I.21. Représentation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium fonctionnalisées par le DOTA-GA (SRPs). Sur la figure centrale, les atomes de Si sont en jaune, O en rouge, N en bleu, Gd en vert, H en blanc.

Les structures des nanoparticules fonctionnalisées avec le DTPA-BA ou le DOTA-GA sont semblables. Cependant, les ligands entourant les SRPs présentent 8 sites de coordination dans le cas de la fonctionnalisation avec le DOTA-GA contre 7 pour le DTPA-BA. Or, la toxicité du gadolinium dépend de la capacité des complexes à libérer des ions Gd^{3+} au sein de l'organisme, et par conséquent, des stabilités cinétique puis thermodynamique du complexe. Les ligands macrocycliques comme le DOTA sont moins sujets à la décomplexation et à la transmétallation (échange de métaux/ligands) que les ligands linéaires comme le DTPA. Par exemple, le temps de demi-vie de dissociation du complexe de gadolinium avec le DOTA est bien plus élevé que celui du complexe formé avec le DTPA ($T_{1/2} [Gd-DOTA] > 1 \text{ mois} / T_{1/2} [Gd-DTPA] = 10 \text{ min}$). Le rayon ionique de l'ion Gd^{3+} (107,8 pm) étant proche de celui de l'ion Ca^{2+} (114 pm), les ions Gd^{3+} peuvent s'interchanger avec les ions Ca^{2+} (transmétallation : $[DTPA-Gd] + Ca^{2+} \rightarrow [DTPA-Ca] + Gd^{3+}$) et inhiber l'activité de certaines enzymes et/ou affaiblir le système réticuloendothélial (Idée *et al.*, 2006). Pour ces raisons-là, les travaux de vectorisation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium ont préférentiellement été réalisés sur les nanoparticules fonctionnalisées avec le DOTA-GA.

1.5.3. Vectorisation des nanoparticules hybrides à base de gadolinium, plateformes multifonctionnelles pour l'imagerie médicale et la thérapie

Les nanoparticules hybrides à base de gadolinium sont des plateformes multifonctionnelles, prometteuses pour des applications en imagerie médicale et en thérapie : elles s'inscrivent donc dans une optique théranostique. Les SRPs sont constituées d'une matrice de polysiloxane centrale entourée d'une dizaine de ligands DOTA, certains d'entre eux chélatant un ion Gd^{3+} , d'autres pouvant éventuellement rester vacants en vue d'une vectorisation ou de la complexation d'autres ions d'intérêt. Le DH moyen final de ces nanoparticules est de $(3,5 \pm 0,5)$ nm et leur masse molaire moyenne est de $(8,5 \pm 1,0)$ kDa (Lux *et al.*, 2011) ; ces propriétés répondent aux exigences pré-requises des agents théranostiques, à savoir : (i) une longue circulation dans le sang pour une accumulation optimale au sein de la tumeur par effet EPR et (ii) une évacuation par voie rénale pour un meilleur contraste (différence de concentration) entre tissus sains et tissus tumoraux.

1.5.3.1. Nanoparticules hybrides à base de gadolinium pour l'imagerie médicale, plateformes multimodales

- IRM :

Les SRPs sont constituées d'ions paramagnétiques Gd^{3+} , connus pour leur capacité à relaxer les spins nucléaires des protons de leur entourage. Le gadolinium est un agent de contraste positif pour l'IRM, couramment utilisé en application clinique (Lee G.H. *et al.*, 2012 ; Hermann *et al.*, 2008 ; Werner *et al.*, 2008). L'efficacité de cet agent de contraste dépend de sa relaxivité longitudinale (r_1), c'est-à-dire de sa capacité à raccourcir les temps de relaxation longitudinaux des protons les entourant (Li Y. *et al.*, 2012). De nombreux complexes à base de Gd(III) sont en cours de développement afin d'augmenter leur relaxivité. Dans cette optique, la nouvelle génération d'agents de contraste pour l'IRM implique que plusieurs complexes de Gd(III) soient greffés à un support macromoléculaire comme c'est le cas des SRPs (Botta *et al.*, 2012). L'efficacité des SRPs en tant qu'agent de contraste positif pour l'IRM a d'ailleurs été démontrée : les relaxivités longitudinales (r_1) des agents de contraste commerciaux sont comprises entre 4 et 6 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 1,5 Tesla, à 37°C, tandis que la relaxivité longitudinale des SRPs est de 11,8 $mM^{-1}.s^{-1}$ dans ces mêmes conditions (Lux *et al.*, 2011). D'autre part, les SRPs ont été testées *in vivo* sur des souris males saines de type c57Bl/6J et observées par IRM à 7 Tesla (Figure I.22).

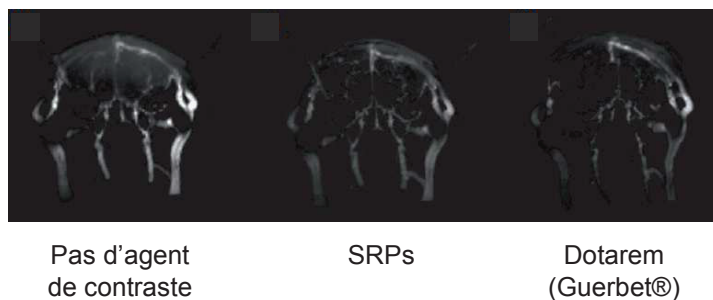


Figure I.22. Images IRM par pondération T1 de cerveaux de souris males saines de type c57Bl/6J sans agent de contraste, avec les SRPs ou avec un agent de contraste commercial : Dotarem (Guerbet®). Adaptée de Lux *et al.*, 2011.

Ces études par IRM confirment l'hypothèse de l'évacuation des SRPs par voie rénale et l'amélioration du contraste de l'image par rapport aux agents de contraste commerciaux ou à l'absence d'agent de contraste. Ce meilleur contraste est dû (i) à la relaxivité plus élevée des SRPs et (ii) au temps de résidence prolongé des SRPs, comparés aux agents de contraste commerciaux (Lux *et al.*, 2011).

- TEMP-TDM :

L'imagerie TEMP utilise des radionucléides émetteurs de rayonnements γ , comme l'indium 111 ($t_{1/2} = 67,9$ h) (Pimlott *et al.*, 2011). Les SRPs ont été marquées à l'indium 111 par complexation de l'ion $^{111}\text{In}^{3+}$ par les DOTA vacants des nanoparticules, puis injectées par intraveineuse dans des souris males saines de type c57Bl/6J (Figure I.23) (Lux *et al.*, 2011).

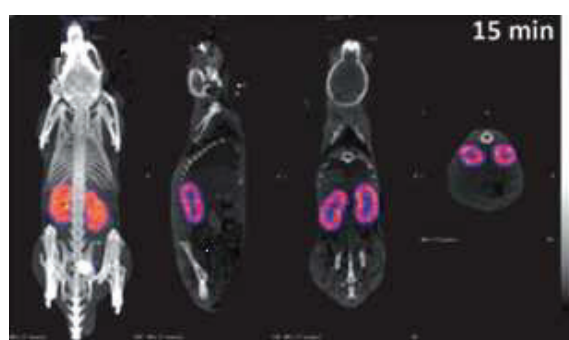


Figure I.23. Images TEMP-TDM à 15 min après injection IV des SRPs radiomarquées à l' ^{111}In sur des souris males saines de type c57Bl/6J. De gauche à droite : projection d'intensité maximale, et vues sagittale, coronale et transversale centrées sur le rein droit. Adaptée de Lux *et al.*, 2011.

Ces études par TEMP-TDM confirment à nouveau l'élimination des SRPs par voie rénale (dès 12 min après injection IV) et l'absence d'évacuation par voie hépatique (Lux *et al.*, 2011).

- Imagerie optique :

Les SRPs peuvent également être marquées par des fluorophores organiques par greffage covalent de ces derniers à la matrice de polysiloxane. Les molécules émettant des photons dans le proche-IR sont les plus adaptées pour les applications sur le vivant car elles causent moins de dommages sur les échantillons biologiques, pénètrent plus profondément dans les tissus et interfèrent peu avec l'autofluorescence de fond des tissus dans les systèmes vivants (Wagh *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2012 ; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2011 ; Paganin-Gioanni *et al.*, 2010). Les fluorophores émettant dans le proche-IR permettent de réduire l'impact de l'absorption des tissus endogènes et celui de l'autofluorescence des tissus (rapport de fluorescence tumeur/fond suffisant) et offrent ainsi la plus grande sensibilité parmi le large éventail de fluorophores commercialisés (Azhdarinia *et al.*, 2012 ; Schaafsma *et al.*, 2011).

Les SRPs ont été marquées par de la Cy5.5 (fluorophore émettant dans le proche-IR) par couplage covalent de la Cy5.5 activée sous forme d'ester NHS aux amines primaires de l'APTES, pendant l'étape d'enrobage du cœur oxyde par la matrice de polysiloxane. Les SRPs fluorescentes

ont été injectées par intraveineuse à des souris nude (swiss) femelles saines (Figure I.24) (Lux *et al.*, 2011).

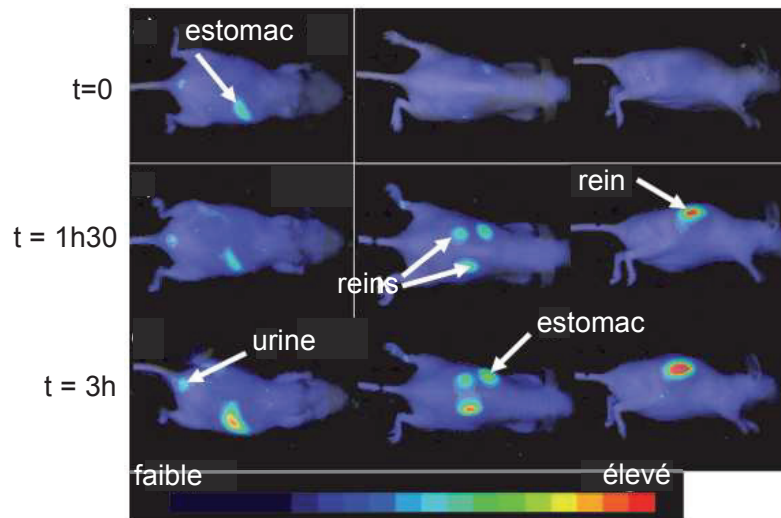


Figure I.24. Images de fluorescence sur des souris nude (swiss) femelles saines avant injection ($t = 0$), 1h30 et 3h après injection des SRPs marquées par de la Cy5.5. Adaptée de Lux *et al.*, 2011.

A nouveau, les SRPs s'éliminent par voie rénale et aucune accumulation indésirable dans le foie et les poumons n'a été détectée. La fluorescence observée dans l'estomac est due à l'alimentation des souris (Lux *et al.*, 2011).

- SRPs pour l'imagerie multimodale :

De manière surprenante, le temps de résidence moyen des SRPs, estimé entre 13 et 18 min selon les techniques d'imagerie employées, est plus élevé que celui du Dotarem®, agent de contraste commercialisé pour l'IRM ($\tau_{\text{SRP,IRM}} = 13,2 \text{ min}$ / $\tau_{\text{Dotarem®,IRM}} = 6,8 \text{ min}$). Les SRPs se limitent uniquement à la circulation dans les vaisseaux sanguins tandis que les petites molécules organiques sont sujettes à des problèmes de diffusion dans les espaces extravasculaires ; par conséquent, le volume disponible étant plus faible pour les SRPs, leur temps de résidence dans le sang devrait être plus court. Or, c'est le contraire qui a été observé : les nanoparticules hybrides à base de gadolinium circulent plus longtemps dans le sang que les petites molécules organiques, ce qui signifie (i) que l'élimination par voie rénale est plus faible pour les SRPs et (ii) que cette évacuation rénale est inversement proportionnelle à la taille des particules (Lux *et al.*, 2011). Comme espéré, les SRPs sont suffisamment petites pour être éliminées par voie rénale et suffisamment larges pour obtenir des temps de résidence dans le sang plus élevés que les petites molécules, attribuant plus de temps aux SRPs pour atteindre la tumeur et s'y accumuler.

Outre leur taille particulièrement adaptée pour un ciblage passif optimal (effet EPR), les SRPs ont démontré leur capacité à être détectées par 3 techniques d'imagerie médicale différentes, à savoir, l'IRM, la TEMP et l'imagerie optique. Ces nanoparticules sont tout à fait adaptées pour des applications en imagerie multimodale et contribuent aux recherches sur l'amélioration de la sensibilité et de la précision du diagnostic.

I.5.3.2. Nanoparticules hybrides à base de gadolinium pour un effet radiosensibilisant en radiothérapie

Le gadolinium est un élément de numéro atomique élevé ($Z = 64$). Il confère aux nanoparticules des sections transversales de capture des rayons X et γ élevées pouvant, selon l'énergie du faisceau utilisé, intensifier l'absorption photoélectrique et/ou la production d'électrons Compton ou de paires électrons/positons (Mowat *et al.*, 2011 ; Roux *et al.*, 2010). Si la biodistribution du gadolinium est contrôlée, le gadolinium est susceptible d'augmenter le dépôt de dose et son uniformité au sein du volume tumoral, ainsi que de diminuer la dose dans les tissus sains. Ce phénomène est accompagné d'une grande production de photoélectrons et d'espèces radicalaires, pour un effet plus destructeur. Plus l'absorption d'énergie est élevée, plus la quantité d'espèces réactives est importante : ce phénomène favorise à la fois une destruction plus efficace de la tumeur et la préservation des tissus sains (Le Duc *et al.*, 2011).

Les nanoparticules hybrides à base de complexes [DTPA-Gd^{III}] (PC-4Si-DTPA) ont démontré leur effet radiosensibilisant en MRT (radiothérapie par microfaisceaux X par rayonnement synchrotron) (Figure I.25). La MRT se distingue de la radiothérapie conventionnelle (larges faisceaux) par l'utilisation de gammes de faisceaux microplanaires étroits (25-100 μm), appelés « pics », séparés par des espaces microplanaires plus larges (100-400 μm), appelés « vallées » : cette géométrie exige que les profils de dose distribuée par les gammes de microfaisceaux présentent une succession de pics (forte dose) et de vallées (faible dose). Cette technique permet de mieux préserver les tissus sains malgré l'administration de doses d'irradiation plus fortes (Le Duc *et al.*, 2011).

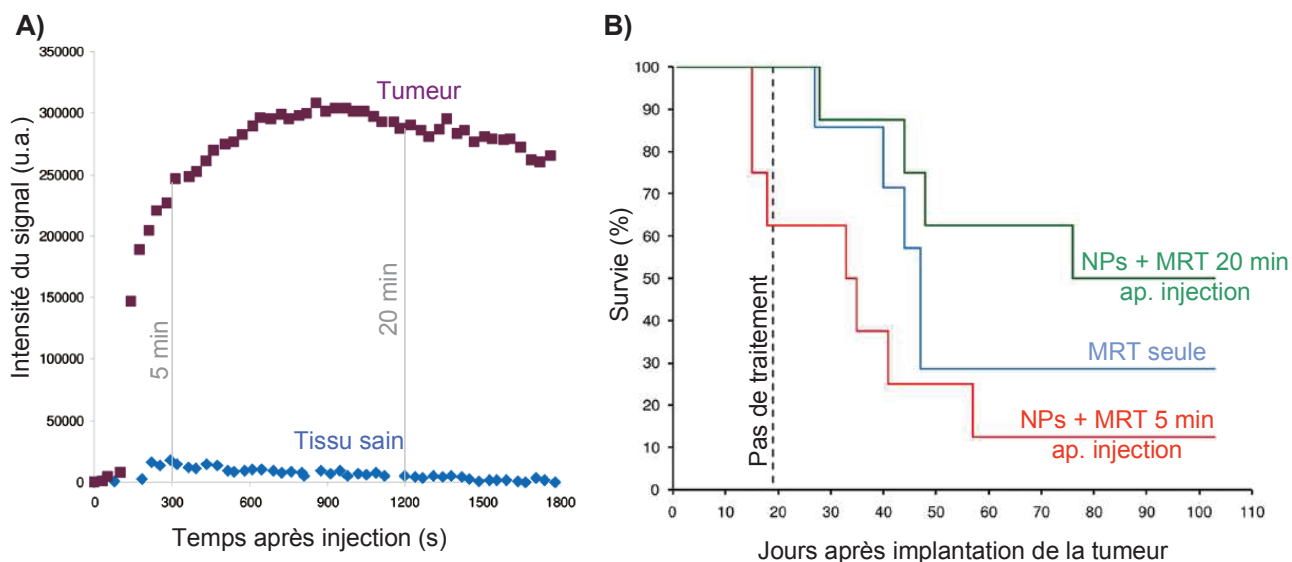


Figure I.25. (A) Evolution temporelle du signal en IRM des nanoparticules PC-4Si-DTPA au sein de la tumeur et dans une surface équivalente de tissu sain sur des rats porteurs de tumeur de type 9LGS. (B) Comparaison des courbes de survie sur des rats porteurs de tumeur de type 9LGS sans traitement (courbe noire, 4 rats), avec MRT seule (courbe bleue, 7 rats), avec nanoparticules PC-4Si-DTPA et MRT 5 min après injection des nanoparticules (courbe rouge, 8 rats) et avec nanoparticules PC-4Si-DTPA et MRT 20 min après injection des nanoparticules (courbe verte, 8 rats). Adaptée de Le Duc *et al.*, 2011.

Les nanoparticules PC-4Si-DTPA ont été injectées à des rats porteurs de tumeur de type 9LGS et ont montré un effet radiosensibilisant (meilleure courbe de survie) lorsque la MRT est réalisée 20 min après injection des nanoparticules. Cependant, lorsque la MRT est pratiquée 5 min après injection des nanoparticules, elle est néfaste pour la survie des rongeurs. Cette étude prouve qu'une accumulation maximale des nanoparticules dans la tumeur n'est pas suffisante pour être efficace ; il est également nécessaire que la concentration en nanoparticules soit minimale dans les tissus sains (Le Duc *et al.*, 2011). Enfin, cette expérience démontre que la présence de gadolinium permet d'augmenter l'effet de la radiothérapie.

Les nanoparticules GC-2Si-DOTA – choisies pour leur faible toxicité – ayant une structure semblable aux nanoparticules PC-4Si-DTPA, elles sont susceptibles de présenter des effets radiosensibilisants proches. Pour un effet radiosensibilisant optimal, la quantité de SRPs dans la tumeur et le rapport en élément radiosensibilisant entre les tissus tumoraux et les tissus sains doivent être maximums (Le Duc *et al.*, 2011). La vectorisation des SRPs pourrait augmenter cet effet radiosensibilisant en apportant un ciblage actif aux nanoparticules en supplément de leur ciblage passif.

I.5.3.3. Vectorisation des SRPs en vue de l'obtention d'un ciblage actif et présentation du travail de thèse

Le présent travail de thèse s'inscrit dans une optique d'amélioration du ciblage des SRPs pour une meilleure efficacité de ces nanoparticules en tant qu'agents d'imagerie multimodale et agents thérapeutiques. Plus exactement, nos efforts se sont concentrés sur la vectorisation des SRPs par de petites molécules organiques ou des oligopeptides pour un ciblage actif.

Comme énoncé précédemment, il existe deux stratégies de ciblage : l'une visant le ciblage des cellules tumorales, l'autre celui des cellules endothéliales de la vascularisation tumorale.

La première stratégie s'inscrit dans le cadre du projet Lantharad, portant sur les nanosondes hybrides radiosensibilisantes pour le traitement des tumeurs radiorésistantes : deux vecteurs principaux validés pour le ciblage du mélanome et du chondrosarcome ont été utilisés au cours de ce travail de thèse. Il s'agit plus particulièrement de petites molécules organiques, présentées en Figure 26. L'une appelée Iqnx (pour iodoquinoxaline) cible plus particulièrement la mélanine, une macromolécule naturellement présente dans la peau et surexprimée dans le cas du mélanome, cancer de la peau. Le second vecteur, appelé AQ (pour Amine Quaternaire), cible spécifiquement les protéoglycanes (PGs), des protéines fortement glycosylées surexprimées par le chondrosarcome, cancer du cartilage.

La seconde stratégie, visant le ciblage des cellules endothéliales de la vascularisation tumorale a également été étudiée lors de ce travail de thèse. Plus précisément, nous nous sommes intéressés au pentapeptide cyclique c(RGDfK) (Figure I.26), dont le motif RGD (Arg-Gly-Asp) est connu pour être un bon ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Celle-ci est hautement exprimée sur les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale et très peu sur le reste des cellules endothéliales et la plupart des organes sains. Elle est également surexprimée par les cellules tumorales de certains

cancers (comme le mélanome, le glioblastome, et les cancers de l'ovaire et du sein) (Lammers *et al.*, 2012 ; Ruoslahti, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010).

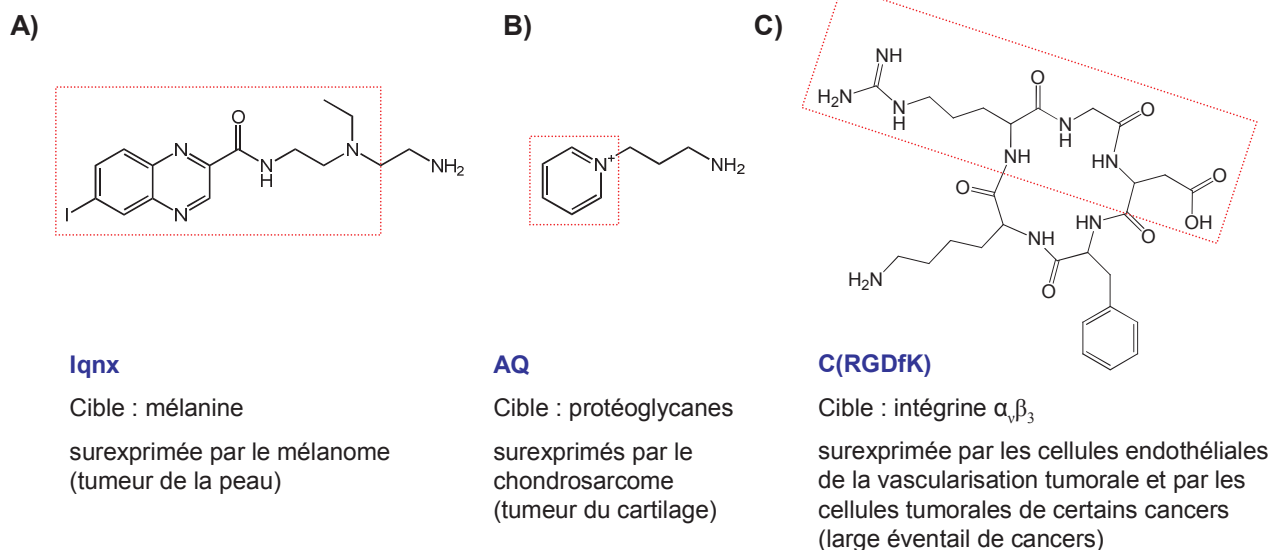


Figure 1.26. 3 vecteurs utilisés au cours du présent travail de thèse. **(A)** Iqnx : N-[2-[N-éthyl-N-(2-aminoéthyl)amino]éthyl]-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide : vecteur ciblant la mélanine, surexprimée par le mélanome (tumeur de la peau). **(B)** AQ : 1-(3-aminopropyl)pyridinium : vecteur ciblant les protéoglycanes, surexprimés par le chondrosarcome (tumeur du cartilage). **(C)** c(RGDfK) : pentapeptide cyclique ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimée par les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale et par les cellules tumorales de certains cancers (large éventail de cancers).

Les petites molécules ciblantes (< 2 kDa) sont particulièrement intéressantes dans le cadre d'un greffage sur les SRPs en vue de l'obtention d'un ciblage actif pour les raisons suivantes : ces vecteurs présentent des groupements fonctionnels ($-\text{NH}_2$) permettant des réactions de couplage chimique simples aux nanoparticules ($-\text{COOH}$ des DOTA vacants). De plus, du fait de leur petite taille, ces molécules sont peu encombrantes et permettent d'atteindre des densités de ligands en surface de nanoparticule plus élevées que dans le cas des anticorps. Enfin, ces petites molécules organiques sont moins sujettes à la dégradation au sein de l'organisme que les biomolécules (Kamaly *et al.*, 2012, Sun *et al.*, 2006).

Dans un premier temps, des stratégies de greffage covalent des vecteurs aux SRPs ont été mises en place, en tenant compte des conditions de stabilité colloïdale des nanoparticules, de solubilité des vecteurs, et des applications souhaitées (synthèses de couplage peptidique réalisées en milieu aqueux, principalement) ; elles sont présentées dans le Chapitre II.

Le couplage covalent des vecteurs aux SRPs, les analyses permettant la vérification du couplage et la quantification du nombre de vecteurs par nanoparticule et les tests de ciblage des SRPs vectorisées font l'objet d'une étude détaillée. Le cas de l'Iqnx est présenté en Chapitre III, celui l'AQ en Chapitre IV et celui du c(RGDfK) en Chapitre V. Plusieurs techniques d'analyse ont été développées pour vérifier et quantifier le greffage des vecteurs aux SRPs. Si certaines analyses ont pu être réalisées au laboratoire – comme c'est le cas de la DLS, du potentiel ζ , de l'IR, de l'absorption UV-visible, de la fluorescence, de la phosphorescence, de la relaxométrie, de l'HPLC et de l'ICP, d'autres ont été le fruit de collaborations bio-physico-chimiques – comme la spectrométrie de masse,

les profils NMRD, la FCS et l'analyse élémentaire. Enfin, les nanoparticules vectorisées ont été testées *in vitro* et *in vivo* et ont fait l'objet de nombreuses collaborations pour la validation du ciblage actif des SRPs, notamment pour le BIAcore® (technique utilisant le principe de résonance plasmon de surface), la FCS, la cytométrie de flux, la microscopie confocale et les nombreux tests *in vivo* sur le petit animal.

Chapitre II

*Etudes de pré-vectorisation des SRPs :
Optimisation des réactions de couplage peptidique et
évaluation de l'accessibilité des sites de greffage*

II. Etudes de pré-vectorisation des SRPs : optimisation des réactions de couplage peptidique et évaluation de l'accessibilité des sites de greffage

II.1. REACTION DE COUPLAGE PEPTIDIQUE 96

II.1.1. GENERALITES	97
II.1.2. AGENTS DE COUPLAGE	97
II.1.3. CONDITIONS DE LA REACTION DE COUPLAGE PEPTIDIQUE	98
II.1.4. REACTIONS DE COUPLAGE PEPTIDIQUE DE PETITES MOLECULES AUX SRPs – STRATEGIES DE SYNTHESE	99
II.1.4.1. CHOIX DU SOLVANT	99
II.1.4.2. CONCENTRATION	99
II.1.4.3. OPTIMISATION DU PH DE LA REACTION	100
II.1.4.4. AJOUT D'IONS Gd ^{III} POUR « REMONTER LES SRPs EN Gd »	100
II.1.4.5. PARTIE EXPERIMENTALE : MODELES DE PROTOCOLES DE COUPLAGE PEPTIDIQUE DE PETITES MOLECULES AUX SRPs	105

II.2. ESTIMATION DU NOMBRE DE LIGANDS DOTA VACANTS PAR NANOPARTICULE 107

II.2.1. PRINCIPE GENERAL	107
II.2.1.1. PRINCIPE DE LA LUMINESCENCE	107
II.2.1.2. LUMINESCENCE DES LANTHANIDES	108
II.2.1.3. PRINCIPE DE L'ESTIMATION DU NOMBRE DE LIGANDS DOTA VACANTS PAR NANOPARTICULE	110
II.2.2. PARTIE EXPERIMENTALE	111

II.3. ETUDE DE L'ACCESSIBILITE DES FONCTIONS AMINES PRIMAIRES DU RESEAU DE POLYSILOXANE 113

II.3.1. CHOIX DU FLUOROPHORE POUR FONCTIONNALISER LES SRPs VIA LES FONCTIONS AMINES PRIMAIRES DU RESEAU DE POLYSILOXANE	113
II.3.1.1. FLUORESCENCE POUR LA BIOLOGIE – GENERALITES	114

II.3.1.2. INTERET DES FLUOROPHORES EMETTANT DANS LE PROCHE IR POUR L'IMAGERIE DE FLUORESCENCE	114
II.3.1.3. IMAGERIE PAR FLUORESCENCE – APPLICATIONS ET PERSPECTIVES	115
II.3.1.4. PRESENTATION DES CYANINES ET CHOIX DE LA CY5.5	118
II.3.2. GREFFAGE DE LA CY5.5 AUX NANOPARTICULES ET CARACTERISATIONS	119
II.3.2.1. REALISATION D'UNE GAMME DE NANOPARTICULES FLUORESCENTES – PARTIE EXPERIMENTALE	119
II.3.2.2. RENDEMENTS DE GREFFAGE DES NANOPARTICULES FLUORESCENTES	120
II.3.2.3. ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES SRPs FLUORESCENTES PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCE	121
II.3.2.4. ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES SRPs FLUORESCENTES PAR ICP-OES	122
II.3.2.5. CONFIRMATION DU CIBLAGE PASSIF DES SRPs FLUORESCENTES PAR EFFET EPR	124
II.4. CONCLUSION	125

Les nanosystèmes multifonctionnels théranostiques, combinant ciblage, imagerie et thérapie, se déclarent comme de puissants outils émergents et présentent d'indéniables perspectives en termes de lutte contre le cancer. L'utilisation de nanosystèmes multifonctionnels pour une détection plus précoce du cancer, une thérapie plus efficace et/ou un contrôle de la progression du cancer est un concept à l'origine d'un intérêt croissant en oncologie (Crielaard *et al.*, 2012 ; Abeylath *et al.*, 2011).

L'une des stratégies pour améliorer considérablement l'efficacité clinique de tels agents est le ciblage actif. Au cours de la dernière décennie, les avancées concernant la compréhension de la biologie de signalisation cellulaire ont permis d'introduire sur le marché de nouveaux traitements rationnellement conçus pour le ciblage de facteurs moléculaires spécifiques surexprimés par la tumeur ou impliqués dans sa croissance. En agissant de manière plus sélective sur les cellules cancéreuses, les agents vectorisés d'imagerie, de thérapie ou théranostiques voient leur efficacité augmenter et, dans le cas des agents thérapeutiques, leur toxicité diminuer. L'utilisation de ligands ciblant aidant ces agents à s'accumuler dans la tumeur et à y rester augmente leur spécificité pour le tissu ciblé et réduit davantage les risques liés à l'exposition systémique (Crielaard *et al.*, 2012 ; Soria *et al.*, 2011).

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la vectorisation des SRPs décrites dans le Chapitre I par des ligands non-anticorps de petite taille (peptides ou molécules organiques < 10 kDa), par opposition aux protéines (anticorps et leurs fragments) et aux acides nucléiques (aptamères) (My Cancer Genome ; Lammers *et al.*, 2012 ; Ruoslahti, 2012 ; Kamaly *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2012 ; Danhier *et al.*, 2010).

Le présent travail de thèse porte sur le greffage covalent de peptides ou de molécules organiques aux SRPs afin d'ajouter une ou plusieurs fonctionnalité(s) à ces dernières. La fonctionnalisation des SRPs par les trois vecteurs décrits dans le Chapitre I permet de rendre les nanoparticules spécifiques de la cible visée, tandis que leur fonctionnalisation par des fluorophores organiques, et plus particulièrement la Cyanine 5.5 (Cy5.5), offre la possibilité d'un suivi *in vitro* et *in vivo* des SRPs par imagerie optique. Ces molécules présentent des fonctions terminales de type amine primaire ou acide carboxylique (voire acide carboxylique activé).

Le greffage d'une molécule possédant une fonction amine primaire terminale est réalisé sur une des quatre fonctions acides carboxyliques des DOTA, tandis que le greffage d'une molécule disposant d'une fonction acide carboxylique terminale s'effectue sur une fonction amine primaire issue du réseau de polysiloxane. La Figure II.1 présente les deux modes de greffage des molécules sélectionnées possédant les fonctions terminales modifiables de type amine primaire ou acide carboxylique.

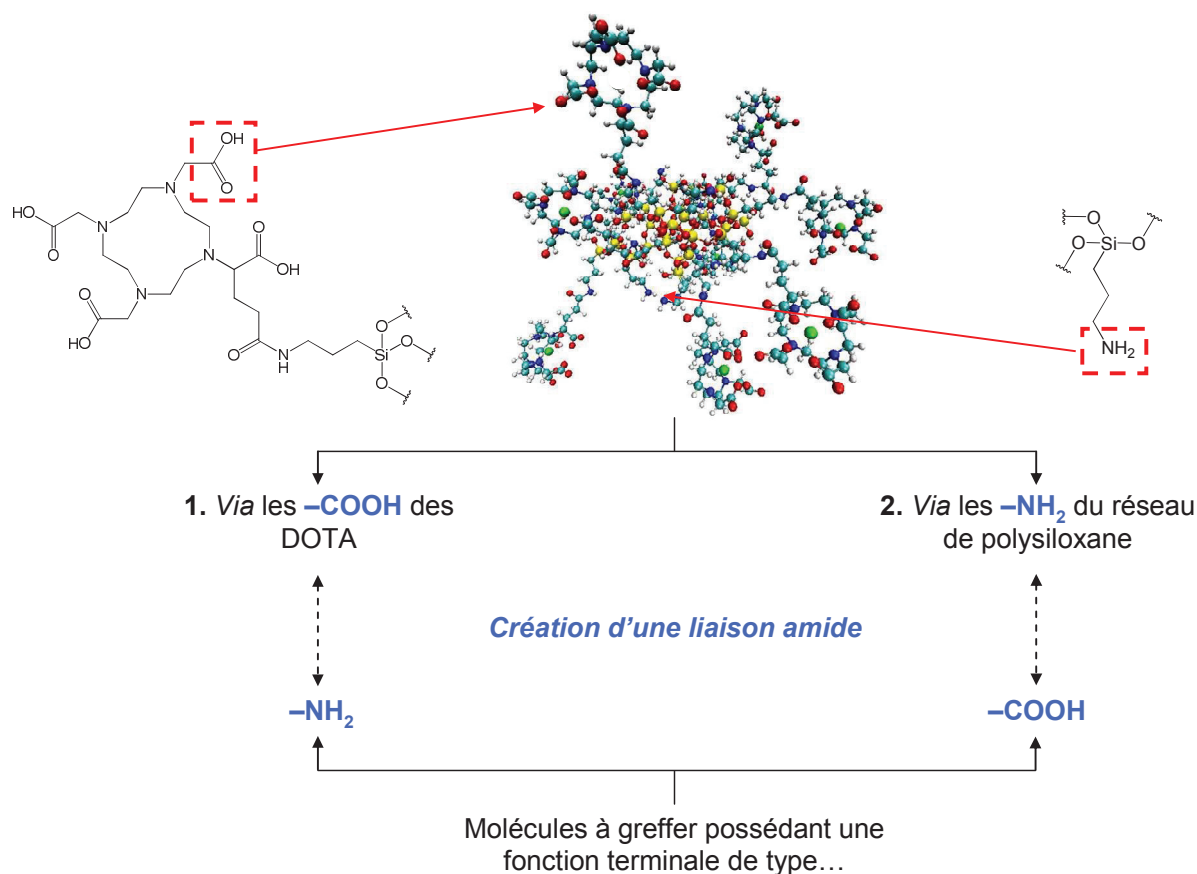


Figure II.1. Représentation des deux approches possibles pour la vectorisation d'une SRP avec des molécules possédant les fonctions terminales sélectionnées, à savoir : amine primaire ou acide carboxylique.

Dans les deux cas, la réaction entre une amine primaire et un acide carboxylique aboutit à la formation d'une liaison amide et à l'élimination d'une molécule d'eau. Cette réaction de couplage peptidique est réalisée par activation de l'acide carboxylique, que nous développerons dans la première partie de ce chapitre. Les deuxième et troisième parties de ce chapitre seront quant à elles consacrées à l'estimation du nombre de sites de greffage accessibles à la surface des SRPs.

II.1. Réaction de couplage peptidique

Récemment, le champ de la bioconjugaison s'est élargi de façon considérable : il existe aujourd'hui de nombreuses possibilités pour conjuguer des entités apportant une fonctionnalité aux nanoparticules (Yu *et al.*, 2012 ; Hermanson, 2008). Weissleder *et al.* ont, par exemple, dressé une bibliothèque recensant les différentes méthodes de modification de surface de nanoparticules magnéto-fluorescentes présentant des fonctions amines primaires par de petites molécules possédant des fonctions réactives terminales de type anhydride, amine, hydroxy, carboxy, thiol et époxyde sur (Sun *et al.*, 2006). Nous nous sommes inspirés de l'une d'entre elles, à savoir le couplage d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine, pour greffer les molécules désirées sur les SRPs.

II.1.1. Généralités

Un acide carboxylique, en présence d'une amine, forme rapidement un carboxylate d'ammonium selon la réaction acido-basique suivante (1) :



L'amine primaire, lorsqu'elle se protonne, perd son caractère nucléophile (perte du doublet non-liant : l'addition nucléophile sur l'acide carboxylique n'est plus possible). Le carboxylate d'ammonium formé met un terme à la réaction de condensation.

Certains sels d'ammonium, chauffés à haute température, peuvent néanmoins se déshydrater et donner lieu à la formation d'amides, comme c'est le cas pour l'éthanamide (2).

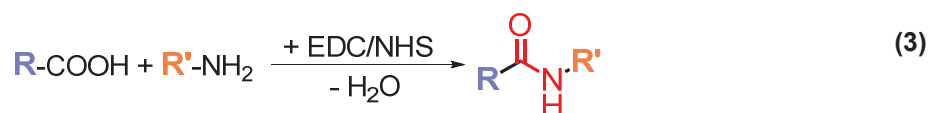


Cette méthode est rarement suivie car elle nécessite de hautes températures de chauffage et par conséquent, des solvants organiques à haut point d'ébullition. De plus, elle n'est pas compatible avec tous les sels d'ammonium. Des méthodes plus adéquates pour la préparation d'amides ont été développées et décrites par Hermanson (Hermanson, 2008).

II.1.2. Agents de couplage

Les plus petits agents de couplage créés pour la bioconjugaison sont appelés « agents de réticulation de taille nulle » (zero-length crosslinkers) (Hermanson, 2008). Ces composés interviennent dans les réactions de couplage peptidique pour la formation de liaisons sans ajout d'atome ou de bras espaceur.

Les carbodiimides font partie de cette famille d'agents de couplage et permettent la création de liaisons amides par condensation d'amines primaires avec des acides carboxyliques. L'EDC (chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) est le carbodiimide le plus répandu. Utilisé dans les procédés de conjugaison avec le NHS (N-hydroxysuccinimide), il est pratiquement universel ; le couple EDC/NHS représente le couple d'agents d'activation le plus couramment employé dans le monde pour la bioconjugaison (eq 3) (Hermanson, 2008).



Le schéma réactionnel du couplage peptidique d'une amine primaire avec un acide carboxylique activé par le couple EDC/NHS est proposé en Figure II.2.

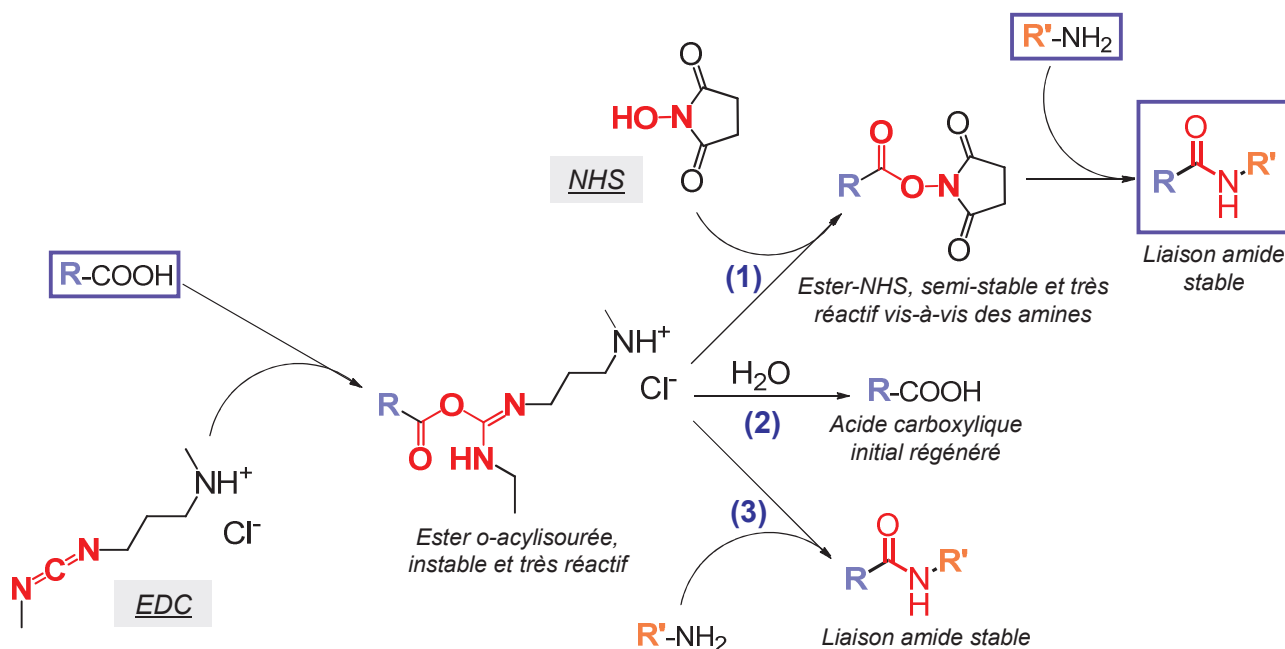


Figure II.2. Schéma réactionnel du couplage peptidique par activation de l'acide carboxylique avec le couple EDC/NHS.

L'EDC réagit avec l'acide carboxylique pour former un intermédiaire o-acylisouré instable et hautement réactif, susceptible de réagir à toute attaque nucléophile. L'amine primaire peut alors directement réagir avec cet intermédiaire pour former une liaison amide stable (Figure II.2, voie (3)). Cependant, les atomes d'oxygène de l'eau peuvent également jouer le rôle de nucléophile, conduisant à l'hydrolyse de l'ester o-acylisouré puis à la régénération de l'acide carboxylique initial (Figure II.2, voie (2)). Ces deux réactions peuvent se produire parallèlement : si l'amine primaire ne réagit pas avec l'intermédiaire o-acylisouré avant qu'il ne s'hydrolyse, le couplage peptidique en question ne peut plus avoir lieu. Afin de palier cette réaction secondaire non désirée, un deuxième agent de couplage est introduit dans le milieu : il s'agit du NHS (Figure II.2, voie (1)). L'ajout de NHS permet de transformer l'ester o-acylisouré en ester-NHS, dont la réactivité est comparable à celle des anhydrides (couplage rapide avec l'amine primaire), et ainsi d'augmenter considérablement le rendement de la réaction de couplage peptidique. Le produit final de cette réaction en deux étapes conduit à la formation d'une liaison amide stable.

II.1.3. Conditions de la réaction de couplage peptidique

Le pH de la solution affecte fortement la réaction de couplage peptidique. Les esters NHS ont des temps de demi-vie de l'ordre de quelques heures à pH physiologique (Hermanson, 2008). Leur réactivité vis-à-vis des amines augmente avec le pH, cependant, c'est aussi le cas de la réaction concurrente d'hydrolyse. Pour optimiser le rendement du couplage et minimiser les effets de l'hydrolyse, les nanoparticules et molécules à coupler doivent être maintenues aux concentrations les plus élevées possibles, de manière à augmenter les opportunités de rencontre entre les fonctions esters activées et les amines primaires, plutôt qu'avec les molécules d'eau (Hermanson, 2008).

Nakajima *et al.* ont démontré par ailleurs que le pH devait être compris entre 3,5 et 4,5 pour favoriser l'étape d'activation des fonctions acides carboxyliques (sous forme d'ions carboxylates) alors que des pH plus élevés sont nécessaires pour la formation de la liaison amide, de manière à éliminer la forme protonée de l'amine (Nakajima *et al.*, 1995). Typiquement, cette deuxième étape de la réaction (étape de couplage peptidique) est réalisée à pH physiologique (pH 7,4) (Hermanson, 2008).

II.1.4. Réactions de couplage peptidique de petites molécules aux SRPs – Stratégies de synthèse

II.1.4.1. Choix du solvant

Les synthèses de couplage peptidique sont réalisées à partir de SRPs lyophilisés. La première étape consiste nécessairement à redisperser les nanoparticules dans l'eau.

Les SRPs vectorisées étant destinées à être testées *in vitro* ou *in vivo*, l'eau apparaît comme le solvant le plus approprié pour les réactions de couplage peptidique de petites molécules aux SRPs.

Lorsque les molécules à greffer sont difficilement solubles dans l'eau ou lorsqu'elles sont présentées sous forme d'esters activés (esters NHS), elles sont préalablement dissoutes dans du DMSO (DMSO anhydre si ester activés) avant d'être ajoutées à la solution aqueuse de SRPs. Le DMSO sera éliminé ultérieurement, lors de la purification des nanoparticules, de manière à assurer la biocompatibilité *in vivo* des SRPs.

II.1.4.2. Concentration

Des études de vieillissement des SRPs en solution aqueuse à pH physiologique à 37°C ont permis d'évaluer la limite de concentration en Gd^{III} pour laquelle les SRPs restaient stables (Figure II.3) (Mignot, 2012).

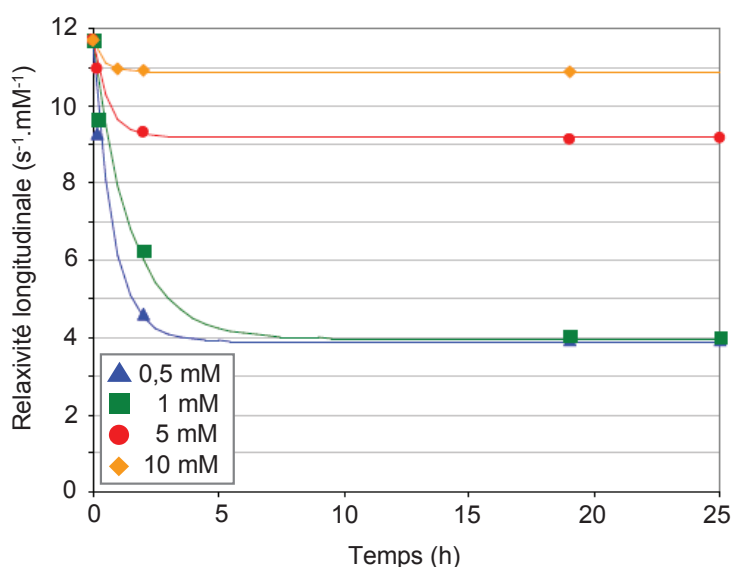


Figure II.3. Relaxivité longitudinale (r_1) des protons de l'eau en présence de SRPs en fonction du temps et de la concentration en Gd^{III} , à pH 7,4, à 37°C, à 1,4 Tesla. Adaptée de Mignot, 2012.

La relaxivité longitudinale (r_1) des protons de l'eau en présence de SRPs est mesurée en fonction du temps à des concentrations en Gd^{III} différentes ($[Gd^{III}] = 0.5, 1, 5$ et 10 mM). Pour les solutions à 5 et 10 mM en Gd^{III} , la relaxivité longitudinale diminue les deux premières heures ($r_{1_{2h}} = 9,2$ et $10,9$ $s^{-1}.mM^{-1}$ respectivement, tandis que : $r_{1_{init.}} = 11,7$ $s^{-1}.mM^{-1}$) puis reste constante. En revanche, pour les solutions à 0,5 et 1 mM en Gd^{III} , la relaxivité longitudinale diminue jusqu'à une valeur de $3,9$ $s^{-1}.mM^{-1}$, relativement similaire à celle des complexes $[Gd^{III}(DOTA)]$ isolés. Cette chute de relaxivité traduit l'effondrement de la couche de polysiloxane et l'éclatement de la nanoparticule en plusieurs fragments, d'où une relaxivité longitudinale proche de celle des complexes $[Gd^{III}(DOTA)]$ isolés. Les SRPs doivent donc être maintenues à des concentrations en gadolinium supérieures à 5 mM pour éviter leur dégradation.

De plus, les effets de l'hydrolyse des intermédiaires actifs formés peuvent être minimisés lorsque les réactifs à coupler sont maintenus à de fortes concentrations vis-à-vis du solvant (*cf.* partie II.1.3.). Ainsi, les réactions de couplage peptidique sont réalisées à des concentrations en SRPs et en petites molécules élevées. Cependant, une trop forte concentration peut favoriser l'agrégation des nanoparticules entre elles et empêcher le couplage peptidique. Les SRPs sont généralement redispersées à une concentration équivalente à 100 mM en élément gadolinium et la concentration en ions Gd^{III} est comprise entre 50 et 100 mM lors des réactions de couplage peptidique et reste supérieure à 10 mM lors de l'étape de purification.

II.1.4.3. Optimisation du pH de la réaction

Les études de Nakajima *et al.* ont défini les conditions de pH les plus adaptées pour les deux étapes d'un couplage peptidique classique : l'activation des fonctions acides carboxyliques est favorisée à pH compris entre 3,5 et 4,5 ; au contraire, la forme protonée de l'amine est défavorable à la formation de la liaison amide et cette deuxième étape nécessiterait donc des pH bien plus élevés (Nakajima *et al.*, 1995). Or, les SRPs se dégradent lorsque le pH de la solution est supérieur à 9 (dissolution de la matrice de polysiloxane) (Mignot, 2012). Ainsi, lors des réactions de couplage peptidique, le pH sera maintenu autour de 4,5 pour l'étape d'activation des fonctions carboxylates tandis que la deuxième étape aboutissant à la création de la liaison amide sera réalisée à pH physiologique.

II.1.4.4. Ajout d'ions Gd^{III} pour « remonter les SRPs en Gd »

Les complexes paramagnétiques de type $[Gd^{III}(DOTA)]$ sont des agents de contraste positifs pour l'IRM car ils augmentent le taux de relaxation longitudinale des protons de l'eau les entourant (Lee G.H. *et al.*, 2012 ; Hermann *et al.*, 2008 ; Werner *et al.*, 2008 ; Idée *et al.*, 2006 ; Lu *et al.*, 2003).

- Principe de l'IRM :

Le principe de l'IRM repose sur la relaxation des moments magnétiques de spin des atomes d'hydrogène contenus dans l'organisme (issus de l'eau et, moins généralement, des tissus adipeux).

En présence d'un champ magnétique externe, le moment magnétique de spin (μ) des protons cherche à s'aligner au champ magnétique appliqué (Figure II.4.).

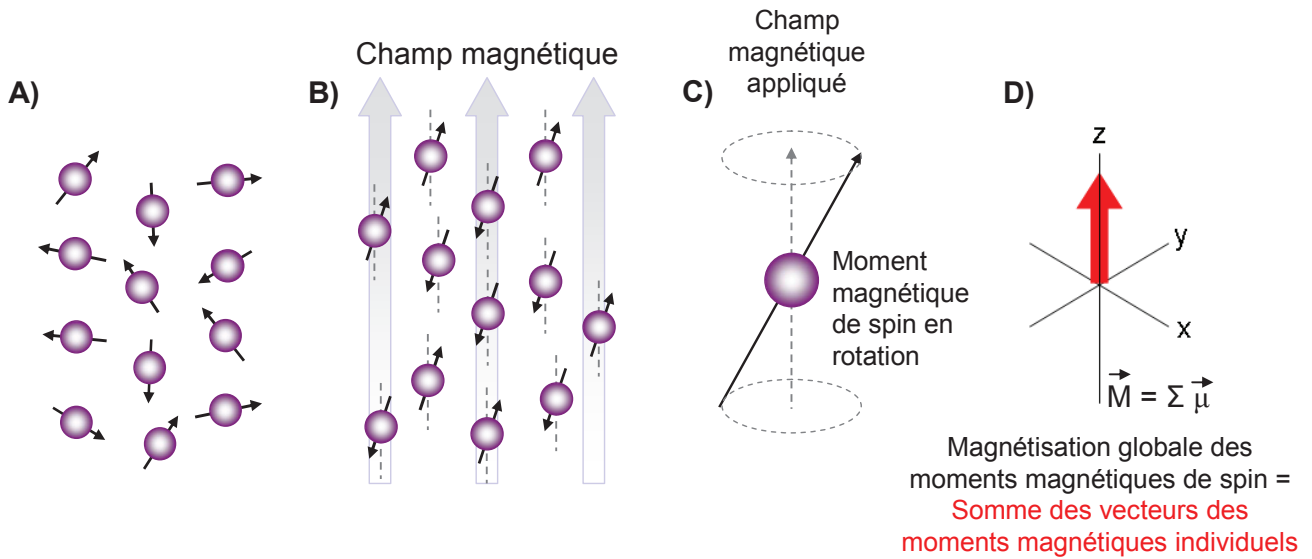


Figure II.4. (A) Représentation des moments magnétiques de spin de protons pivotant autour de leur axe, de manière aléatoire. (B) Représentation des moments magnétiques de spin de protons en présence d'un champ magnétique : ils cherchent à s'aligner au champ magnétique, parallèlement ou antiparallèlement. (C) Représentation de la polarisation partielle d'un moment magnétique de spin d'un proton : en présence d'un champ magnétique externe, il tend à s'aligner au champ appliqué et forme un angle avec ce dernier. (D) Représentation de la résultante de la magnétisation des moments magnétiques de spin de protons. Adaptée de [Understanding the basic principles of NMR](#).

En IRM, l'objectif est de perturber cet alignement des moments magnétiques de spin des protons avec une série d'impulsions de fréquence radio (Figure II.5).

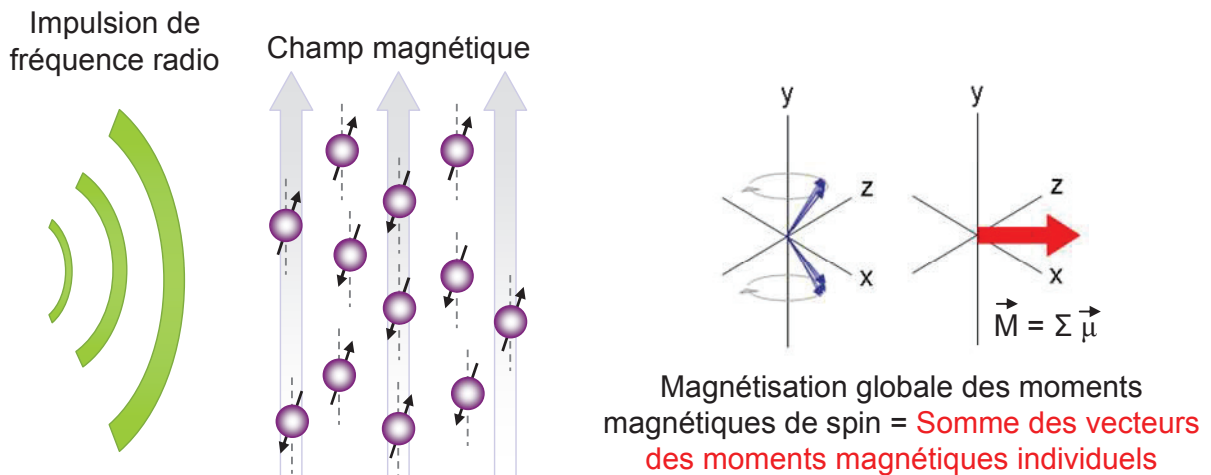


Figure II.5. Représentation du changement de direction de la résultante globale des protons due à l'ajout d'une impulsion de fréquence radio en plus du champ magnétique appliqué aux moments magnétiques de spin des protons. Adaptée de [Understanding the basic principles of NMR](#).

Lorsque l'impulsion de fréquence radio se termine, les moments magnétiques de spin se « relaxent » et reprennent leur position d'équilibre en restituant l'énergie sous la forme d'un signal

radiofréquence (sinusoïde amortie) recueillie par une antenne dans le plan xy (Figure II.6). On distingue les composantes longitudinales des composantes transversales.

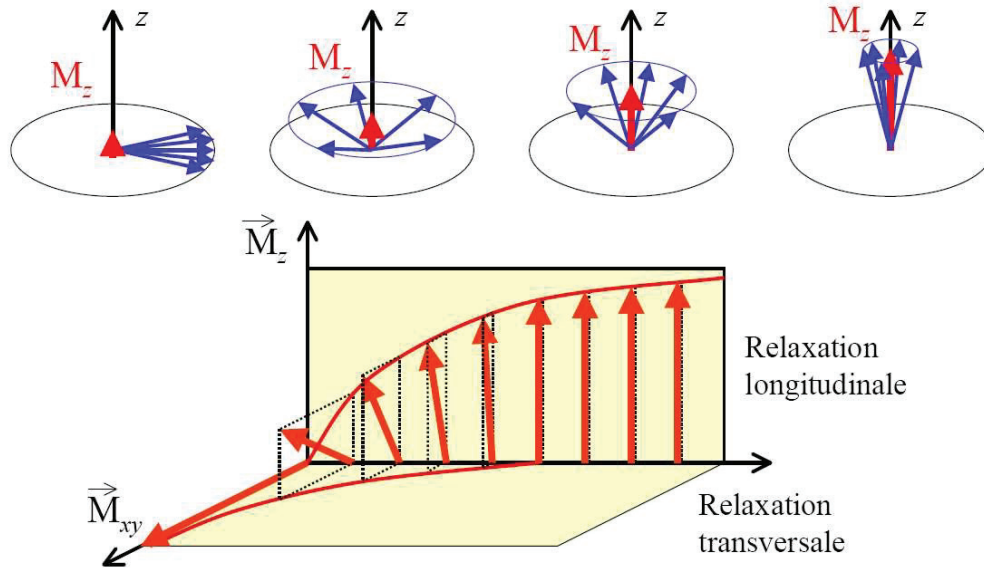


Figure II.6. Représentation du retour à la position d'équilibre des moments magnétiques de spin des protons. Le temps de relaxation longitudinale T_1 représente le temps au bout duquel 63 % de l'aimantation maximale est regagnée après une impulsion à 90° . Le temps de relaxation transversale T_2 représente le temps au bout duquel 63 % de l'aimantation transversale maximale est perdue après une impulsion à 90° . Adap tée du [Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire](#).

C'est le paramètre de relaxation des moments magnétiques de spin des protons qui est responsable du contraste obtenu sur l'image. En IRM, ce n'est donc pas le lieu ou la manière dont l'énergie est absorbée par les protons, mais bien la vitesse de relaxation de leur moment magnétique de spin qui est primordiale. Le contraste dépend des temps de relaxation longitudinal (T_1) et transversal (T_2), correspondant à la relaxation des composantes magnétiques longitudinale et transversale, mais aussi de l'environnement des protons, susceptible d'affecter leur relaxation, et bien sûr, de la composition en eau des tissus ([Understanding the basic principles of NMRI](#)).

Grâce à ses sept électrons non appariés ($S = 7/2$), le gadolinium(III) présente un moment magnétique élevé ($\mu = 7,9 \text{ BM}$) et un temps de relaxation des spins électroniques suffisamment long pour transmettre l'information magnétique aux molécules d'eau environnantes ; ces propriétés en font un candidat idéal comme agent de relaxation des moments magnétiques de spin des protons ([Hermann et al., 2008](#)). L'efficacité d'un agent de contraste dépend de sa relaxivité (r), c'est-à-dire de sa capacité à raccourcir les temps de relaxation des moments magnétiques de spin des protons les entourant. La relaxivité r_i d'un agent de contraste est inversement proportionnelle à sa concentration (eq 4) ([Li Y. et al., 2012](#) ; [Nonat, 2007](#)) :

$$\left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{obs.}} = \left(\frac{1}{T_i} \right)_{\text{H}_2\text{O}} + r_i C \quad (i = 1,2) \quad (4)$$

où r_i est la relaxivité exprimée en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, C est la concentration réelle en agent de contraste (mM) et, $T_{i,\text{obs}}$ et $T_{i,\text{H}_2\text{O}}$ sont les temps de relaxation des moments magnétiques de spin des protons (s)

en présence et en l'absence de l'agent de contraste, respectivement. La relaxivité dépend du champ magnétique appliqué et de la température ; elle est généralement donnée avec la fréquence du champ magnétique et la température lors de la mesure.

De nombreux agents de contraste ont été développés au cours de ces 25 dernières années et plusieurs sont commercialisés. Ils sont classés en deux catégories : ils sont de type T_1 ou de type T_2 selon qu'ils affectent majoritairement la vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$) ou transversale ($1/T_2$). Lorsque la vitesse ($1/T_i$) augmente, l'intensité du signal augmente pour les agents de contraste de type T_1 , dits positifs, et diminue pour les agents de contraste de type T_2 , dits négatifs (Nonat, 2007). Les complexes à base d'ions Gd^{III} sont des agents de contraste positifs.

De nombreux complexes à base de Gd^{III} sont perpétuellement en voie de développement afin d'obtenir de meilleures relaxivités. Dans cette optique, la nouvelle génération d'agents de contraste pour l'IRM implique que plusieurs complexes de Gd^{III} soient greffés à un support macromoléculaire comme les nanoparticules, les protéines, les polymères, les dendrimères, les micelles, les liposomes, les virus, les oxydes de métal, les zéolites ou encore les silices mésoporeuses (Botta *et al.*, 2012). Ces études portent sur l'optimisation des paramètres suivants, dont les principaux sont illustrés en Figure II.7 (Hermann *et al.*, 2008) :

- nombre d'hydratation q (nombre de molécules d'eau contenues dans la sphère de coordination interne de l'ion métallique) : $q > 1$ pour une meilleure relaxivité ;
- nombre d'hydratation de la seconde sphère de coordination q_{ss} : augmentation de q_{ss} par utilisation de ligands hydrophiles ;
- temps moyen de résidence des molécules d'eau τ_M : augmentation de τ_M pour des complexes chargés négativement et dont les ligands sont flexibles et contiennent des bras provoquant l'encombrement stérique du complexe près des molécules d'eau ;
- temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la seconde sphère de coordination (solvant) τ_{Mss} ;
- temps de corrélation rotationnel τ_R : augmentation de τ_R par utilisation d'agglomérats rigides et par augmentation de la masse globale de l'agent de contraste ;
- temps de relaxation électronique T_{ie} le plus long possible par utilisation de ligands symétriques ;

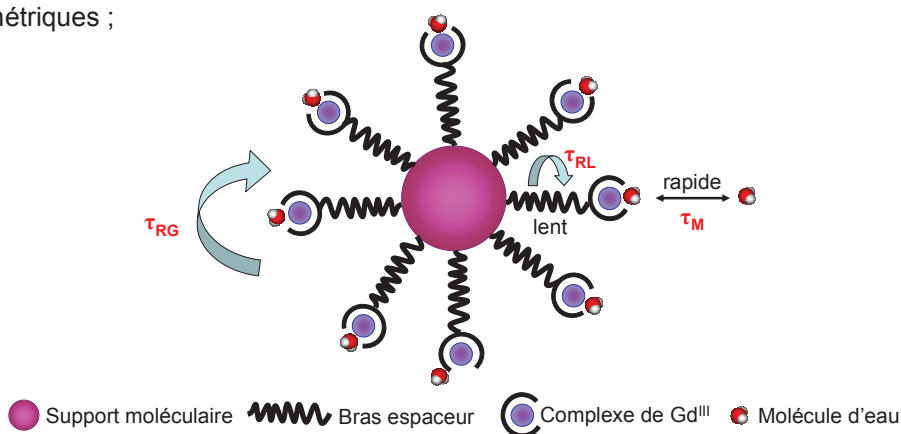


Figure II.7. La relaxivité d'un complexe de Gd^{III} dépend principalement du temps de relaxation rotationnel global τ_{RG} , du degré de mouvement interne τ_{RL} et du taux d'échange $1/\tau_M$ des molécules d'eau de la sphère de coordination interne du Gd^{III} .

Adaptée de Botta *et al.*, 2012.

Une approche relativement simple pour augmenter la concentration locale d'ions Gd^{III} consiste à réaliser un cluster composé de plusieurs complexes de Gd^{III} (Langereis *et al.*, 2006). C'est le cas des SRPs, qui présentent une dizaine de ligands DOTA par nanoparticule, susceptibles de complexer chacun un ion Gd^{III} . De plus, cette méthode permet d'augmenter la relaxivité longitudinale par ion Gd^{III} comparée celle des complexes commerciaux de type $[Gd^{III}(DOTA)]$ (Langereis *et al.*, 2006).

Si l'optimisation combinée de chacun des paramètres décrits précédemment permet d'obtenir de meilleurs agents de contraste positifs pour l'IRM, elle ne doit pas se faire au détriment de la stabilité des complexes car la libération d'ions Gd^{III} au sein de l'organisme pourrait être fatale au patient (Lee G.H. *et al.*, 2012 ; Werner *et al.*, 2008 ; Berland *et al.*, 2007 ; Nonat, 2007). En effet, l'ion Gd^{III} -aqua est particulièrement toxique : des cas de fibrose systémique néphrogénique induite par le gadolinium ont été détectés, et plus particulièrement chez des patients atteints d'insuffisance rénale (Berland *et al.*, 2007). Par conséquent, l'ion Gd^{III} doit impérativement être chélaté par un ligand pour former un complexe extrêmement stable et résistant à la transmétallation. Ainsi, il est nécessaire que la sélectivité de complexation du ligand avec l'ion Gd^{III} soit plus élevée que celle avec les ions contenus dans l'organisme, et notamment les cations Ca^{II} et Zn^{II} . Le taux de dissociation/transmétallation du complexe formé avec l'ion Gd^{III} par rapport à son taux d'élimination au sein de l'organisme constitue alors sa caractéristique toxicologique la plus importante. La condition préalable à remplir pour l'obtention d'un complexe stable *in vivo* réside dans le fait que la stabilité cinétique du complexe est plus importante que sa stabilité thermodynamique. D'ailleurs, les ligands macrocycliques de type DOTA forment des complexes plus stables cinétiquement et thermodynamiquement parlant que les ligands acycliques de type DTPA (Hermann *et al.*, 2008).

- Ajout d'ions Gd^{III} pour une meilleure relaxivité longitudinale des SRPs :

En fin de couplage peptidique, des ions Gd^{III} supplémentaires sont donc ajoutés aux SRPs afin d'occuper un maximum de sites de coordination vacants et d'obtenir la relaxivité par ion Gd^{III} la plus élevée possible.

Cette étape est régie par le pH de la solution. Bianchi *et al.* ont défini les propriétés thermodynamiques et structurales des complexes d'ions Gd^{III} chélatés par des ligands polyaminés et polycarboxyliques (Bianchi *et al.*, 2000). Le ligand DOTA complexe plus facilement l'ion Gd^{III} lorsque ses quatre acides carboxyliques sont déprotonés (Moore *et al.*, 2009 ; Bianchi *et al.*, 2000). L'ajout d'ions Gd^{III} devrait donc être réalisé à pH très basique. Cependant, dans ces conditions, les SRPs risquent de se dégrader (fragmentation de la matrice de polysiloxane lorsque $pH > 9$). De plus, à pH supérieur à 6, la formation d'hydroxydes de gadolinium est favorisée (Hemmer *et al.*, 2012 ; Moore *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009). Par conséquent, le pH de la solution sera maintenu aux alentours de 5-6 lors de l'ajout d'ions Gd^{III} et ce, pendant 6 h, afin d'assurer la lente complexation des ions Gd^{III} et d'éviter la dégradation des SRPs ainsi que la précipitation non souhaitée d'hydroxydes de gadolinium.

II.1.4.5. Partie expérimentale : modèles de protocoles de couplage peptidique de petites molécules aux SRPs

- Protocole de couplage peptidique d'une molécule possédant une fonction amine primaire terminale sur les fonctions acides carboxyliques des DOTA des SRPs (Figure II.8) :

Les SRPs lyophilisés sont redispersés dans l'eau pendant 15 min à une concentration équivalente à 100 mM en élément Gd. La solution aqueuse de SRPs est ajoutée sur les agents de couplage EDC et NHS en poudre (2 à 3 équivalents molaires d'EDC/NHS par Gd). Le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout de quelques microlitres d'une solution d'acide chlorhydrique à 5 mM, et le tout est agité pendant 30 min.

La molécule à greffer est ensuite ajoutée à la solution aqueuse de SRPs dont les fonctions carboxylates sont activées (généralement 2 équivalents par Gd). Si cette molécule n'est pas soluble dans l'eau, elle est préalablement dissoute dans du DMSO à la concentration la plus élevée possible. Le pH de la solution est ajusté à 7,4 par ajout de quelques microlitres d'une solution de soude à 5 mM, et le tout est agité pendant 8 h.

Un certain volume de solution aqueuse à 100 mM de Gd^{III} , préparée à partir de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, est ajouté sur la solution aqueuse de SRPs vectorisées (0,5 équivalents molaires de Gd^{III} supplémentaires par Gd initial) afin d'occuper un maximum de sites de coordination vacants et d'obtenir la relaxivité par ion Gd^{III} la plus élevée possible. Le pH de la solution est ajusté à 5-6 par ajout de quelques microlitres d'une solution d'acide chlorhydrique ou de soude à 5 mM (selon le cas), et le tout est agité pendant 6 h minimum.

Les SRPs vectorisées et « remontées en Gd » sont purifiées par filtration tangentielle sur une membrane 5 kDa par un facteur 1000 minimum, puis lyophilisées. Les SRPs lyophilisées sont stables une dizaine de mois sans altération à température ambiante.

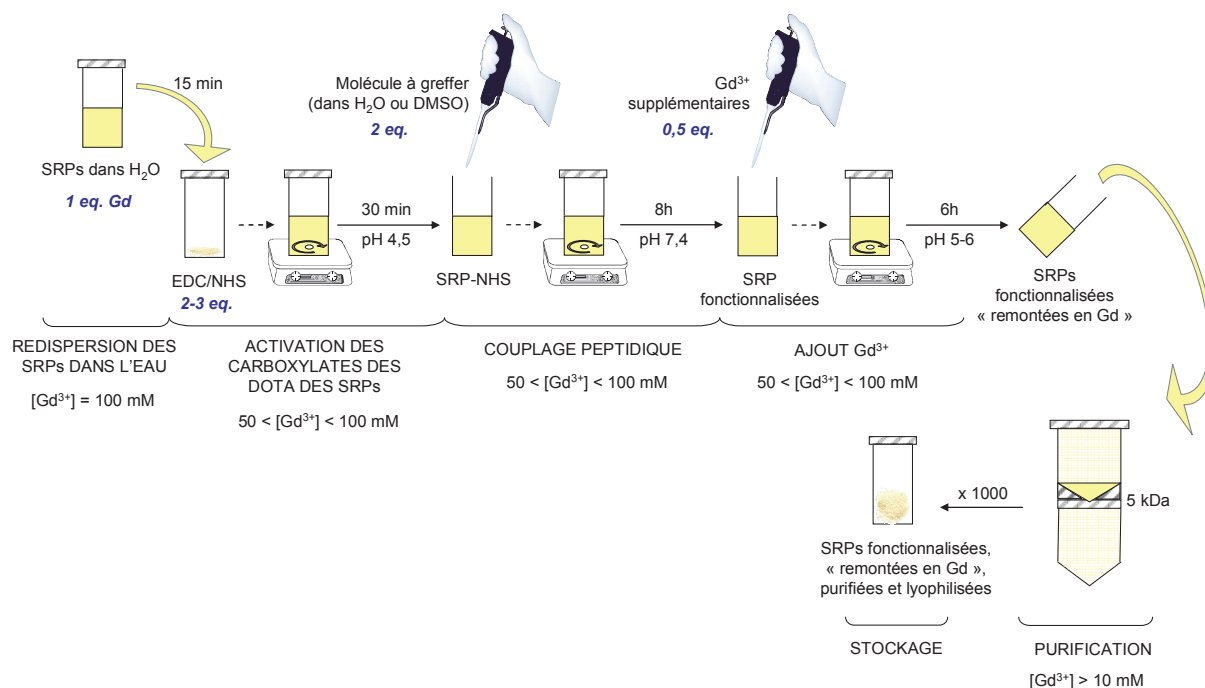


Figure II.8. Schéma du mode opératoire pour le greffage d'une molécule possédant une fonction amine primaire terminale sur les fonctions acides carboxyliques des molécules de DOTA des SRPs.

- Protocole de couplage peptidique d'une molécule possédant une fonction acide carboxylique terminale sur les fonctions amines primaires issues du réseau de polysiloxane des SRPs (Figure II.9) :

La molécule est dissoute dans l'eau ou le DMSO si elle n'est pas soluble dans l'eau, à la concentration la plus élevée possible. La solution contenant la molécule est ajoutée sur les agents de couplage EDC et NHS en poudre (2 équivalents molaires d'EDC/NHS par fonction acide carboxylique à activer). Si l'activation est réalisée en milieu aqueux, le pH de la solution est ajusté à 4,5 par ajout de quelques microlitres d'une solution d'acide chlorhydrique ou de soude à 5 mM (selon le cas), et le tout est agité pendant 30 min.

Si la molécule est présentée sous forme d'ester NHS (forme activée de l'acide carboxylique), ces étapes sont inutiles. La molécule est dissoute dans du DMSO anhydre pour éviter l'hydrolyse de l'ester activé.

En parallèle, les SRPs lyophilisées sont redispersées dans l'eau (15 min minimum) à une concentration équivalente à 100 mM en élément Gd. Les SRPs sont ajoutées à la solution contenant la molécule dont les fonctions carboxylates ont été activées (généralement 2 équivalents molaires de molécule par Gd). Le pH de la solution est ajusté à 7,4 par ajout de quelques microlitres d'une solution de soude à 5 mM, et le tout est agité pendant 8 h.

Un certain volume de solution aqueuse à 100 mM de Gd^{III}, préparée à partir de GdCl₃.6H₂O, est ajouté sur la solution aqueuse de SRPs vectorisées (0,5 équivalents molaires de Gd^{III} supplémentaires par Gd initial) afin d'occuper un maximum de sites de coordination vacants et d'obtenir la relaxivité par ion Gd^{III} la plus élevée possible. Le pH de la solution est ajusté à 5-6 par ajout de quelques microlitres d'une solution d'acide chlorhydrique ou de soude à 5 mM (selon le cas), et le tout est agité pendant 6 h minimum.

Les SRPs vectorisées et « remontées en Gd » sont purifiées par filtration tangentielle sur une membrane 5 kDa par un facteur 1000 minimum, puis lyophilisées. Les SRPs lyophilisées sont stables une dizaine de mois sans altération à température ambiante.

Avant d'optimiser la réaction de couplage peptidique de petites molécules sur les SRPs, une étude préliminaire sur la disponibilité et l'accessibilité de leurs sites de greffage, à savoir les acides carboxyliques et les amines primaires, s'avère nécessaire et fait l'objet des deux parties suivantes.

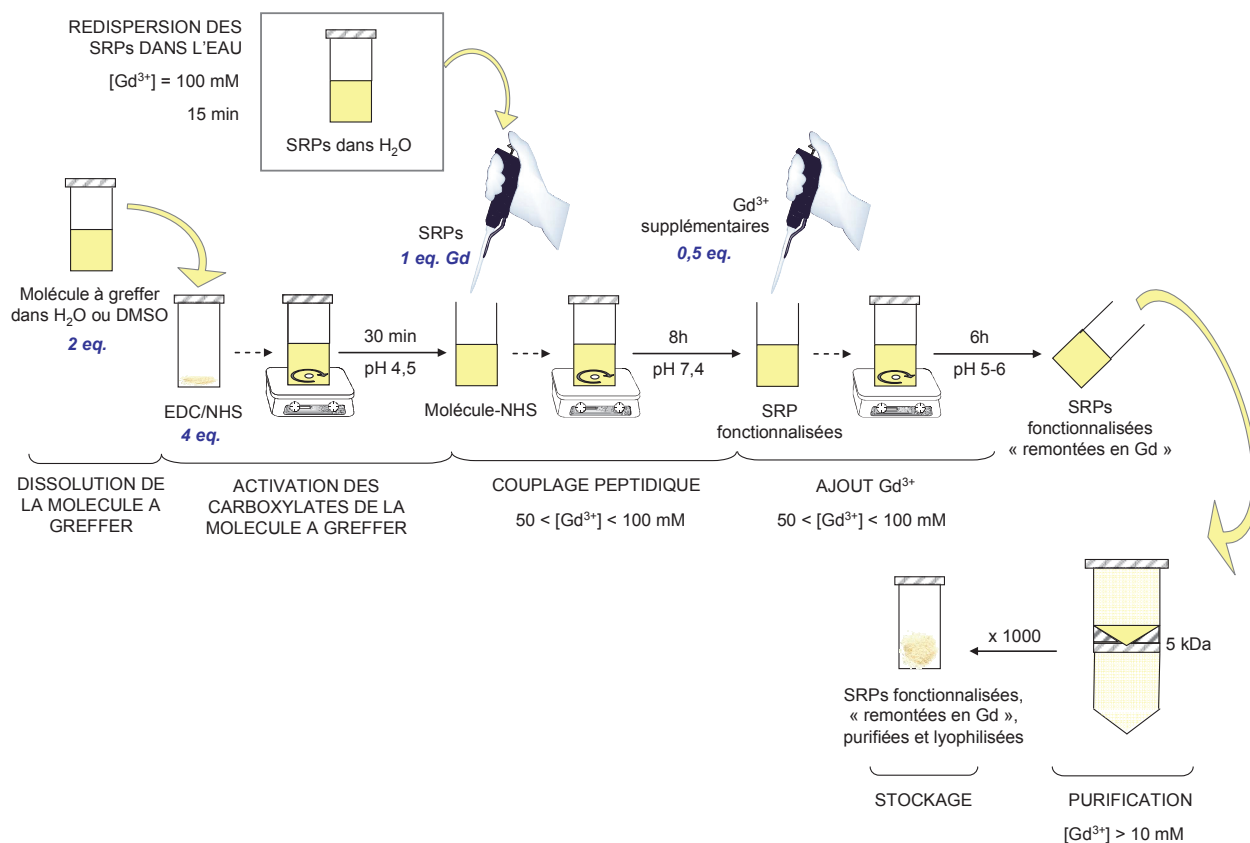


Figure II.9. Schéma du mode opératoire pour le greffage d'une molécule possédant une fonction acide carboxylique terminale sur les fonctions amines primaires issues du réseau de polysiloxane des SRPs.

II.2. Estimation du nombre de ligands DOTA vacants par nanoparticule

L'ion Gd^{III} est coordonné au ligand octadentate DOTA par le doublet non liant des quatre atomes d'azote et par l'un des doublets non liants d'un atome d'oxygène de chacun des bras carboxylates. Le neuvième site de coordination est occupé par une molécule d'eau (Chang *et al.*, 1993). Par conséquent, le greffage de molécules présentant une fonction amine primaire terminale à l'un des carboxylates du DOTA n'est possible que si le ligand n'est pas impliqué dans la complexation d'un ion Gd^{III}. Dans cette optique, un dosage par luminescence a été mis en place afin d'évaluer le nombre de ligands DOTA vacants.

II.2.1. Principe général

II.2.1.1. Principe de la luminescence

La luminescence est une méthode analytique extrêmement sensible (Bünzli, 2004). Il s'agit d'un processus au cours duquel une espèce chimique absorbe un rayonnement à une certaine longueur d'onde et émet en retour un rayonnement à une longueur d'onde supérieure. L'énergie

d'absorption excite la molécule de son état électronique fondamental singulet (S_0) vers un état de plus haute énergie (S_1 , S_2 , etc.) (Figure II.10). Les molécules excitées à des états singlets d'énergie plus élevée ($\geq S_2$) retournent rapidement ($< 10^{-10}$ s) à l'état excité d'énergie la plus basse (S_1) sans émettre de rayonnement. Depuis cet état excité d'énergie la plus basse (S_1), différentes transitions radiatives (fluorescence) ou non-radiatives peuvent avoir lieu pour que la molécule retrouve un des niveaux d'énergie rotationnelle et/ou vibrationnelle de l'état électronique fondamental (S_0) (Figure II.10). La transition de l'état singulet (S_1) vers un état triplet (T_1) est appelée conversion inter-système et peut être suivie par la relaxation vers l'état électronique fondamental (S_0) de manière radiative (phosphorescence) ou non-radiative (Figure II.10) (Hagan *et al.*, 2011).

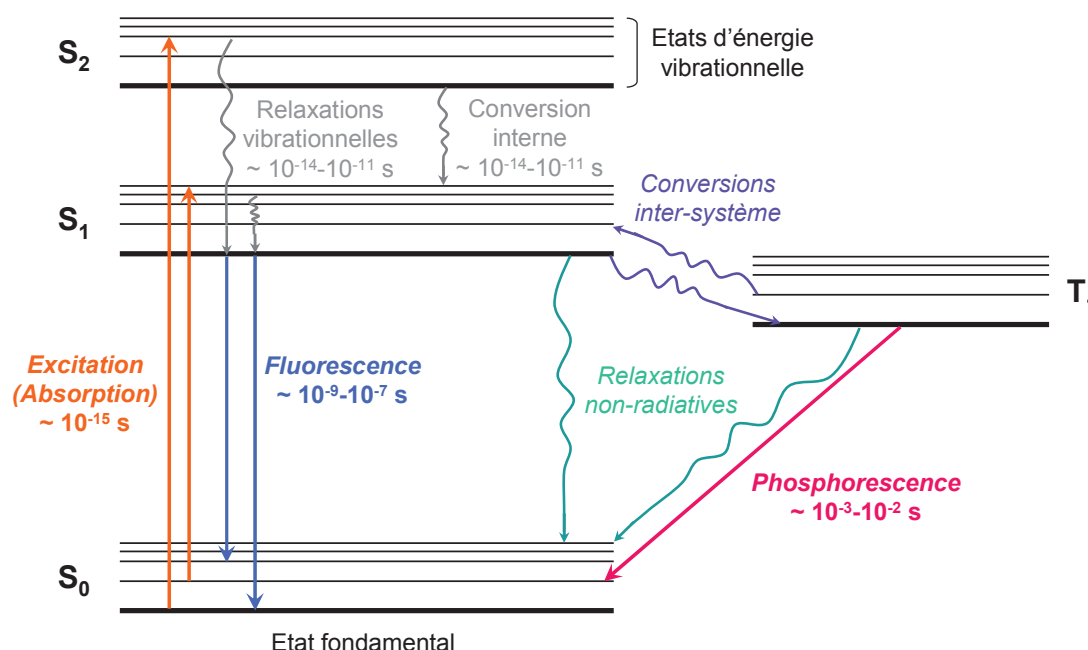


Figure II.10. Diagramme d'énergie de Jablonsky. Adaptée de Microscopy Resource Center.

II.2.1.2. Luminescence des lanthanides

- Généralités :

Les lanthanides sont des éléments du bloc f et leurs cations trivalents (Ln^{III}) possèdent une structure électronique caractéristique de type $[\text{Xe}]4f^n$ ($n = 0-14$). A l'exception des ions lanthane et lutécium (La^{III} et Lu^{III}), tous les ions lanthanides trivalents sont luminescents : ils peuvent être fluorescents (Pr^{III} , Nd^{III} , Ho^{III} , Er^{III} , Yb^{III}) ou phosphorescents (Eu^{III} , Gd^{III} , Tb^{III} , Dy^{III} , Tm^{III}). Les états excités des ions Ln^{III} phosphorescents ont une durée de vie longue ($\mu\text{s} - \text{ms}$), ce qui permet de séparer la phosphorescence de l'ion en temps résolu de la fluorescence des échantillons biologiques (de l'ordre de la nanoseconde). En raison de la nature des électrons 4f, protégés de l'environnement de coordination par les électrons $5s^2 5p^6$, le couplage de spin avec l'environnement est très peu observé. Ainsi, la bande d'émission des ions Ln^{III} , basée sur les transitions f-f interdites de Laporte, est étroite et spécifique à chaque ion ; d'autre part, les coefficients d'extinction molaire de ces cations trivalents sont très faibles ($1 < \epsilon < 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) – conséquence des règles de parité (et parfois du

changement de multiplicité de spin) (Fomina *et al.*, 2012 ; Zhu *et al.*, 2011 ; Moore *et al.*, 2009). Les bandes d'émission des ions Ln^{III} sont alors facilement différenciables (bandes fines de faible intensité) des bandes d'émission de fluorescence des composés organiques : ce sont des sondes luminescentes idéales pour les systèmes biologiques (Figure II.11) (Bünzli, 2004).

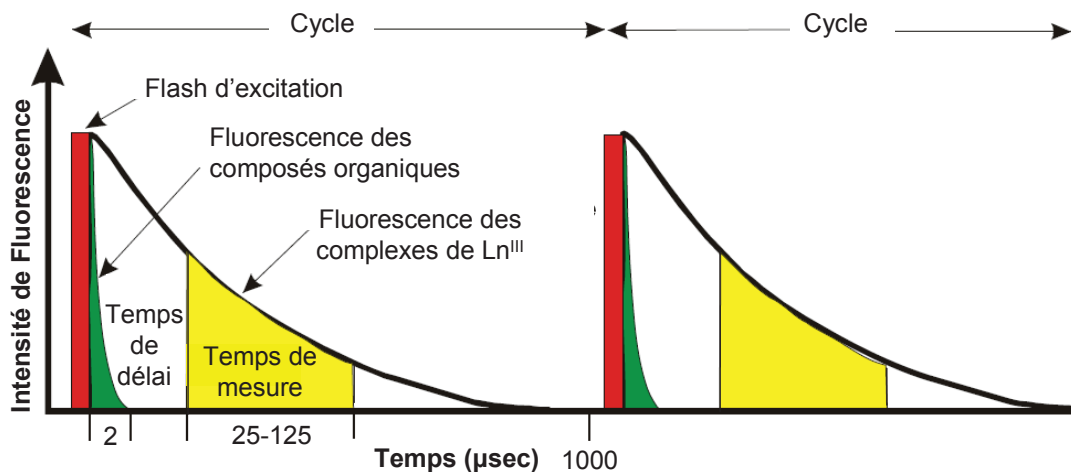


Figure II.11. Déclin de fluorescence des complexes de Ln^{III} . La fluorescence des complexes de Ln^{III} a une durée bien plus longue que celle des composés organiques. Ceci permet de commencer la mesure de la fluorescence des complexes de Ln^{III} après la fin de la fluorescence des composés organiques. Adaptée de Biotek® et de Hagan *et al.*, 2011.

En spectroscopie en temps résolu, l'excitation se produit *via* une lumière pulsée (ou laser) et un temps de retard est imposé avant la mesure (Figure II.11). De cette façon, la luminescence des composés organiques (durée de vie des états excités de l'ordre de la nanoseconde) est éliminée et permet la mesure de la luminescence du métal uniquement avec un rapport signal sur bruit optimisé. De plus, comme cette opération est réalisée en l'espace de quelques millisecondes, elle peut être répétée des centaines de fois pendant une minute, aboutissant à une sensibilité accrue.

L'excitation directe des ions Ln^{III} conduit rarement à une intensité de luminescence élevée, du fait de la règle de sélection dipolaire électrique (règle Laporte). De plus, le rendement quantique d'un complexe dépend fortement des propriétés du ligand utilisé. En effet, les oscillateurs moléculaires de type O-H ou N-H sont susceptibles d'interagir avec les niveaux électroniques excités de l'ion Ln^{III} , provoquant alors un « quenching » (atténuation) de luminescence. Ainsi, plus le nombre de molécules de solvant protique (typiquement H_2O) dans la première sphère de coordination de l'ion Ln^{III} est élevé, plus le rendement quantique de l'ion métallique est affecté. La luminescence de l'ion Ln^{III} est maximale lorsque la sphère de coordination du complexe est saturée (Nonat, 2007). En conclusion la luminescence de l'ion Ln^{III} au sein d'un complexe de type $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ est plus élevée que celle de l'ion Ln^{III} -aqua $[\text{Ln}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$.

- Choix de l'Europium pour le dosage du nombre de ligands DOTA vacants par luminescence :

L'ion Eu^{III} est l'ion Ln^{III} le plus couramment employé pour des applications bioanalytiques car les complexes à base d'ions Eu^{III} émettent fortement dans le domaine du visible (Fomina *et al.*, 2012 ;

Schäferling, 2012 ; Hagan *et al.*, 2011 ; Zhu *et al.*, 2011). Les particularités spectroscopiques de l'ion Eu^{III} le rendent spécialement attractif en termes d'analyse structurale de complexes de Ln^{III} . En effet, la transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ peut générer des informations sur la coordination de l'ion Eu^{III} . Lorsque l'ion Eu^{III} est complexé, l'énergie émise sous forme de photon due à cette transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ est différente de l'énergie émise par l'ion libre. La complexation déformant le nuage électronique autour de l'ion Eu^{III} , cette variation d'énergie dépend de la nature des atomes coordinant du ligand. De plus, l'intensité de la transition est fonction de la symétrie du complexe. Le nombre de composantes de chacune des transitions $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_j$ et leur intensité relative permettent de déterminer la géométrie précise du complexe (Ferrand, 2004). Les intensités d'émission les plus fortes ont été observées pour les transitions $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ et $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ (Schäferling, 2012).

II.2.1.3. Principe de l'estimation du nombre de ligands DOTA vacants par nanoparticule

Des quantités croissantes d'ions Eu^{III} sont ajoutées à une solution aqueuse de SRPs, l'objectif étant que les ligands DOTA vacants complexent petit à petit les ions Eu^{III} jusqu'à saturation puis excès comme l'illustre la Figure II.12.

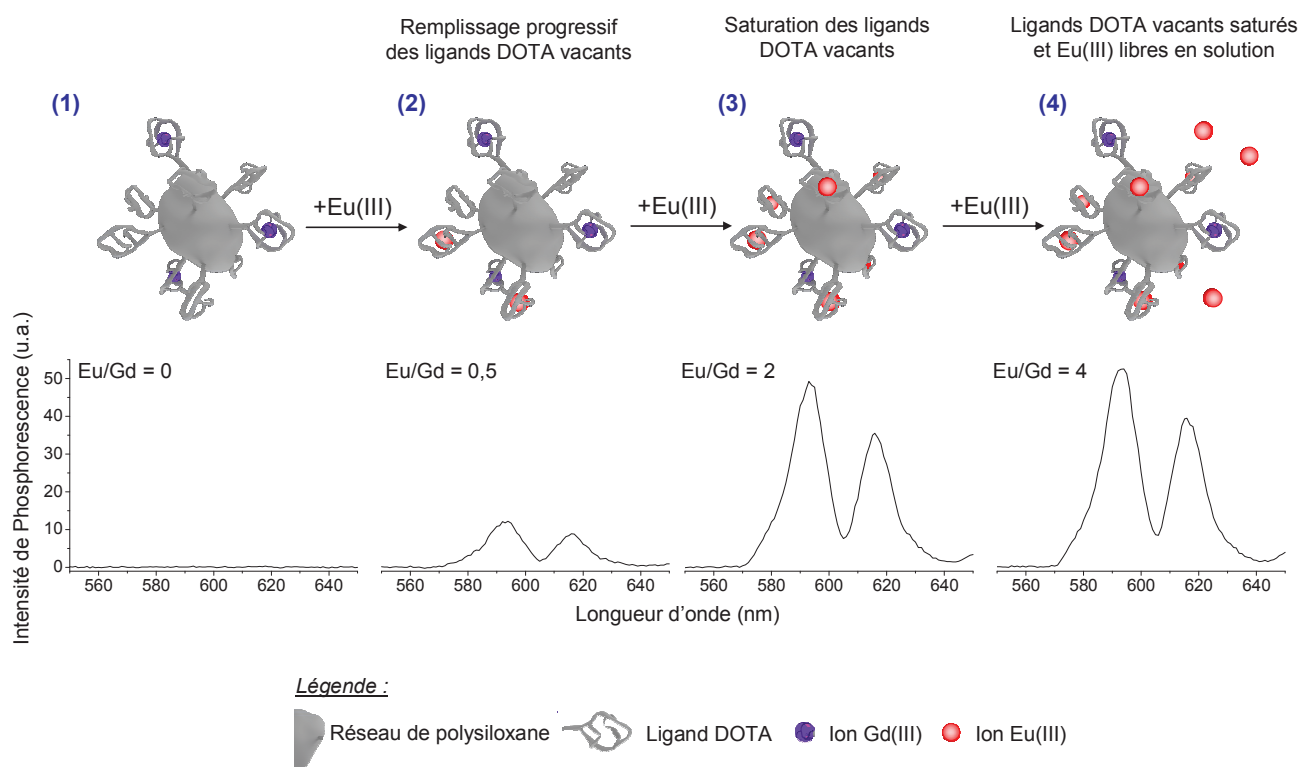


Figure II.12. Schématisation du dosage du nombre de ligands DOTA vacants par nanoparticule. Représentation de l'évolution de l'intensité de phosphorescence des complexes $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{DOTA})]$ ($\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$) au fur et à mesure de l'ajout d'ions Eu^{III} dans le milieu.

Les spectres d'émission de phosphorescence des complexes $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{DOTA})]$ formés ($\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$) sont recueillis entre 550 et 650 nm (Figure II.12). Deux pics d'émission sont observés à 593 et 615 nm, correspondant respectivement aux transitions de spin interdites f-f ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ et ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ de l'ion Eu^{III} chélaté (Matsumoto, 2010). L'intensité de phosphorescence de la seconde bande de transition (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$) dépend fortement de la symétrie du ligand chélatant l'ion Eu^{III} ; par conséquent, seule la première bande de transition (${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$) est prise en considération pour le dosage du nombre de ligands DOTA vacants (Jokanovič *et al.*, 2006). En présence de ligands DOTA vacants, l'euporium est chélaté et le maximum d'intensité de phosphorescence augmente au fur et à mesure que l'ion Eu^{III} est ajouté (Figure II.12. Etapes (1) à (3)). Quand les DOTA sont saturés, c'est-à-dire que chacun d'entre eux chélate soit un ion Gd^{III} , soit un ion Eu^{III} , le maximum d'intensité de phosphorescence devient quasiment constant (Figure II.12. Etapes (3) et (4)).

La courbe représentant le maximum d'intensité de phosphorescence à 593 nm (transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$) en fonction du rapport molaire Eu/Gd est ensuite tracée. La première partie de la courbe est une droite linéaire : l'intensité de phosphorescence augmente avec la concentration en complexes $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{DOTA})]$. La deuxième partie de la courbe est un plateau et représente la saturation des DOTA : quelque soit la quantité d' Eu^{III} ajoutée, l'intensité de phosphorescence du complexe $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{DOTA})]$ est constante. En effet, la phosphorescence des ions Eu^{III} libres (Eu^{III} -aqua) est négligeable devant celle des ions Eu^{III} chélatés du fait du quenching de luminescence de l'ion Eu^{III} par les désexcitations non radiatives vibrationnelles liées aux oscillateurs O-H des molécules d'eau. L'intersection des deux droites indique le nombre d'ions Eu^{III} nécessaires à ajouter par ion Gd^{III} pour saturer les ligands DOTA vacants (*cf.* § II.2.2.).

II.2.2. Partie expérimentale

Les SRPs sont redispersées dans l'eau et divisées en quinze aliquots. Différentes quantités de chlorure d'euporium hexahydraté ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sont ajoutées à chacun des aliquots (rapports molaires Eu/Gd compris entre 0 et 10). Les solutions sont agitées pendant 48 h à pH 5-6, de manière à assurer la complexation totale des ions Eu^{III} par les ligands DOTA vacants, sans former d'hydroxydes de gadolinium ou d'euporium (Hemmer *et al.*, 2012 ; Moore *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009) (*cf.* § II.1.4.4.).

Les quinze spectres d'émission de phosphorescence des complexes $[\text{Eu}^{\text{III}}(\text{DOTA})]$ des SRPs ($\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$) sont recueillis entre 550 et 650 nm (Figure II.13). Les deux pics d'émission à 593 et 615 nm, correspondant respectivement aux transitions de spin interdites f-f ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ et ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ de l'ion Eu^{III} chélaté, sont observés (Matsumoto, 2010).

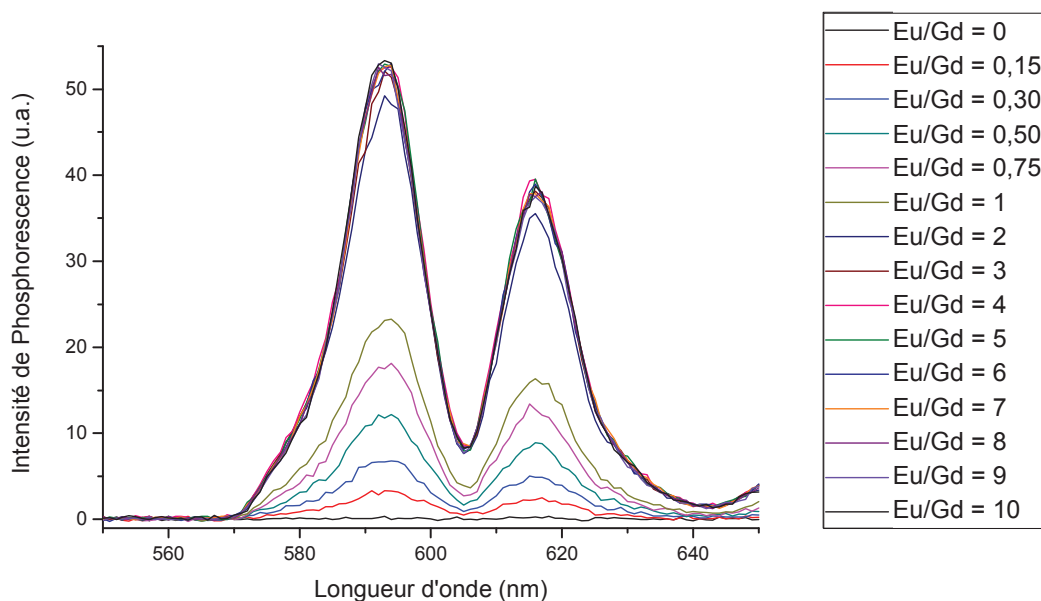


Figure II.13. Spectres d'émission de phosphorescence des complexes $[Eu^{III}(DOTA)]$ des SRPs en fonction de leur rapport molaire Eu/Gd ($\lambda_{excitation} = 395 \text{ nm}$ – concentration SRP : $[Gd^{3+}] = 30 \mu M$)

La courbe représentant les *maxima* d'intensité de phosphorescence à 593 nm (transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$) en fonction du rapport molaire Eu/Gd est alors tracée (Figure II.14).

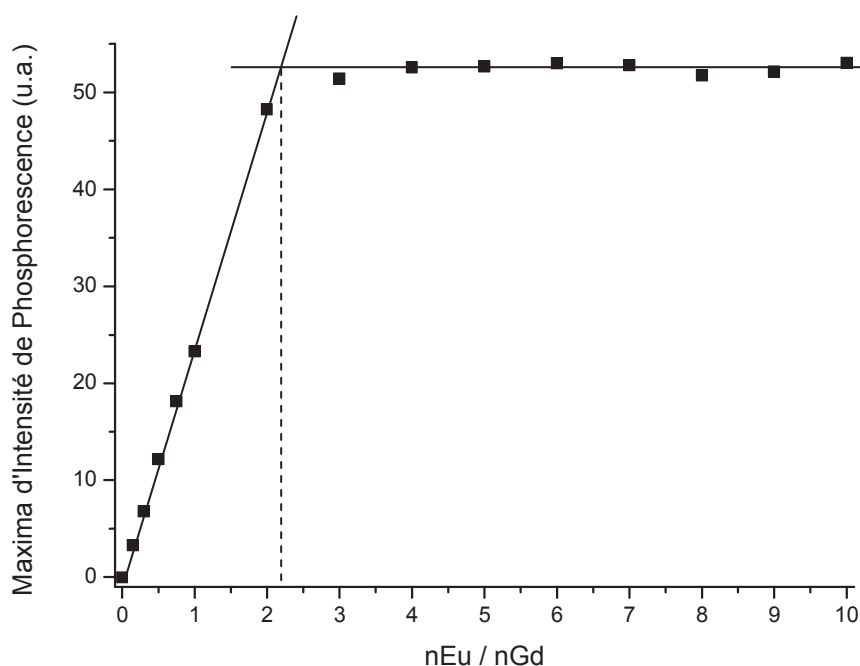


Figure II.14. Courbe représentant les *maxima* d'intensité de phosphorescence des complexes $[Eu^{III}(DOTA)]$ des SRPs à 593 nm en fonction de leur rapport molaire Eu/Gd.

Comme annoncé dans le principe du dosage, la première partie de la courbe est une droite linéaire : l'intensité de phosphorescence augmente avec la concentration en complexes $[Eu^{III}(DOTA)]$. La deuxième partie de la courbe est un plateau et représente la saturation des ligands DOTA : quelle que soit la quantité d' Eu^{III} ajoutée, l'intensité de phosphorescence du complexe $[Eu^{III}(DOTA)]$ est

constante. L'intersection des deux droites indique le nombre d'ions Eu^{III} nécessaires à ajouter par ion Gd^{III} pour saturer les ligands DOTA vacants.

Conformément à la méthode décrite précédemment, l'intersection des deux droites indique que 2,2 ions Eu^{III} par ion Gd^{III} doivent être ajoutés pour arriver à saturation des ligands DOTA vacants. Ainsi, les SRPs étudiées disposent de 69% de sites coordinants libres. Par conséquent, si le nombre total de ligand est évalué à 10 environ, 3 ± 0.5 ligands DOTA chélatent un ion Gd^{III} tandis que les 7 ± 0.5 ligands DOTA restants sont vacants.

Ces ligands DOTA vacants permettent la vectorisation des SRPs par des molécules présentant une fonction amine primaire terminale, ou encore la complexation d'autres ions métalliques d'intérêt, comme par exemple ^{111}In pour la TEMP. Après chaque greffage de molécule ciblante, du chlorure de gadolinium hexahydraté ($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) est généralement ajouté aux solutions de nanoparticules pour atteindre des relaxivités longitudinales plus élevées (cf. § II.1.4.4.).

II.3. Etude de l'accessibilité des fonctions amines primaires du réseau de polysiloxane

Le réseau de polysiloxane des SRPs est composé de TEOS et d'APTES, dont le rapport molaire considéré constant au cours des différentes étapes de synthèse et de purification, est de 40% TEOS / 60% APTES (cf. Chapitre I, § I.5.1.2.). Les fonctions amines primaires du réseau de polysiloxane proviennent des molécules d'APTES. Elles ne sont cependant pas toutes accessibles pour les raisons suivantes :

- des molécules d'APTES ont pu être « piégées » au sein du réseau de polysiloxane ; leurs fonctions amines primaires demeurent inaccessibles ;
- certaines fonctions amines primaires ont été utilisées pour le greffage du DOTA-GA ; le couplage peptidique a donné lieu à une fonction amide et les fonctions amines primaires initiales ne sont plus disponibles ;
- la matrice de polysiloxane constitue l'élément central de la nanoparticule : elle est entourée d'une dizaine de ligands DOTA ; le greffage de grosses molécules risque d'être soumis à des problèmes d'encombrement stérique.

L'objectif de cette partie est de démontrer que le greffage de molécules présentant une fonction acide carboxylique terminale sur les SRPs reste possible et d'estimer le pourcentage d'amines accessibles pour mener à bien ce greffage.

II.3.1. Choix du fluorophore pour fonctionnaliser les SRPs via les fonctions amines primaires du réseau de polysiloxane

Pour cette étude, nous avons choisi de greffer aux SRPs un fluorophore organique possédant une fonction acide carboxylique terminale présentée sous sa forme activée (ester NHS) (Figure II.18). Le marquage fluorescent des SRPs présente plusieurs avantages : il fournit aux nanoparticules une

grande sensibilité, leur permettant ainsi d'être détectées à de très faibles concentrations et les rendant extrêmement performantes pour de nombreuses applications biologiques *in vitro* et *in vivo* (imagerie de fluorescence par exemple).

II.3.1.1. Fluorescence pour la biologie – Généralités

Il existe une vaste sélection de fluorophores ; ces fluorochromes peuvent être répartis en trois grandes catégories : les molécules organiques, les fluorophores biologiques et les quantum-dots (QDs) (Aït-Slimane). Nous avons opté pour des fluorophores organiques car leur petite taille leur permet d'être couplés de manière covalente à des ensembles macromoléculaires sans interférer avec leurs fonctions initiales. Une large gamme de fluorophores organiques disposant de propriétés spécifiques (excitation/émission, rendement quantique et coefficient d'extinction molaire caractéristiques) est commercialisée. Il s'agit généralement d'hydrocarbures ou d'hétérocycles polyaromatiques avec des systèmes de délocalisation d'électrons (Thermo Scientific).

L'intensité de fluorescence d'un fluorophore dépend son environnement (pH, température, polarité, etc.). L'intensité de fluorescence équivaut approximativement au produit des deux paramètres suivants ($I \sim \epsilon \Phi$) (Fluorescence imaging, Handbook) :

- sa capacité à absorber la lumière (coefficient d'extinction molaire, ϵ),
- l'efficacité avec laquelle il convertit la lumière absorbée en lumière de fluorescence (rendement quantique, Φ) : $\Phi = \text{nombre de photons émis} / \text{nombre de photons absorbés}$ ($0 < \Phi < 1$).

Le fluorophore idéal pour des applications en biologie présente (Aït-Slimane) :

- un coefficient d'extinction molaire ϵ élevé,
- un fort rendement quantique Φ ,
- une durée de vie de l'état excité courte (< 3 ns)
- un grand déplacement de Stokes (grande différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence)
- une faible sensibilité au photobleaching (participation du fluorophore à des réactions chimiques altérant sa structure moléculaire et réduisant ainsi sa fluorescence globale)
- des longueurs d'onde d'absorption et d'émission situées dans le proche IR (cf. § II.3.1.2.).

II.3.1.2. Intérêt des fluorophores émettant dans le proche IR pour l'imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est devenue l'une des techniques les plus puissantes pour le suivi de biomolécules dans les systèmes vivants (Bunschoten *et al.*, 2012). De nombreux marqueurs fluorescents ont été développés mais peu d'entre eux ont des propriétés spectrales dans le domaine du proche-infrarouge ($650 \text{ nm} < \lambda_{\text{absorption et émission}} < 900 \text{ nm}$). Or, les molécules fluoresçant dans le proche-IR sont les plus adaptées pour les applications cliniques car les photons émis causent moins de dommages sur les échantillons biologiques, pénètrent plus profondément dans les tissus et

interfèrent peu avec l'autofluorescence de fond des tissus dans les systèmes vivants (Wagh *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2012 ; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2011).

La large absorption de l'hémoglobine désoxygénée, de l'hémoglobine oxygénée et de la mélanine à des longueurs d'onde inférieures à 600 nm et l'absorbance prédominante de l'eau dans la région infrarouge (>1000 nm) empêchent la caractérisation optique en dessous d'un millimètre de tissu hors de la fenêtre thérapeutique (Figure II.15) (Wagh *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2012 ; Paganin-Gioanni *et al.*, 2010).

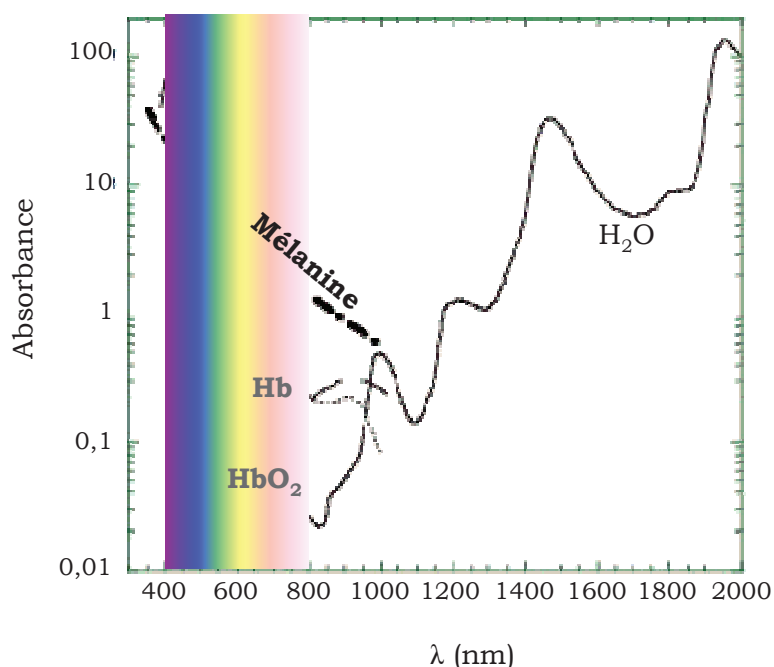


Figure II.15. Absorbance des hémoglobines oxygénée (HbO₂) et désoxygénée (Hb), de la mélanine et de l'eau. Adaptée de Hamblin *et al.*, 2006 et de Richards-Kortum *et al.*, 1996.

D'autre part, l'absorption de la lumière par les fluorochromes des tissus endogènes peut entraîner une émission de lumière : c'est ce qu'on appelle l'autofluorescence des tissus. Ce phénomène est dû à des formes oxydées de la riboflavine (vitamine B2). De même, d'autres molécules comme la lipofuscine (pigment cellulaire), les céroïdes ou d'autres composants de la peau comme le collagène et la mélanine, y contribuent aussi. La chlorophylle contenue dans certains aliments peut également en être une cause. Ce phénomène d'autofluorescence des tissus est présent dans le domaine de l'UV et du visible (Paganin-Gioanni *et al.*, 2010).

Les fluorophores émettant dans le proche-IR permettent de réduire l'impact de l'absorption des tissus endogènes et celui de l'autofluorescence des tissus (rapport de fluorescence tumeur/fond suffisant) et offrent ainsi la plus grande sensibilité parmi le large éventail de fluorophores commercialisés (Azhdarinia *et al.*, 2012 ; Schaafsma *et al.*, 2011).

II.3.1.3. Imagerie par fluorescence – Applications et Perspectives

Au vue de la sensibilité démontrée lors de ces études d'investigation sur des sujets humains, les nouvelles sondes fluoresçant dans le proche-IR et couplées à des vecteurs, actuellement en cours

de développement, sont prometteuses pour des opportunités cliniques uniques de chirurgie guidée par fluorescence avec de l'imagerie moléculaire ciblée (Azhdarinia *et al.*, 2012).

L'imagerie par fluorescence est de plus en plus appréciée pour sa grande sensibilité et sa résolution spatio-temporelle élevée ; de plus elle permet un suivi en temps réel, elle utilise une source lumineuse plutôt que des rayonnements ionisants et elle est relativement bon marché (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2011 ; Paganin-Gioanni *et al.*, 2010).

Dans cette optique, les recherches actuelles s'orientent vers la synthèse de fluorophores couplés à des vecteurs spécifiques de certaines tumeurs ou d'activités enzymatiques. Or, jusqu'à présent, aucun de ces agents fluoresçant dans le proche-IR et ciblant des tumeurs spécifiques n'a été commercialisé. Les seuls fluorophores émettant dans le proche-IR actuellement disponibles sont le bleu de méthylène ($\lambda_{em} \sim 700$ nm) et le vert d'indocyanine (VIC) ($\lambda_{em} \sim 830$ nm) et ils ne sont pas spécifiques de certaines tumeurs (Schaafsma *et al.*, 2011). Néanmoins, ils peuvent potentiellement pénétrer et être retenus au sein de la tumeur par effet EPR (accumulation passive d'agents non spécifiques dans les tumeurs) (Hutteman *et al.*, 2011).

L'identification per-opératoire, c'est-à-dire pendant l'acte chirurgical, de certaines tumeurs reste complexe ; l'évaluation inadéquate de la localisation et de l'étendue de la tumeur peut causer des cas de récurrence. C'est par exemple le cas pour 72 à 86% des tumeurs pancréatiques (Hutteman *et al.*, 2011). L'imagerie par fluorescence sur des molécules fluorescentes vectorisées pourrait permettre la détection visuelle en temps réel et la résection guidée par imagerie des tissus tumoraux (délimitation exacte des contours de la tumeur et détection des masses cancéreuses invisibles à l'œil nu), tout en profitant du champ de vision opératoire (Figure II.16) (Azhdarinia *et al.*, 2012). Ainsi, de nombreux cas de récurrence pourraient être évités (Hutteman *et al.*, 2011).

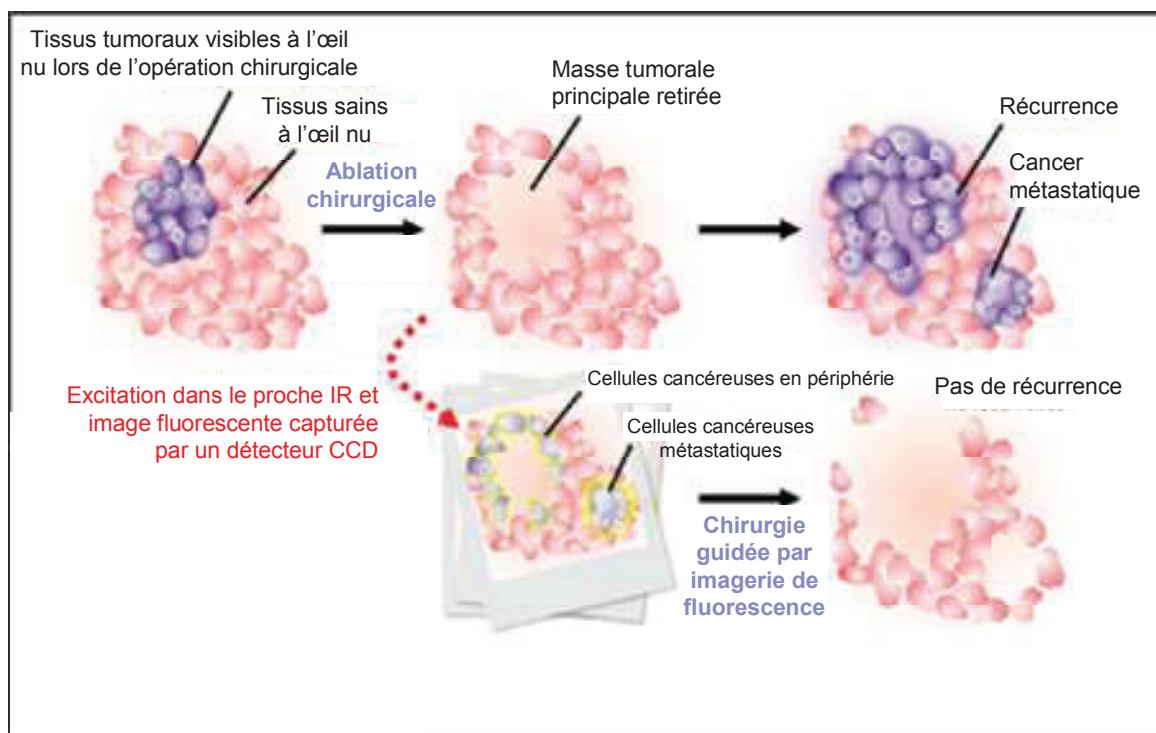


Figure II.16. Principe de la chirurgie guidée par imagerie de fluorescence et bénéfices apportés par rapport à la chirurgie traditionnelle. Adaptée de [University of Wisconsin-Madison](#).

Plusieurs études précliniques ont démontré l'efficacité de ces fluorophores vectorisés ([Hutteman et al., 2011](#)). Par exemple, [Terwisscha van Scheltinga et al.](#) se sont intéressés à des anticorps ciblant le VEGF ou l'HER2 marqués par des fluorophores émettant dans le proche-IR et ont prouvé leur spécificité pour la tumeur ainsi que la détection sensible des lésions tumorales *in vivo* (Figure II.17) ([Terwisscha van Scheltinga et al., 2011](#)).

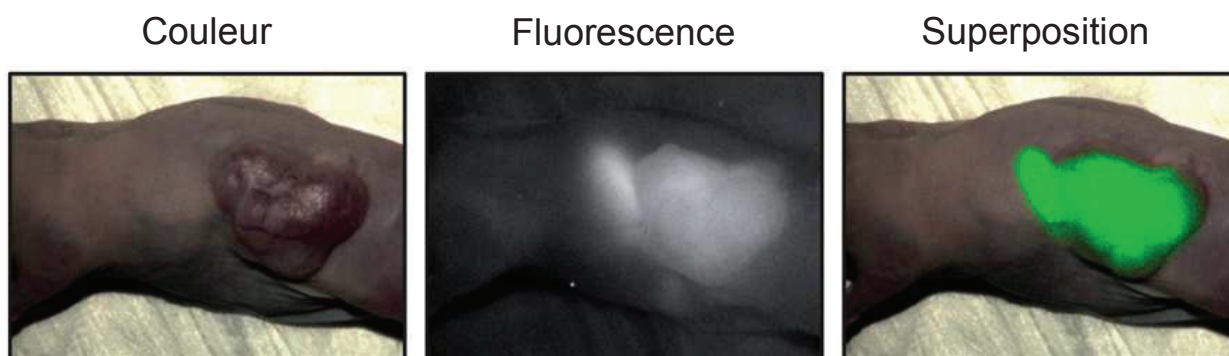


Figure II.17. Images per-opératoires représentatives d'un fluorophore vectorisé (bevacizumab-800CW) injecté dans une souris porteuse d'une tumeur ovarienne de lignée A2780, en sous-cutané. Le faible bruit de fluorescence observé dans l'estomac provient de la chlorophylle contenue dans la nourriture de l'animal. Adaptée de [Terwisscha van Scheltinga et al., 2011](#).

Ces études s'avèrent prometteuses pour de futures études cliniques avec ce genre d'anticorps spécifiques marqués par des fluorophores pour des applications en chirurgie guidée par imagerie de fluorescence ([Terwisscha van Scheltinga et al., 2011](#)).

Les chirurgiens se fiant essentiellement à la palpation des tumeurs et à leur inspection visuelle, il existe un besoin urgent de développer de nouvelles modalités d'imagerie per-opératoire capables de délimiter avec exactitude et en temps réel les contours d'une tumeur et des ganglions lymphatiques atteints. Ainsi, les risques de dommages au niveau des structures vitales et de cas de récurrence du cancer sont moindres. L'identification de structures devant être réséquées, comme les tissus tumoraux et les ganglions lymphatiques, ou bien épargnées, telles que les nerfs, les uretères et les canaux biliaires, revêt alors une importance capitale dans le domaine de la chirurgie oncologique ([Schaafsma et al., 2011](#)).

L'expérience clinique du VIC en imagerie par fluorescence dans le proche-IR en per-opératoire est assez étendue et montre un profil d'innocuité très favorable. Cependant, l'utilisation du VIC pour la détection et la démarcation de tumeurs reste limitée principalement parce qu'il ne présente pas de fonction chimique permettant de le coupler à des vecteurs spécifiques de tumeur, ce qui en fait un fluorophore non spécifique. Le VIC n'est donc pas une sonde fluorescente idéale et de nombreux fluorophores disposant de groupements fonctionnalisables et présentant des propriétés optiques supérieures sont en cours de développement. Le passage de ces sondes fluorescentes idéales à des essais cliniques représente un défi de taille et est susceptible d'améliorer considérablement la chirurgie guidée par imagerie de fluorescence dans le proche-IR.

II.3.1.4. Présentation des Cyanines et choix de la Cy5.5

La Cyanine (Cy) est l'un des fluorophores organiques les plus répandus pour le marquage des biomolécules (Hermanson, 2008). Elle est constituée de deux structures cationiques hétérocycliques azotées reliées par un pont polyméthinique. L'une des deux structures cycliques comporte nécessairement un atome d'azote quaternarisé (charge positive). Les structures cycliques sont généralement des cycles indoles (dans le cas des Cy3, 5 ou 7) ou benzo-indoles (dans le cas des Cy3.5 ou 5.5) (Figure II.18) car ces structures aromatiques possèdent des coefficients d'extinction molaire extrêmement élevés et fournissent alors des marqueurs fluorescents vifs et intenses.

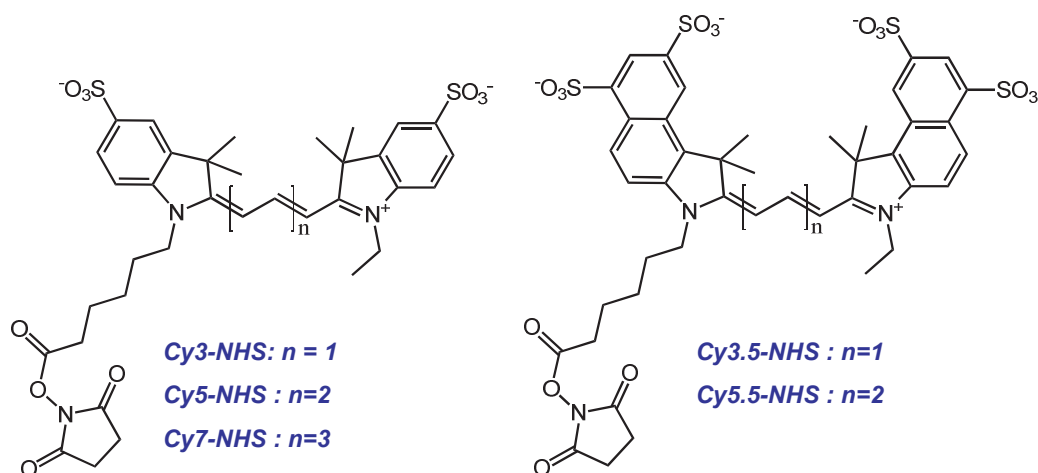


Figure II.18. Représentation de différentes molécules de Cyanine sous leur forme activée (ester NHS). Adaptée de GE Healthcare®.

Le pont polyméthinique quant à lui est responsable du caractère fluorescent de la Cyanine et détermine sa nomenclature. La structure générale de la famille des Cyanines peut être représentée par la formule suivante : $X-(CH=CH)_n-CH=Y$ où X et Y sont les hétérocycles azotés aux deux extrémités du pont polyméthinique et n peut varier de 1 à 3 ($n=1$: Cy3, $n=2$: Cy5, $n=3$: Cy7). Plus le pont polyméthinique est long, plus les longueurs d'onde d'absorption et d'émission se rapprochent de l'infrarouge. Les Cyanines sont souvent présentées avec quatre groupements négatifs (sulfonates) de manière à augmenter leur solubilité dans l'eau et à créer des répulsions de charges entre les différents marqueurs pour éviter les interactions fluorophore-fluorophore et ainsi empêcher le quenching de luminescence (Hermanson, 2008).

La Cy5 est utilisée depuis plus de 5 ans dans l'équipe FENNEC de l'ILM pour ses propriétés spectrales dans le domaine du proche-IR (Cy5 : $\lambda_{\text{Absorbance max.}} = 649 \text{ nm}$, $\epsilon = 250\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{Emission max.}} = 670 \text{ nm}$, $\Phi > 0,28$) (Faure *et al.*, 2009 ; Bridot *et al.*, 2007). La Cy5.5 s'avère légèrement plus avantageuse que la Cy5 du fait du décalage de 15-20 nm de ses longueurs d'ondes d'absorbance et d'émission maximales vers le proche-IR par rapport à celles de la Cy5 (Cy5.5 : $\lambda_{\text{Absorbance max.}} = 675 \text{ nm}$, $\epsilon = 250\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{Emission max.}} = 694 \text{ nm}$, $\Phi > 0,28$), permettant de s'affranchir un peu plus des problèmes liés à l'absorption de la mélanine et des hémoglobines oxygénée et désoxygénée. Ainsi, le marquage fluorescent des SRPs est désormais réalisé avec de la Cy5.5 (Lux *et al.*, 2011).

II.3.2. Greffage de la Cy5.5 aux nanoparticules et caractérisations

Le greffage de la Cy5.5-NHS aux SRPs permet de démontrer la possibilité de couplage peptidique d'une molécule possédant une fonction acide carboxylique terminale (présentée sous sa forme active) avec les fonctions amines primaires du réseau de polysiloxane des SRPs. Pour estimer le nombre d'amines primaires accessibles en surface des SRPs, une gamme de SRPs fluorescentes est réalisée.

II.3.2.1. Réalisation d'une gamme de nanoparticules fluorescentes – Partie expérimentale

La Figure II.19 représente les différentes étapes du greffage de la Cy5.5 sur les nanoparticules. Chaque étape est réalisée à température ambiante et les concentrations des nanoparticules sont indiquées en mol/L d'élément gadolinium.

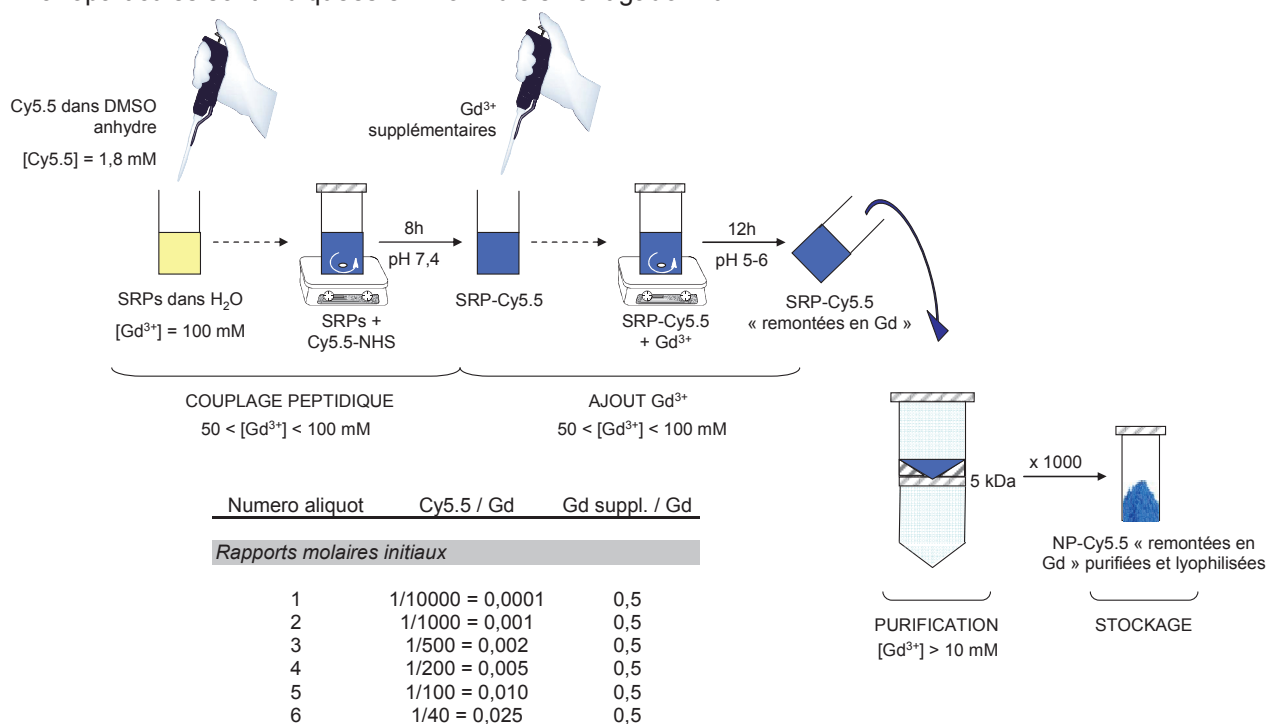


Figure II.19. Schéma représentant les différentes étapes de greffage de la Cy5.5 sur les nanoparticules et Tableau indiquant les rapports molaires de Cy5.5 et d'ions Gd^{III} supplémentaires introduits par rapport à la quantité de Gd^{III} initiale.

Les SRPs sont redispersées dans l'eau ([Gd³⁺] = 100 mM) tandis que la Cy5.5-NHS est dissoute dans du DMSO anhydre ([Cy5.5] = 1,8 mM). Les SRPs sont réparties en six aliquots et la quantité de Cy5.5-NHS désirée est ajoutée à chacun des aliquots selon le tableau de la Figure II.19. Pour que les SRPs soient soumises aux mêmes conditions, le volume de DMSO est égalisé dans chacun des aliquots. Le pH est ajusté à 7,4 dans chacun des aliquots et les solutions sont agitées pendant 8h. Des ions Gd^{III} supplémentaires sont ajoutés à chacun des aliquots *via* une solution aqueuse préparée à partir de GdCl₃.6H₂O (rapport molaire Gd supplémentaire / Gd initial = 0.5 / 1). Le

pH de chacun des aliquots est ajusté à 5-6 et les solutions finales sont agitées pendant 12h. Enfin, les SRPs sont purifiées par filtration tangentielle jusqu'à un facteur 1000 minimum, sur une membrane de 5 kDa, de manière à éliminer le fluorophore non conjugué, le NHS hydrolysé (issu de la Cy5.5) et les ions Gd^{III} non chélatés. Le pH des solutions aqueuses de SRPs fluorescentes purifiées est ajustés à 7,4 puis ces solutions aqueuses sont lyophilisées. Les SRPs **1** à **6** (selon la quantité de Cy5.5 contenue) peuvent ainsi être stockées de manière stable pendant plusieurs mois, sans altération, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

II.3.2.2. Rendements de greffage des nanoparticules fluorescentes

Les spectres d'absorption UV-visible des différentes SRPs fluorescentes **1** à **6** sont enregistrés et comparés avant et après purification. Les *maxima* d'absorption des SRPs **1** à **6** (679 nm) (Figure II.20. (A)) sont légèrement décalés par rapport au maximum d'absorption de la Cy5.5 seule (675 nm).

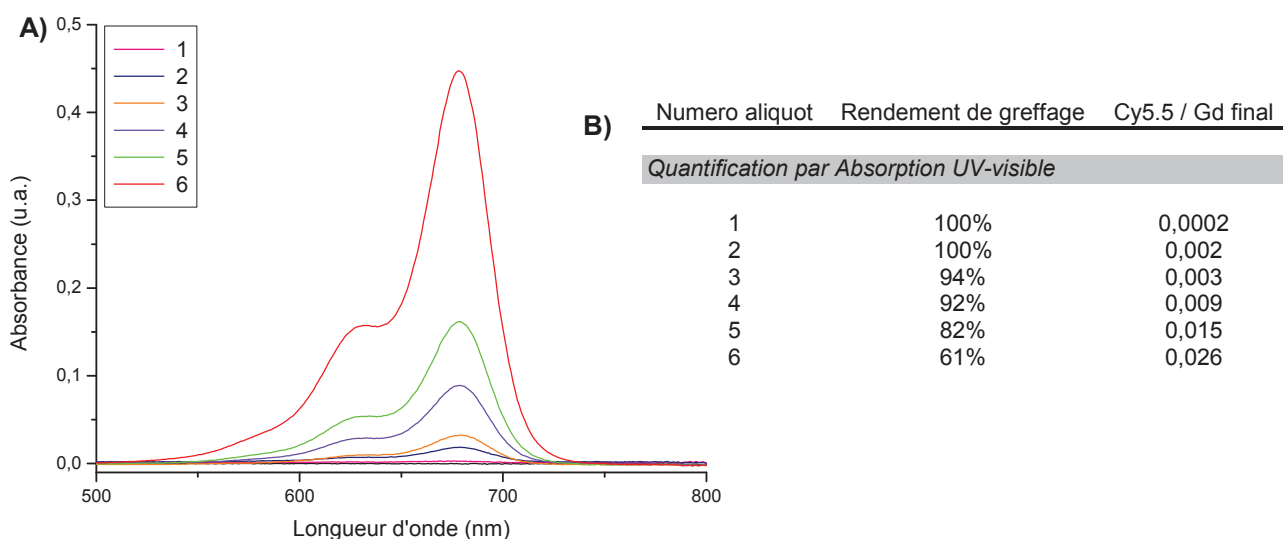


Figure II.20. (A) Spectres d'absorption UV-visible des SRPs fluorescentes **1** à **6** après purification. (B) Rendements de greffage de la Cy5.5 et rapports molaires Cy5.5/Gd finaux calculés à partir des spectres d'absorption UV-visible avant et après purification des SRPs.

Les calculs de rendements de greffage de la Cy5.5 sont réalisés à partir des *maxima* d'absorption avant et après purification (Figure II.20. (B)). Plus la quantité de Cy5.5 introduite est élevée, plus les rendements de greffage diminuent, ce qui s'explique par la diminution de l'accessibilité des sites de greffage et l'encombrement stérique au fur et à mesure du greffage de la Cy5.5 sur les nanoparticules. Lors de la purification, la Cy5.5 non greffée ainsi que les nanoparticules dont la masse moléculaire était inférieure à celle de la membrane, à savoir 5 kDa, sont éliminées : c'est la raison pour laquelle les rapports molaires Cy5.5/Gd finaux sont plus élevés que les initiaux (Figure II.20. (B)).

Cette étude démontre l'accessibilité des amines primaires en surface des SRPs. Cette gamme de SRPs fluorescentes est ensuite testée *in vivo*, de manière à observer leur biodistribution et à

démontrer que la modification de surface des SRPs par la Cy5.5 a relativement peu d'influence sur leur biodistribution.

II.3.2.3. Etude de la biodistribution des SRPs fluorescentes par imagerie de fluorescence

Les études de biodistribution des SRPs fluorescentes sont réalisées sur des souris porteuses de tumeurs issues de deux lignées cellulaires différentes : HEK293(β 3), lignée de cellules rénales embryonnaires humaines, et TS/A-pc, lignée de cellules de carcinome mammaire murin. A la différence de la lignée cellulaire HEK293(β 3), la lignée TS/A-pc est connue pour favoriser l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs par effet EPR. Cette différence est liée aux temps de croissance tumorale : 10 jours pour la lignée TS/A-pc contre 6 semaines pour la lignée HEK293(β 3) pour l'obtention d'une tumeur de 5 mm de diamètre (Goutayer *et al.*, 2010) ; le développement relativement rapide des vaisseaux angiogéniques au sein des tumeurs TS/A-pc implique que la structure tumorale présente de nombreuses ouvertures, favorisant ainsi le ciblage passif par effet EPR.

Les objectifs de cette étude sont la validation de l'élimination rénale des SRPs fluorescentes, l'observation d'un éventuel changement de biodistribution du fait de la modification de surface des SRPs (avec plus ou moins de Cy5.5) et d'une éventuelle accumulation dans les tumeurs issues de la lignée cellulaire TS/A-pc par effet EPR.

Deux séries de douze souris *nude* porteuses de xénogreffes HEK293(β 3) ou TS/A-pc selon la série sont préparées. Les SRPs fluorescentes sont injectées par intraveineuse dans la veine de la queue des souris. Chaque SRP fluorescente est injectée quatre fois en tout : deux souris par lignée cellulaire. Ainsi, les résultats sont présentés sous forme de moyenne sur deux souris pour chaque lignée cellulaire. L'imagerie de fluorescence de ces souris est réalisée à différents temps après l'injection (200 μ L, [Gd³⁺] ~ 2,5 mM) : 30 min, 1,5 h, 3 h, 5 h et 24 h. Les souris sont sacrifiées à 24 h et une image de la fluorescence du sang et des différents organes est réalisée afin de quantifier la fluorescence contenue dans chaque organe : la Figure II.21 présente la biodistribution des SRPs fluorescentes dans les souris *nude* porteuses de xénogreffes TS/A-pc par imagerie de fluorescence.

La biodistribution des SRPs fluorescentes dans les souris *nude* porteuses de xénogreffes HEK293(β 3) par imagerie de fluorescence étant relativement semblable à celle des souris *nude* porteuses de xénogreffes TS/A-pc – à l'exception de la tumeur où la quantité des SRPs fluorescentes dans la tumeur ne se détache pas de celle mesurée dans les autres organes du fait de l'absence d'effet EPR sur cette lignée cellulaire – les données ne sont pas présentées.

Les images de fluorescence des souris à 30 min après injection (données non présentées) démontrent que les SRPs fluorescentes présentent une biodistribution importante avec une excrétion rénale rapide. L'élimination par voie rénale est confirmée par l'observation des organes, et plus particulièrement des reins, après dissection des animaux, 24 h après injection (Figure II.21. (B)).

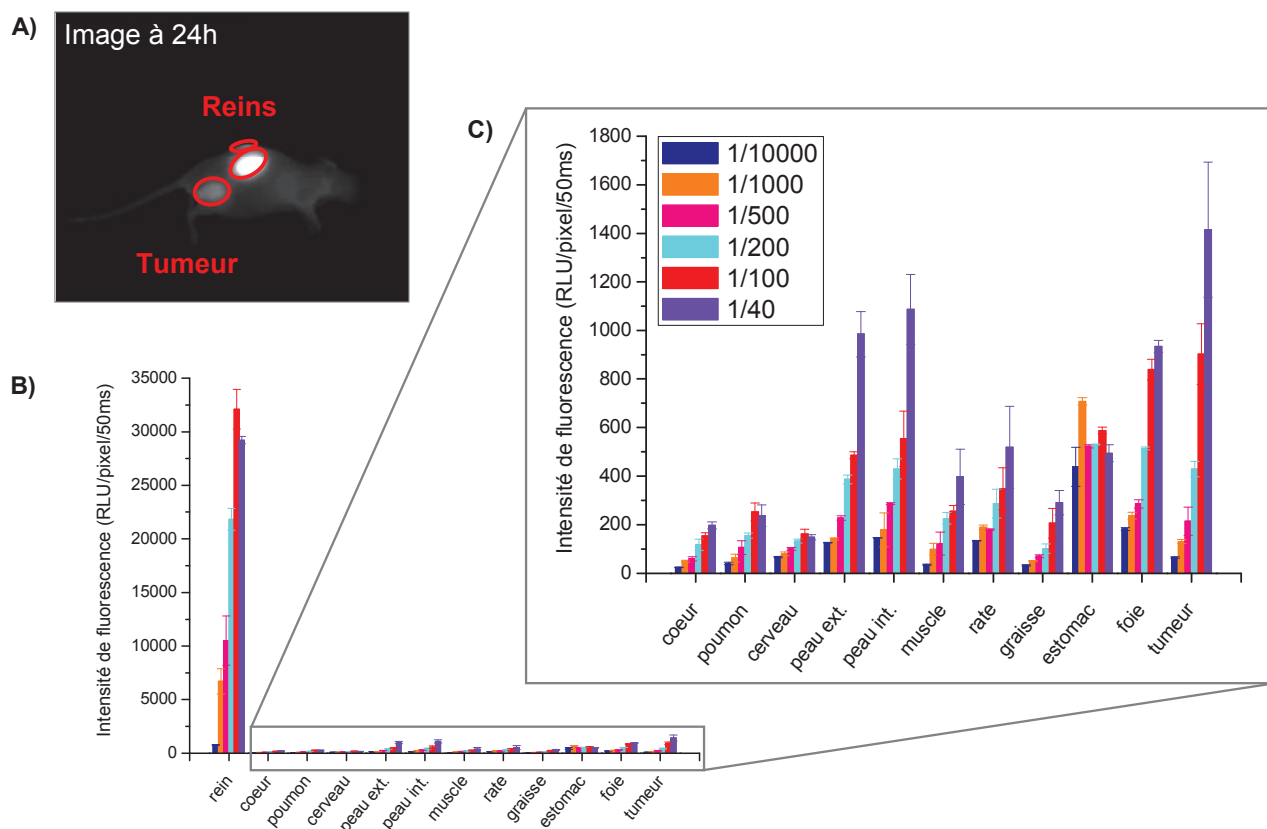


Figure II.21. (A) Image de fluorescence *in vivo* d'une souris *nude* porteuse d'une xénogreffe TS/A-pc à 24 h après injection IV de SRPs fluorescents (200 μ L, $[Gd^{3+}] \sim 2,5$ mM) dans la veine caudale. **(B)** Biodistribution des SRPs fluorescents 24 h après injection dans les souris *nude* porteuses de xénogreffes TS/A-pc. **(C)** Agrandissement de la figure (B) (sans la fluorescence du rein).

Comme attendu, une légère accumulation passive due à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) est observée dans les tumeurs issues de la lignée TS/A-pc (Figure II.21. (A) et (C)). L'injection ayant été réalisée à une même concentration en gadolinium, l'intensité de fluorescence dans les organes augmente avec la quantité de Cy5.5 introduite dans les SRPs (Figure II.21. (B) et (C)).

II.3.2.4. Etude de la biodistribution des SRPs fluorescentes par ICP-OES

Les reins, foies et tumeurs sont conservés pour le dosage du gadolinium par spectrométrie par torche à plasma – spectrométrie d'émission optique (ICP-OES). Pour ce faire, les organes sont préparés en plusieurs étapes : ils sont décongelés, puis séchés à l'étuve à 80 °C pendant 48 h, ensuite immergés dans l'eau régale et minéralisés à 80 °C pendant 48 h et enfin redispersés dans la matrice (5 % HNO_3 – 95 % H_2O) servant à réaliser les analyses par ICP-OES. Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution commerciale à 1000 ppm de gadolinium dans cette même matrice (5 % HNO_3 – 95 % H_2O).

Lors de l'ionisation des échantillons, trois raies caractéristiques de l'élément gadolinium sont observées (335,048 nm, 342,246 nm et 336,224 nm) et trois répliques par raie sont réalisées afin de garantir la reproductibilité des mesures. La gamme d'étalonnage permet de remonter à la quantité de gadolinium contenue dans chacun des organes. Les Figures II.22 (A) et (B) illustrent la moyenne sur deux souris xénogreffées respectivement HEK293(β 3) et TS/A-pc de la quantité de gadolinium restant dans les reins, foies et tumeurs 24 h après injection (en ng par mg d'organe) pour chaque SRP fluorescente.

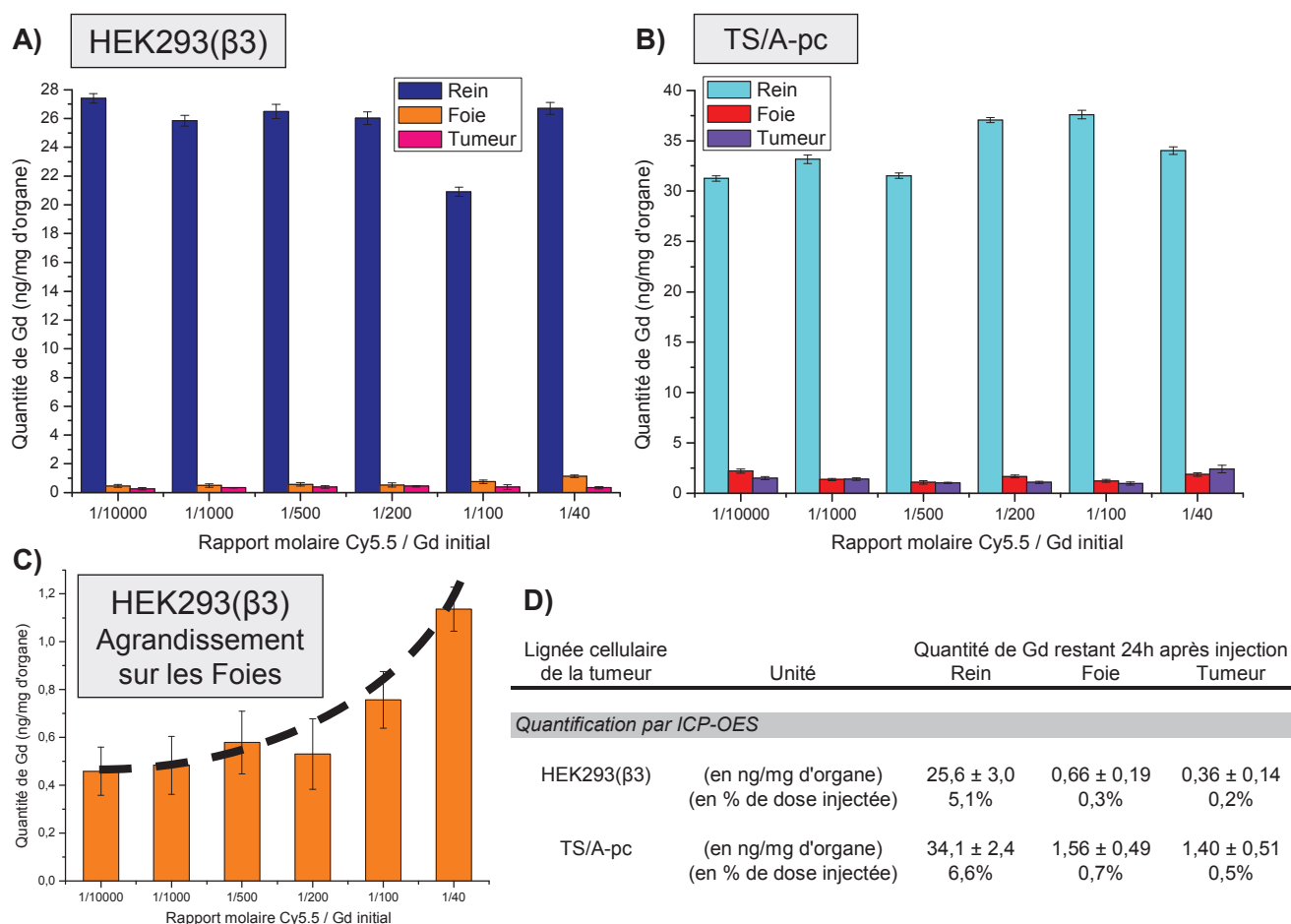


Figure II.22. (A) Lignée HEK293(β 3) : Quantité de gadolinium restant dans les reins, foies et tumeurs 24 h après injection (en ng/mg d'organe) en fonction des SRPs fluorescentes. (B) Lignée TS/A-pc : Quantité de gadolinium restant dans les reins, foies et tumeurs 24 h après injection (en ng/mg d'organe) en fonction des SRPs fluorescentes. (C) Agrandissement sur les foies de la figure (A). (D) Moyenne des quantités de gadolinium restant dans les reins, foies et tumeurs 24 h après injection (en ng/mg d'organe et en pourcentage de dose injectée) pour chaque lignée.

L'analyse des organes après dissection des animaux par ICP-OES permet de confirmer l'hypothèse de l'élimination par voie rénale ($DH < 5$ nm) (Figure II.22. (A) et (B)). En effet, 24 h après injection, il reste 5 à 7 % de la dose injectée en gadolinium dans les reins (Figure II.22. (D)). Le foie, lui, accumule 9 à 17 fois moins de SRPs : 0,3 % de la dose injectée en gadolinium après sacrifice de l'animal, en moyenne, reste dans le foie pour la série HEK293(β 3), contre 0,7 % pour la série TS/A-pc (Figure II.22. (D)). D'autre part, la quantité de gadolinium restant dans le foie sur la série HEK293(β 3) (Figure II.22. (C)) semble témoigner du léger caractère hydrophobe de Cy5.5 : plus la quantité de

Cy5.5 est importante sur les SRPs, plus la quantité restante de gadolinium dans le foie augmente. La Cy5.5 est susceptible d'apporter un caractère légèrement hydrophobe aux SRPs, responsable de son accumulation dans le foie. Cependant, les quantités de SRPs contenues dans le foie (0,3-0,7 % de la dose injectée), comparées à celles contenues dans les reins (5-7 % de la dose injectée) sont négligeables et l'élimination par voie rénale reste favorisée.

Les quantités de gadolinium restant 24 h après injection sont plus élevées dans les reins, foies et tumeurs des souris xénotransplantées TS/A-pc que ceux des souris xénotransplantées HEK293(β 3) (Figure II.22. (A), (B) et (D)). Aussi, la lignée TS/A-pc étant plus favorable au ciblage passif par effet EPR que la lignée HEK293(β 3) (Goutayer *et al.*, 2010), la quantité de gadolinium 24 h après injection dans la tumeur est plus importante dans la série TS/A-pc (0,5% de la dose injectée) que dans la série HEK293(β 3) (0,2% de la dose injectée) (Figure II.22. (D)).

En résumé, l'étude réalisée sur les SRPs fluorescentes démontre une bonne biodistribution, avec une excrétion rénale rapide. De plus, le léger ciblage passif observé principalement pour la série TS/A-pc est encourageant pour les expériences à venir concernant le ciblage des tumeurs.

II.3.2.5. Confirmation du ciblage passif des SRPs fluorescentes par effet EPR

Une étude complémentaire est menée sur des SRPs fluorescentes, également marquées avec de la Cy5.5 (1 Cy5.5 / 500 Gd) dans le but de confirmer le ciblage passif de ces SRPs par effet EPR. Les SRPs fluorescentes ont été injectées par intraveineuse (200 μ L, $[\text{Gd}^{3+}] \sim 10 \text{ mM}$) à des souris porteuses de tumeurs issues de trois lignées cellulaires différentes : les deux lignées étudiées précédemment HEK293(β 3) et TS/A-pc, et une supplémentaire : U-87 MG, lignée cellulaire de glioblastome humain (Figure II.23). L'étude a été réalisée sur 3 souris par lignée cellulaire tumorale, soit 9 au total.

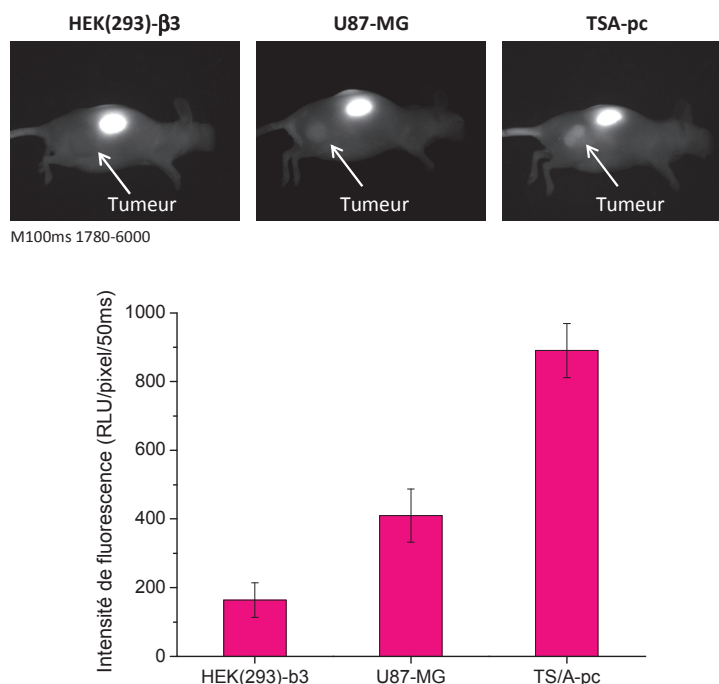


Figure II.23. Images de fluorescence *in vivo* de souris *nude* porteuses de xénotransplante issues de trois lignées différentes : HEK293(β 3), U87-MG, TS/A-pc à 24 h après injection IV des SRPs fluorescentes (200 μ L, $[\text{Gd}^{3+}] \sim 10 \text{ mM}$) dans la veine caudale et intensités de fluorescence dans les trois tumeurs 24h après injection (3 souris par lignée).

Ces images de fluorescence *in vivo* et les intensités de fluorescence mesurées dans les tumeurs 24h après injection démontrent l'existence d'un ciblage passif des SRPs fluorescentes. Les SRPs s'accumulent par effet EPR dans les tumeurs issues des lignées cellulaires TS/A-pc et U87-MG. Les tumeurs issues de la lignée cellulaire HEK293(β_3) se développant moins rapidement : elles sont moins favorables à l'effet EPR ; c'est la raison pour laquelle le ciblage passif des SRPs n'est pas observé.

Cette étude a permis de démontrer le potentiel de ciblage passif par effet EPR des SRPs et de sélectionner les modèles tumoraux de lignées cellulaires appropriés pour les études de biodistribution à venir. La lignée cellulaire TS/A-pc favorise le ciblage passif tandis que la lignée HEK293(β_3) n'y est pas favorable. En revanche, cette dernière est modifiée génétiquement et surexprime fortement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, alors que la lignée TS/A-pc ne l'exprime que naturellement. En d'autres termes, la lignée TS/A-pc est adaptée pour la démonstration d'un ciblage passif des SRPs tandis que la lignée HEK293(β_3) semble plus adaptée pour l'observation d'un ciblage actif des SRPs qu'il faudra alors vectoriser par des peptides contenant le motif RGD. Or, le ciblage actif ne peut avoir lieu qu'après un ciblage passif (*cf.* Chapitre I). Par conséquent, le modèle de lignée cellulaire HEK293(β_3) semble uniquement adapté pour des applications *in vitro*. La lignée cellulaire U87-MG apparaît alors comme le meilleur compromis entre ciblage passif et ciblage actif.

II.4. Conclusion

Ce chapitre a abordé trois points principaux et nécessaires aux réactions de greffage de molécules organiques aux SRPs. La compréhension du mécanisme de couplage peptidique utilisant la chimie standard du carbodiimide est primordiale pour réaliser le greffage de molécules sur les SRPs dans les conditions les plus favorables. L'estimation du nombre de ligands DOTA vacants par phosphorescence s'avère essentiel pour le greffage de molécules terminées par une fonction amine primaire sur les SRPs. Enfin, l'accessibilité des fonctions amines primaires a été démontrée par le greffage de la Cy5.5-NHS aux SRPs et a permis d'observer la biodistribution des nanoparticules fluorescentes *in vivo*, prometteuse pour les études de ciblage à venir.

Le greffage covalent des trois vecteurs présentés dans le Chapitre I aux SRPs fait l'objet des trois chapitres suivants. Chacun de ces chapitres présente la molécule ciblante en question, le couplage covalent du vecteur aux SRPs, la quantification du nombre de vecteurs greffés par SRP et les tests de ciblage mis en place selon les cibles visées.

Chapitre III

Fonctionnalisation des SRPs avec un peptide cyclique contenant le motif RGD pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

III. Fonctionnalisation des SRPs avec un peptide cyclique contenant le motif RGD pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

III.1. INTRODUCTION	133
III.1.1. L'ANGIOGENESE	133
III.1.2. L'INTEGRINE $\alpha_v\beta_3$	134
III.1.3. DIFFERENTES APPLICATIONS DES PEPTIDES CONTENANT LE MOTIF RGD	135
III.1.4. OPTIMISATION DE LA STRUCTURE, DE LA CONFORMATION SPATIALE ET DE LA COMPOSITION DU PEPTIDE CONTENANT LE MOTIF RGD	135
III.1.4.1. PEPTIDES LINEAIRES <i>VERSUS</i> PEPTIDES CYCLIQUES	135
III.1.4.2. PENTAPEPTIDES CYCLIQUES <i>VERSUS</i> HEXAPEPTIDES CYCLIQUES	136
III.1.4.3. COMPOSITION DU PENTAPEPTIDE CYCLIQUE CONTENANT LE MOTIF RGD – CHOIX DES ACIDES AMINES EN POSITION 4 ET 5	137
III.1.4.4. PEPTIDE FINAL SELECTIONNE POUR LE COUPLAGE AUX SRPs EN VUE D'UN CIBLAGE ACTIF DE L'INTEGRINE $\alpha_v\beta_3$	138
III.1.5. PRESENTATION MULTIMERIQUE DU PEPTIDE POUR UNE AFFINITE POUR L'INTEGRINE $\alpha_v\beta_3$ ACCRUE	139
III.2. ARTICLE	139
III.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	173
III.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DU C(RGDFK) AUX SRPs	173
III.3.1.1. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (IR)	173
III.3.1.2. SPECTROMETRIE DE MASSE (SM)	174
III.3.1.3. SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE UV-VISIBLE	177
III.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DU C(RGDFK) AUX SRPs	178
III.3.2.1. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	178
III.3.2.2. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	181
III.3.2.3. ANALYSE ELEMENTAIRE	184

III.3.2.4. RECAPITULATIF DES 3 TECHNIQUES AYANT PERMIS L'ESTIMATION DE LA QUANTITE DE c(RGDFK) PAR SRP	185
III.4. CONCLUSION	186

III.1. Introduction

Le développement embryonnaire, ainsi que les processus physiologiques et pathologiques développés à l'âge adulte tels que la cicatrisation d'une plaie, l'ovulation et les menstruations, sont régulés par l'angiogenèse. Ce phénomène, qui régit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du système vasculaire existant, est également prépondérant dans la croissance des tumeurs et des métastases : il fournit les tissus en oxygène et en éléments nutritifs essentiels. Lorsque la taille des tumeurs dépasse quelques mm^3 , la diffusion seule ne suffit plus à approvisionner les cellules tumorales avec les quantités nécessaires en oxygène et en éléments nutritifs essentiels. La croissance tumorale n'est alors possible qu'une fois le réseau vasculaire développé en direction de la masse de croissance. Ce « switch angiogénique » est un phénomène commun à la plupart des néoplasies malignes (Gaertner *et al.*, 2012 ; Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Nussenbaum *et al.*, 2010).

III.1.1. L'angiogenèse

Au cours de la croissance tumorale, l'angiogenèse est induite par divers *stimuli*. La diffusion d'oxygène étant limitée, l'hypoxie de la tumeur est provoquée par la rapide prolifération cellulaire. L'hypoxie tissulaire est un *stimulus* déterminant dans la croissance de la vascularisation tumorale et entraîne la stabilisation des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs : Hypoxia-Inductible Factors) et des gènes cibles de HIF-1 α (Prager *et al.*, 2012). Les HIFs sont des protéines qui agissent comme des facteurs de transcription dans les tissus régulés par l'absence d'oxygène et HIF-1 α est le complexe le plus actif de la famille des HIFs. Plus de 100 gènes cibles de HIF-1 α , impliqués dans la métastase, l'angiogenèse, le métabolisme énergétique, la différenciation cellulaire ou l'apoptose des cellules tumorales, ont été identifiés à ce jour (Liu *et al.*, 2012 ; Prager *et al.*, 2012 ; Nussenbaum *et al.*, 2010) ; parmi ces gènes régulés par HIF-1 α :

- de nombreux facteurs ou récepteurs de croissance pro-angiogéniques : VEGF, HGF, FGF (signifiant respectivement Vascular Endothelial, Fibroblast, ou Hepatocyte – Growth Factors), etc.,
- des facteurs de transcription,
- des protéines et protéases de la matrice extracellulaire : uPAR (récepteur de l'urokinase), MMPs (Matrix Metalloproteinases), etc.,
- des molécules d'adhésion cellulaire (récepteurs d'adhésion tels que les intégrines).

Les intégrines ont plus particulièrement retenu notre attention. La formation de vaisseaux sanguins dépend essentiellement de la matrice extracellulaire, où les intégrines sont les récepteurs d'adhésion cellulaire principaux : elles lient les protéines de la matrice au cytosquelette. Les intégrines sont des récepteurs de surface cellulaire hétérodimères, constitués de deux sous-unités transmembranaires liées de manière non covalente : α et β (18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes, avec 24 combinaisons différentes de sous-unités existantes à ce jour) (Figure III.1). Ce sont des protéines transmembranaires dont l'une des extrémités interagit avec les protéines de la

matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine, vitronectine, etc.) tandis que l'autre extrémité interagit avec des protéines intracellulaires. Les intégrines arbitrent l'attachement des cellules endothéliales aux protéines de la matrice extracellulaire, mais elles agissent également comme des molécules transductrices bidirectionnelles transmettant des signaux de l'extérieur vers l'intérieur des cellules et inversement, régulant ainsi l'adhésion, la propagation, la mobilité et la survie cellulaires (Gaertner *et al.*, 2012 ; Prager *et al.*, 2012 ; Colombo *et al.*, 2010 ; Nussenbaum *et al.*, 2010 ; Beer *et al.*, 2008).

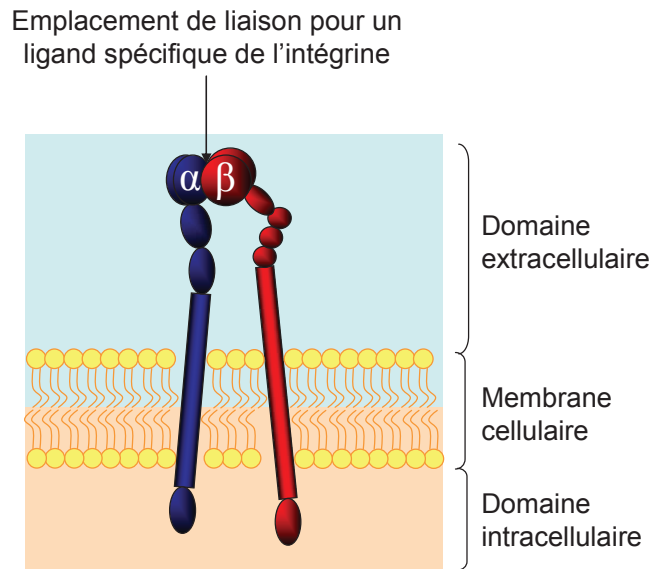


Figure III.1. Représentation schématique des intégrines (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Schottelius *et al.*, 2009).

III.1.2. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Parmi toutes les intégrines, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la plus étudiée, en raison de son rôle primordial dans l'angiogenèse. Elle est fortement exprimée par les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale tout juste formée, mais aussi par les cellules tumorales de certains cancers (comme le mélanome, le glioblastome, et les cancers de l'ovaire et du sein), tandis que les cellules endothéliales latentes et autres cellules non-cancéreuses ne l'expriment pas ou très faiblement. Ainsi, le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permet d'atteindre aussi bien les cellules endothéliales angiogéniques que les cellules tumorales. La séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp (RGD) – également présente dans les protéines matricielles, comme la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine et l'ostéopontine – est un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. De nos jours, un large éventail de molécules et de systèmes macromoléculaires aux propriétés intrinsèques variées et intégrant la séquence peptidique RGD a été développé afin de mettre en évidence les diverses réponses cellulaires existantes (Danhier *et al.*, 2012 ; Lee M.H. *et al.*, 2012 ; Ventre *et al.*, 2012 ; Snoeks *et al.*, 2010 ; Schottelius *et al.*, 2009 ; Perlin *et al.*, 2008 ; Haubner *et al.*, 1999).

III.1.3. Différentes applications des peptides contenant le motif RGD

La séquence RGD est utilisée en imagerie médicale pour suivre la progression de l'angiogenèse. Le greffage de ce tripeptide à un agent d'imagerie conventionnel permet de tirer parti du processus de reconnaissance du motif RGD par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, spécifique à l'angiogenèse et à certaines cellules tumorales (Li Z.H. *et al.*, 2012 ; Ventre *et al.*, 2012 ; Dobrucki *et al.*, 2010 ; Beer *et al.*, 2008). De nombreuses sondes ciblantes ont alors été développées pour les différents types d'imagerie médicale existants comme la TEMP (Briat *et al.*, 2012 ; Johnson *et al.*, 2008), la TEP (Wadas *et al.*, 2009), l'IRM (Lin *et al.*, 2012 ; Kluza *et al.*, 2010 ; Montet *et al.*, 2006), les ultrasons (Borden *et al.*, 2008) et l'imagerie optique (Briat *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2012 ; Sancey *et al.*, 2009). Dans le cadre d'une application à visée thérapeutique, la séquence tripeptidique RGD peut également être greffée à des agents thérapeutiques de manière à optimiser la délivrance de ces agents thérapeutiques au niveau de la tumeur et ainsi améliorer leur efficacité (Li Z.H. *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2010 ; Borgman *et al.*, 2009). Enfin, l'utilisation du motif RGD comme inhibiteur de croissance tumorale est devenue une stratégie répandue pour interrompre la néovascularisation autour de la tumeur, entraînant alors la cessation du développement de la tumeur et parfois, la réduction, voire l'élimination, du volume tumoral (Li Z.H. *et al.*, 2012 ; Strijkers *et al.*, 2010 ; Cai *et al.*, 2006 ; Ferrara *et al.*, 2005).

III.1.4. Optimisation de la structure, de la conformation spatiale et de la composition du peptide contenant le motif RGD

Les SRPs (Small Rigid Platforms) décrites dans le Chapitre I disposent d'un fort potentiel théranostique. Nous avons cherché à leur greffer un peptide contenant le motif RGD, de manière à obtenir un ciblage actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et par conséquent, à maximiser l'efficacité de ces SRPs en leur conférant une spécificité.

III.1.4.1. Peptides linéaires versus peptides cycliques

D'un point de vue structural, des études antérieures ont démontré que les peptides linéaires étaient plus sensibles à la fragmentation *in vivo* par protéolyse que les peptides cycliques (Kämmerer *et al.*, 2011). De plus, une structure linéaire permet plusieurs conformations, ce qui réduit la sélectivité du peptide pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure III.2) (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Sutcliffe-Goulden *et al.*, 2002). Par conséquent, des petits peptides synthétiques cycliques contenant le motif RGD ont été développés pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette nouvelle génération de peptides cycliques apparaît plus stable que les peptides linéaires : la stabilité de la forme cyclique est due au positionnement du groupement guanidine de l'arginine par rapport au groupement acide carboxylique de l'acide aspartique (deux plans distincts dans la forme cyclique) – alors que dans le cas des peptides linéaires, les chaînes latérales de l'arginine et de l'acide aspartique sont positionnées

parallèlement dans un même plan (Kim *et al.*, 2004). D'autre part, les peptides cycliques présentent une plus forte affinité envers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ lors des tests de ciblage que leurs homologues linéaires (Kämmerer *et al.*, 2011 ; Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Fani *et al.*, 2006 ; Haubner *et al.*, 1999).

III.1.4.2. Pentapeptides cycliques *versus* hexapeptides cycliques

La sélectivité des peptides ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dépend fortement de leur conformation. Des études antérieures visant à comparer les pentapeptides cycliques aux hexapeptides cycliques contenant le motif RGD ont démontré que seuls les premiers avaient une affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En effet, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ présente un site de liaison étroit qui nécessite que la distance entre les C_β de l'arginine et de l'acide aspartique soit la plus faible possible. La distance moyenne entre les C_β de l'arginine et de l'acide aspartique est inférieure à 0,67 nm pour les pentapeptides cycliques tandis qu'elle est comprise entre 0,75 et 0,85 nm pour les hexapeptides cycliques (Figure III.2) (Mas-Moruno *et al.*, 2010).

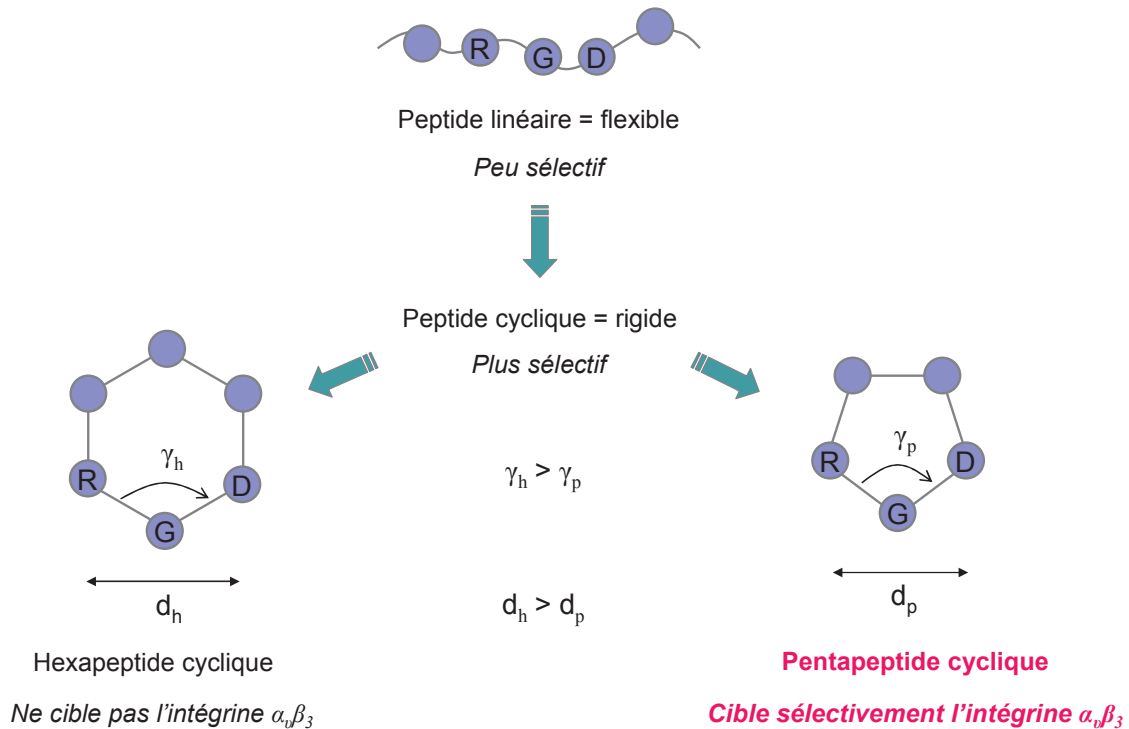


Figure III.2. Optimisation de la structure et de la conformation spatiale du peptide contenant le motif RGD. La cyclisation du peptide permet une restriction de la conformation et par conséquent, une plus grande sélectivité. La distance entre les C_β de l'arginine et de l'acide aspartique est représentée par la lettre *d*. (Mas-Moruno *et al.*, 2010)

Les pentapeptides cycliques contenant le motif RGD sont donc les plus appropriés pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

III.1.4.3. Composition du pentapeptide cyclique contenant le motif RGD – Choix des acides aminés en position 4 et 5

Dans ce paragraphe, l'ordre des acides aminés au sein du pentapeptide cyclique est fixé comme suit : c(Arg¹-Gly²-Asp³-Xxx⁴-Yyy⁵), Xxx et Yyy étant les deux acides aminés supplémentaires à définir.

Si la cyclisation des peptides restreint leurs différentes possibilités de conformation, la structure des pentapeptides cycliques reste néanmoins relativement flexible grâce aux mouvements des liaisons amides. Le comportement conformationnel des pentapeptides cycliques, et plus particulièrement celui des 5 C_α, pourrait d'ailleurs être assimilé à celui d'un cyclopentane. Le cyclopentane adoptant généralement la conformation enveloppe, 4 des 5 C_α seraient positionnés dans un unique plan. Or, pour que 4 des 5 C_α soient dans un seul et même plan, ces 4 acides aminés ne peuvent pas tous être sous la forme de l'énantiomère L. L'un d'entre eux doit être sous la forme de l'énantiomère D ou être une glycine, ce qui est le cas : Gly² (Haubner *et al.*, 1996).

Les acides aminés Xxx⁴ et Yyy⁵ supplémentaires doivent être choisis de manière stratégique car ils sont susceptibles d'affecter l'affinité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour le pentapeptide.

- Choix de l'énantiomère (L ou D) des acides aminés en position 4 et 5 (Xxx⁴ et Yyy⁵) et influence du proton de la liaison amide entre Asp³ et Xxx⁴ :

Le proton de la liaison amide entre l'acide aspartique (Asp³) et l'acide aminé en position 4 (Xxx⁴) joue un rôle primordial dans l'interaction de ciblage avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En effet, ce proton forme une liaison hydrogène avec un groupement accepteur au sein de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, 1996).

Ainsi, la proline – seul acide aminé qui présente une amine secondaire terminale – ne convient pas pour la position 4 : lorsque la proline est couplée à d'autres acides aminés, elle forme une liaison amide secondaire et ne présente alors pas de proton pour former une liaison hydrogène avec le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, 1996).

D'autre part, le proton de la liaison amide entre Asp³ et Xxx⁴ doit être orienté vers l'extérieur du pentapeptide cyclique, de manière à être disponible pour cette liaison hydrogène avec le groupement accepteur du récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour ce faire, l'acide aminé en position 4 doit nécessairement être sous la forme de l'énantiomère D et l'acide aminé en position 5 sous la forme de l'énantiomère L : c((L)Arg¹-Gly²-(L)Asp³-(D)Xxx⁴-(L)Yyy⁵). Dans le cas inverse - c((L)Arg¹-Gly²-(L)Asp³-(L)Xxx⁴-(D)Yyy⁵), le proton de la liaison amide entre Asp³ et Xxx⁴ est orienté vers l'intérieur du pentapeptide cyclique et forme une liaison hydrogène intramoléculaire (Haubner *et al.*, 1996).

Enfin, cette stratégie où l'acide aminé en position 4 est sous la forme de l'énantiomère D et celui en position 5 sous la forme de l'énantiomère L permet de réduire la distance moyenne entre les C_α de l'arginine et de l'acide aspartique (0,52 nm). Dans le cas inverse, où l'acide aminé en position 4 est sous la forme de l'énantiomère L et celui en position 5 sous la forme de l'énantiomère D, la

distance moyenne entre les C_α de Arg¹ et Asp³ est légèrement supérieure : 0,6 nm, ce qui rend l'interaction avec le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ moins favorable (Haubner *et al.*, 1996).

- Choix de l'acide aminé en position 4 (Xxx⁴):

Des études antérieures ont démontré que la présence d'un acide aminé à caractère hydrophobe en position 4 augmentait l'activité du pentapeptide cyclique. Par conséquent, la phénylalanine est souvent sélectionnée pour occuper la quatrième position (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Haubner *et al.*, 1996).

- Choix de l'acide aminé en position 5 (Yyy⁵):

Pour la position 5, en revanche, les chaînes latérales des acides aminés, qu'elles soient polaires ou non, n'ont démontré aucune influence notable sur l'activité du peptide final (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Liu, 2009 ; Haubner *et al.*, 1996). Ainsi, la lysine, qui présente une fonction amine primaire sur sa chaîne latérale, facilement modifiable et permettant alors le couplage aux SRPs, a été retenue.

III.1.4.4. Peptide final sélectionné pour le couplage aux SRPs en vue d'un ciblage actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Pour résumer, le motif RGD est un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et cette séquence ne doit pas être modifiée. L'arginine et l'acide aspartique favorisent des interactions ioniques avec le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le groupement carboxylate de l'acide aspartique coordinant des cations divalents (Figure III.3) (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Haubner *et al.*, 1996).

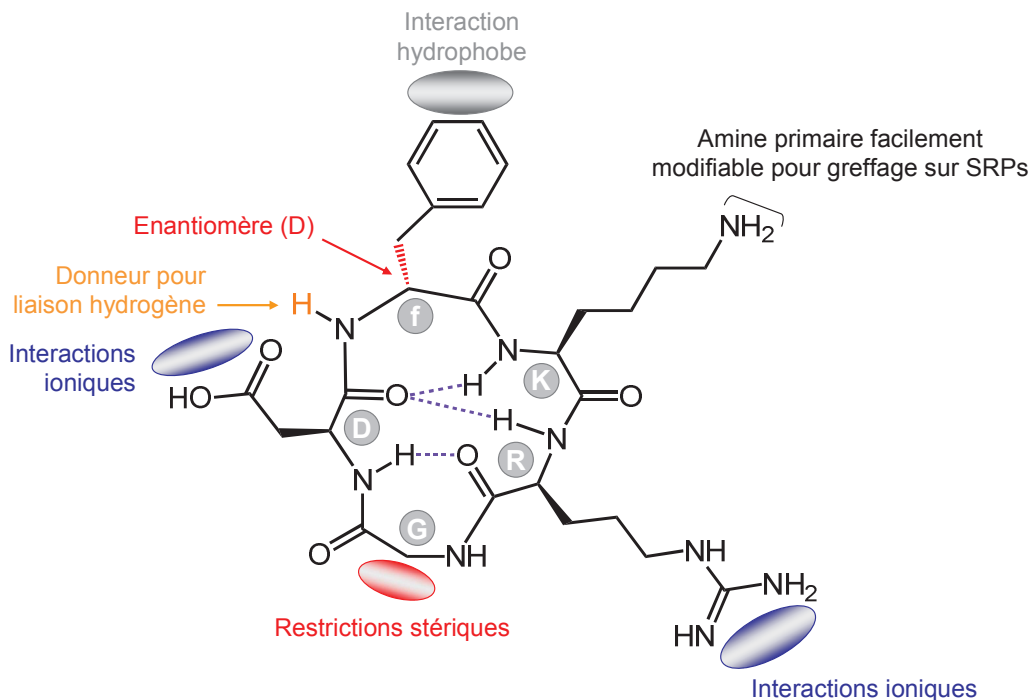


Figure III.3. Représentation du pentapeptide cyclique c(RGDfK). (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Haubner *et al.*, 1996)

Pour augmenter l'affinité avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, l'acide aminé en position 4 doit comporter une chaîne latérale hydrophobe, c'est pourquoi la phénylalanine occupe généralement cette position. Elle doit également se présenter sous la forme de l'énantiomère D, de façon à positionner le proton de la liaison amide entre les positions 3 et 4 à l'extérieur du peptide pour favoriser la liaison hydrogène avec un groupement accepteur du récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Mas-Moruno *et al.*, 2010 ; Haubner *et al.*, 1996). Enfin, l'acide aminé en position 5 n'ayant pas d'influence sur l'affinité avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons opté pour la lysine, dont la chaîne latérale présente une amine primaire permettant le greffage aux SRPs par couplage peptidique aux groupements acides carboxyliques des DOTA (Figure III.3).

Par conséquent, le pentapeptide cyclique sélectionné pour le couplage aux SRPs présente la séquence d'acides aminés suivante ((L)Arg¹-Gly²-(L)Asp³-(D)Phe⁴-(L)Lys⁵), notée c(RGDfK).

III.1.5. Présentation multimérique du peptide pour une affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ accrue

Le processus de reconnaissance naturel du motif RGD par le récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est régi par des interactions multivalentes. Ainsi, la présentation multimérique de la séquence RGD permet d'augmenter le ciblage en termes de sélectivité, d'efficacité et d'aptitude du ligand à pénétrer au sein des cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, comparée à une même densité de surface de ligands RGD présentés de manière individuelle (Lee B.W. *et al.*, 2010 ; Wängler *et al.*, 2010 ; Liu, 2009 ; Sancey *et al.*, 2009 ; Dijkgraaf *et al.*, 2007 ; Wester *et al.*, 2005 ; Boturyn *et al.*, 2004 ; Kok *et al.*, 2002 ; Mammen *et al.*, 1998). Dans cette optique, nous avons cherché à développer des SRPs présentant plusieurs motifs RGD.

III.2. Article

Nos travaux sur la fonctionnalisation des SRPs avec le pentapeptide cyclique RGDfK font l'objet de l'article ci-après, soumis à la revue *Small*.

DOI: 10.1002/sml.((please add manuscript number))

Multimodal Small Rigid Platforms functionalization with a cyclic RGD peptide for the targeting of tumors over-expressing $\alpha_v\beta_3$ integrins

Jessica Morlieras^{1}, Sandrine Dufort^{2,3*}, Lucie Sancey¹, Charles Truillet¹, Anna Mignot^{1,2,4}, Fabien Rossetti¹, Mario Dentamaro⁵, Sophie Laurent⁵, Luce Vander Elst⁵, Robert N. Muller⁵, Rodolphe Antoine⁶, Philippe Dugourd⁶, Stéphane Roux⁷, Pascal Perriat⁸, François Lux^{1*}, Jean-Luc Coll⁹ and Olivier Tillement¹*

¹ Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex (France), francois.lux@univ-lyon1.fr

² Nano-H SAS, 38070 Saint-Quentin Fallavier (France)

³ INSERM, CRI, U823, Institut Albert Bonniot, 38042 Grenoble (France)

⁴ Matériaux, Ingénierie et Sciences, INSA Lyon, UMR 5510 CNRS – Université de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex (France)

⁵ NMR & Mol. Imaging Lab., Dept. Gen. Organ & Biomed. Chem., Univ. Mons, B-7000 Mons (Belgium)

⁶ Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, UMR 5579 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex (France)

⁷ Institut UTINAM, UMR 6213 CNRS-UFC, Université de Franche-Comté, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France

⁸ Matériaux, Ingénierie et Science, UMR 5510 CNRS-INSA de Lyon, 7 Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne Cedex, France

* These authors contributed equally to the work

*Corresponding Author

Supporting Information is available on the WWW under <http://www.small-journal.com> or from the author. (delete if not applicable)

Keywords: active targeting, multimodal nanoparticles, cRGD, optical imaging, theranostic

Abstract

Gadolinium based Small Rigid Platforms (SRPs) have previously demonstrated their efficiency for multimodal imaging and radiosensitization. Since the RGD sequence is well-known to be highly selective for $\alpha_v\beta_3$ integrins, a cyclic pentapeptide containing the RGD motif (cRGDFK) has been grafted onto the SRP surface. An appropriate protocol led to the grafting of two targeting ligands per nano-object. The resulting nanoparticles have demonstrated a strong affinity for $\alpha_v\beta_3$ integrins in comparison with cRADfK grafted SRPs as the negative control. Flow cytometry and fluorescence microscopy have also been used to highlight the affinity for the nanoparticles against HEK293(β_3) and U87MG cells. Finally the grafted radiosensitizing nanoparticles were intravenously injected into *Nude* mice bearing

Submitted to **NANO MICRO**
small

sub-cutaneous U87MG tumors and the signal observed by optical imaging was twice higher for SRP-cRGDfK compared to their negative analogue.

1. Introduction

One of the main challenges in the cancer nanomedicine field is the targeted delivery of nanoparticles to solid tumors for *in vivo* molecular imaging and targeted therapy.^[1] Tumor targeting can be achieved either by passive or active process. Passive targeting takes advantages of the unique structural features of solid tumors, *i.e.* a hyperpermeable vasculature and an impaired lymphatic drainage.^[2] Thereby, this enhanced permeability and retention (EPR) effect facilitates the efficient localization of long-time circulating nanoparticles within the tumor interstitium, but cannot promote their uptake by cancer cells. Afterwards, active targeting approaches have been developed. They are based on the specific interactions between the ligands engrafted on the surface of nanoparticles and the over-expressed receptors on cancer cells and/or on microenvironment cells. This active process may promote internalization of nanoparticles through specific receptor-mediated endocytosis.^[3]

Among the biomarkers that are currently investigated for tumor targeting, the $\alpha_v\beta_3$ integrin is of particular interest.^[4] $\alpha_v\beta_3$ integrins are over-expressed in sprouting vessels and also in 25% of human cancer cells of different types (glioblastoma, melanoma, prostate, breast, ovarian cancer),^[4,5] and play a critical role in regulating tumor growth, metastasis and angiogenesis.^[6] The RGD sequence, an arginine-glycine-aspartic acid tripeptide, has been found to be highly selective for $\alpha_v\beta_3$ integrins,^[7] and its cyclic form cRGDfK designed from the peptides developed by Kessler's group provides easy conjugation useful for imaging and/or therapeutic purposes.^[7-8] Furthermore, many studies have demonstrated that a multivalent presentation of RGD peptides can significantly improve the binding affinity towards $\alpha_v\beta_3$ integrins and enhance tumor targeting capability.^[9] For these reasons, many research groups have designed

multivalent RGD nanoparticles conjugates for a variety of imaging applications, including magnetic resonance imaging (MRI),^[10] positron emission tomography (PET),^[11] single photon emission computed tomography (SPECT),^[12] ultrasound imaging,^[13] and optical imaging.^[14] Recently, RGD-targeted nanoparticles have also been successfully employed for tumor drug delivery (chemotherapeutic drugs, nucleic acids)^[15] and photothermal therapy.^[16]

In this context, we have developed “theranostic” Small Rigid Particles (SRPs), obtained *via* an original top down process. They are composed of a polysiloxane matrix bearing chelating species e.g. DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) at the surface. In a previous study, these nanoparticles have been validated as promising multimodal contrast agents used for four complementary imaging techniques, *i.e.* MRI, SPECT, CT and fluorescence imaging.^[17] This is due to the DOTA ligands whose a fraction chelates Gd^{3+} ions allowing MRI while another part remains free for radionuclide complexation (*e.g.* ^{111}In) to perform SPECT. Moreover, primary amine functions enable readily dye covalent conjugation to the polysiloxane matrix for fluorescence imaging studies. In addition, these gadolinium-based nanoparticles exhibit high radiosensitizing properties that render them hopeful therapeutic agents for radiotherapy.^[18]

They ensure rapid renal clearance thanks to their small size (<5 nm).^[19] Despite a rapid clearance from the bloodstream, the amount of circulating nanoparticles is sufficient to observe a significant accumulation in tumor tissues, due to the EPR effect. It is expected that this passive targeting combined with an active targeting, as that caused by the presence of the RGD motif onto the SRPs, should provide a more efficient accumulation of these particles in the tumor region.

Precisely, we aim to demonstrate that SRPs can be functionalized by peptides, such as cyclic RGDfK, while keeping their functionality and targeting effect both *in vitro* and *in vivo*. The targeting of cRGDfK functionalized SRPs was assessed by comparison with their non-binding

counterpart cRADfK functionalized SRPs. The cyclic peptides were engrafted to SRPs with the method used for grafting cyanine 5.5: the standard carbodiimide chemistry. Qualitative and quantitative characterizations were used to evaluate the number of grafted peptides per SRP, *i.e.* NMRD, PCS, FCS, ζ potential, MS, IR, UV-visible absorption, fluorescence spectroscopy, HPLC and Elemental Analysis. The evaluation of biological properties of cRGDfK functionalized SRPs was first performed using FCS and IC₅₀ tests. Then, cellular uptake was evaluated on different cell lines expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrin by flow cytometry and fluorescent microscopy. Finally, the fluorescently labelled SRPs-cRGDfK were injected intravenously in *Nude* mice bearing sub-cutaneous U87-MG tumors. Our work demonstrates that SRPs can be functionalized with cRGDfK peptides to obtain an efficient and active tumor targeting, both *in vitro* and *in vivo* in comparison with the negative controls (*i.e.* SRPs grafted with cRADfK peptides).

2. Results and discussion

2.1. Coupling of Cy 5.5, cRGDfK and cRADfK peptides to SRPs

2.1.1. Synthesis

SRPs were synthesized according to a route carefully described in a previous study.¹⁷ This pathway allows the formation of SRPs displaying an average 3 ± 0.1 nm hydrodynamic diameter (HD) and an average 8.5 ± 1.0 kDa molecular mass. The number of DOTA molecules per SRP was estimated at about ten.^[17] These SRPs exhibit some available primary amine functions (from the polysiloxane network) as well as carboxylic acid functions (from free DOTA ligands) for the further grafting of organic molecules. To perform grafting on the carboxylic function, only “free” DOTA ligands (*i.e.* DOTA molecules that don't chelate any gadolinium ion) can be used. The number of available DOTA molecules for further peptide coupling was determined by fluorescence titration. Roughly, small amounts of Eu³⁺ ions were

added to the nanoparticles for the chelation by the “free” DOTA ligands. An increase of the luminescence intensity ($\lambda_{\text{excitation}} = 395 \text{ nm}$) at 593 nm and 615 nm was observed during the titration until a plateau is observed. The increase of the intensity is due to the luminescence of the chelated Eu^{3+} ions that is orders of magnitude higher than that of unchelated Eu^{3+} ions that is quenched by water molecules (See Supporting Information). Ratios of about 30% of DOTA ligands chelating a Gd^{3+} ion and 70% of “free” DOTA molecules were observed for the so-prepared SRPs.

Some SRP *in vivo* biodistribution and biological implementations require near infrared fluorescence; therefore, when needed, a Cy5.5 dye was grafted onto the SRPs. Cy5.5-NHS was covalently conjugated to amine functions present within the polysiloxane network while cyclic RGDfK and RADfK peptides were covalently grafted to carboxylic acid functions from free DOTA molecules *via* the amine function of the Lysine (See **Figure 1**). The carboxylic acid functions were activated by EDC/NHS before peptide addition.

2.1.2. Characterization of grafted SRPs

The coupling of cRGDfK on the nanoparticles led to an increase of the hydrodynamic diameter (HD increases from $3.4 \pm 0.5 \text{ nm}$ for the native SRPs to $8.4 \pm 0.5 \text{ nm}$ for SRP-cRGDfK) (**Figure 2. (A)**) These results were confirmed by FCS studies (**Figure 2. (C)**) for Cy 5.5 bearing SRPs. By coupling the cyclic RGDfK peptide onto the SRP surface, a slightly higher surface charge is expectedly observed in comparison with ungrafted SRPs (**Figure 2. (B)**). The presence of the cRGDfK was also confirmed by IR analysis (See Supporting Information) with the large increase of the $1500\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$ band, that includes the 1654 cm^{-1} band generally assigned to amides (C=O stretching vibrations), the 1636 cm^{-1} band assigned to the guanidine group (C-N stretching vibrations)^[20] and the 1598 cm^{-1} band assigned to primary amides (N-H bending vibrations).

Submitted to **small** NANO MICRO

Cyclic RGDfK peptide covalent conjugation to SRPs was also confirmed by mass spectrometry. For this, SRPs were first subjected to Electrospray Ionization (ESI) to generate ions in the gas phase and to obtain mass-to-charge information. As the SRPs contain ionized multiple groups (*e.g.* [Gd^{III}(DOTA)] complexes), a distribution of charge states is often observed in the mass-to-charge spectrum. Those molecules can sustain multiple charges, which gives rise to an “envelope” of peaks in the spectrum. A multiplicative correlation algorithm (MCA)^[21] was used to estimate the mass of the SRPs from the mass-to-charge spectra produced by the ESI-MS (See Supporting Information). The main distribution for the SRP-cRGDfK particles was around 10.1 ± 0.4 kDa with a broader distribution at ~ 8.7 kDa. Charge states up to 8 were observed. This indicates that the carboxylic acid functions borne by the aspartic acid of the cyclic RGDfK peptide might decrease the number of negative charges of the SRP-cRGDfK compared to ungrafted SRPs in the positive mode. As a result, the charging capacity for functionalized SRPs with cRGDfK was, in this mode, higher than for the unfunctionalized SRPs in this mode.

The m/Z 1217 peak in the positive mode of the ESI spectrum is characteristic of cRGDfK functionalized SRPs ; its corresponding m/Z 1215 peak in the negative mode was assigned to the [Gd^{III}(DOTA-cRGDfK)(H₂O)]⁻ fragment, as evidenced by the isotopic distribution (see **Figure 3**). This result was confirmed by CID (Collision-Induced Dissociation) analyses on this fragment (see Supporting Information). This m/Z 1215 peak highlights the covalent conjugation of the cRGDfK peptide to the DOTA molecules *via* the primary amine side-chain group of the Lysine. This conjugation only involves Gd³⁺ chelating DOTA since the free DOTA were conjugated to Gd³⁺ cations by addition of a gadolinium solution after the conjugation of the peptides in order to increase the r_1 of the SRPs.

Moreover, some details about the SRP structure had already been reported in earlier ESI-MS studies for low m/Z ratios in the negative mode¹⁷. For example, it was noticed that the m/Z

Submitted to **NANO MICRO**
small

749 peak was specific to $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA}-\text{Si}(\text{OH})_3)]^-$ fragment, namely the $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ complex borne by a silanetriol, belonging to the polysiloxane network (Figure 3). The negative charge was shared out by the four carboxylic acids from the DOTA molecule. As expected, this peak at m/Z 749 was observed for both unfunctionalized and functionalized SRPs. An additional peak at m/Z 630 was observed for both SRPs, matching an amide bond cleavage between DOTA and APTES molecules by loss of the $[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OH})_3]$ fragment.^[22] This cleavage is accompanied by the creation of a C=C double bond, as the coordination number of Gd^{III} varies between 8 and 9, a water molecule addition in its coordination sphere (See Figure 3). Besides, the m/Z 1215 fragment completely fits with the m/Z 630 peak, adding the cRGDfK mass (603 Da) and removing the mass of a water molecule to allow the amide bond formation between the DOTA molecule and the peptide. This confirms again our conclusion upon the covalent conjugation of the cRGDfK peptide to the SRPs.

The proton longitudinal relaxation rates for SRP-cRGDfK were measured at 310K, *i.e.* 37°C, between 0.01 and 300 MHz on SRP-cRGDfK and compared with native SRPs and classical $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ complexes. A higher relaxivity is observed for the cRGDfK functionalized SRPs in comparison with ungrafted SRPs regardless of the frequency used (See **Figure 4**). The increase of the longitudinal relaxivity is certainly due to an increase of the mass (due to the grafting of the peptide) and of the rigidity of the structure resulting in a slowdown of the rotation rate of the relaxing species.

2.1.3. Quantification of the number of peptides by complementary techniques

The quantification of the cRGDfK and Cy5.5 present in each particle has been obtained by complementary techniques. The UV-visible absorption spectrum of SRPs displays a specific intense peak at 295 nm and permits to evaluate the grafting of Cy5.5 thanks to its absorption

Submitted to **NANO MICRO**
small

peak at 680 nm after careful purification of all the ungrafted fluorophores. Evaluation of gadolinium was performed thanks to ICP-OES and validated by measurement of the longitudinal relaxivity at 60 MHz (See **Table 1**).

cRGDfK displayed four non intense specific peaks ($\epsilon < 100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), from which three were thin and close together ($\lambda = 252, 258$ and 264 nm) and the remaining one was larger and flattened ($\lambda \sim 308 \text{ nm}$). UV-visible absorption spectra of the peptide grafted SRPs demonstrated the coupling of cRGDfK on the nanoparticles although, the presence of the relatively intense absorption peak of the nanoparticles at 295 nm makes impossible the quantification of the peptide by this technique.

Fluorescence spectroscopy was then used to determine the peptide grafting rate. Taking into account the UV-visible excitation spectra of the peptide, the excitation wavelength was first set to 250 nm. However the peptide fluorescence emission spectrum displayed a global signal, being the result of two contributions: water Raman and peptide emissions. To remove the contribution of the water Raman whose spectral position, depends, in aqueous solution, on the excitation wavelength according to equation 1:^[23]

the excitation wavelength was simply shifted by 10 nm to 240 nm (In the equation, $\lambda_{em \text{ water Raman peak}}$ is the emission wavelength of the water Raman peak and λ_{exc} the excitation wavelength). This is sufficient to separate the two contributions, in order to solely observe the peptide fluorescence emission so avoiding gadolinium luminescence. To determine the quantity of peptide grafted per RGD, a standard fluorescence curve was plotted for different concentrations of peptide in presence of the same amount of nanoparticles (See **Figure 5**). These spectra displayed two peaks: the widest and less intense, with a fluorescence maximum emission at 282 nm, was specifically assigned to the cyclic RGDfK peptide; its intensity varied linearly according to its concentration (Figure 5B). The other peak, with a fluorescence maximum emission at 261 nm was attributed to water Raman; its intensity doesn't depend of

the concentration of the peptide. Using such a calibration, a concentration of about 2 peptides per nanoparticle has been obtained (See **Table 2**)

Considering UV-visible absorption and emission fluorescence spectra, three specific wavelengths were selected to perform HPLC measurements. The UV-visible absorption detector wavelength was set to 295 nm; indeed, this wavelength is specific to SRPs and enabled the detection of SRP of any type (functionalized or not). Fluorescence emissions were simultaneously measured at two different wavelengths: 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) and 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm) to observe the signals due to cRGDfK and Cy5.5 respectively. The samples were loaded into the injection loop and the corresponding chromatograms were collected after elution of a gradient of solvent (**Figure 6. (A), (B) and (C)**).

The major signal proportion detected by UV-visible absorption at 295nm was spotted at retention times ranging from 13 to 23 min. The smallest peak at 2.5 min was assigned to degradation fragments and remained negligible with respect to the previous signal. The experiment at 295 nm (Figure 6(A)) shows a shift of the peak from 13.7 min to higher retention times as a result of the grafting of peptides and/or cyanine. After Cy5.5 grafting, a certain proportion of the SRPs remains unfunctionalized since some particles are still detected corresponding to retention times around 13.7 min. The particles effectively functionalized by Cy5.5 are characterized by retention times around 15.2 min. On the contrary, after peptide grafting, all the particles are functionalized, the unique peak at 16 min being assigned to SRP-cRGDfK. These hypotheses were confirmed by fluorescence emission detections. As regards the fluorescence emission recorded at 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm) (Figure 6. (B)), the single peaks observed were exclusively due to the conjugation of Cy5.5 to SRPs. SRP-Cy5.5 retention time was again centered around 15.2 min while SRP-Cy5.5-cRGDfK retention time centre was shifted to approximately 16.2 min which confirms the results obtained for the absorption at 295 nm (Figure 6 (A)). Thanks to fluorescence emission recorded at 281 nm, the

Submitted to **NANO MICRO**
small

chromatogram of cyclic RGDfK was obtained and displays a retention time at 7.75 min. The chromatograms of the cRGDfK grafted SRPs displayed a short peak at this retention time being reminiscent of a very small proportion of unconjugated peptide, which is consistent with the conclusions drawn from Figure 6 (A). However, the major proportion of the emission detected was collected at retention times ranging from 13 to 23 min. The cRGDfK chromatogram of Figure 6 (C) is characterized by a linear relation between the area under the peak and the peptide concentration.^[24] This is due to the absence of fluorescence for unfunctionalized SRPs at 281 nm. Chromatograms have been fitted with Gaussian curves. The related peptide concentrations calculated after a calibration similar to that performed in the case of fluorescent experiments are reported in Table 2.

A last evaluation of the peptide concentration was performed by elemental analysis taking into consideration the global mass of about 10 kDa determined by mass spectrometry (See Table 2). For this, two major hypotheses have been made:

- like for the native nanoparticles, each SRP possesses 10 DOTA molecules;
- the APTES/TEOS molar ratio of the polysiloxane network (60% APTES/ 40% TEOS) remains constant during the whole synthesis in particular during the purification steps.

The molecular formulas were deduced with an absolute error ranging below 0.55% of the weight percentages supplied by elemental analyses (See Supporting Information).

The numbers of cRGDfK per SRP deduced by Elemental Analysis are in good agreement with the values provided by fluorescence and HPLC. The average number of cRGDfK per SRP is comprised between 1.9 and 2.5 for both SRP-cRGDfK and SRP-Cy5.5-cRGDfK. Since multimeric presentation of the RGD ligand is known to enhance $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting,^[25] the SRPs coupled to two cRGDfK are expected to demonstrate a high affinity both for $\alpha_v\beta_3$ in *in-vitro* binding assays and significant uptake in $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumors.

2.2. *In vitro* binding assay

The targeting and the internalization of functionalized SRPs with cRGDfK were highlighted by several *in vitro* biological techniques: competitive assay (IC_{50} values), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), fluorescence microscopy and flow cytometry. The targeting of cRGDfK functionalized SRPs was systemically compared to the targeting of the non-binding counterpart cRADfK functionalized SRPs and to the unfunctionalized SRPs as negative controls. For the last three *in vitro* techniques, *i.e.* FCS, fluorescence microscopy and flow cytometry, the binding assays were performed on the fluorescently labeled SRPs: SRP-Cy5.5-cPept.

2.2.1. Affinity towards $\alpha_v\beta_3$ integrins

The diffusion properties of each fluorescently labeled SRP, *i.e.* SRP-Cy5.5-cRGDfK and SRP-Cy5.5-cRADfK were first determined in solution using FCS. Then, an eventual modification of this parameter was measured in presence of purified $\alpha_v\beta_3$ integrin. This should provide quantitative and qualitative information allowing the evidence of an association between the SRP-Cy5.5-cPept and the $\alpha_v\beta_3$ integrin. The diffusion coefficient D of the SRP-Cy5.5-cRGDfK, obtained by free diffusion model with 2 compartments, decreased strongly in presence of the integrin, indicating the formation of complexes between the SRP-Cy5.5-cRGDfK and the integrin $\alpha_v\beta_3$. Precisely, we detected the presence of two different fluorescent species in the solution characterized by two different hydrodynamic diameters (HD) in the solution, a small one of 8.8 nm corresponding to the unbound SRP-Cy5.5-cRGDfK and a largest of 76.2 nm corresponding to the SRP-Cy5.5-cRGDfK/integrin complexes. To note, in this experiment we could not determine the number of integrin bind on the SRP-Cy5.5-cRGDfK. On the contrary, the diffusion coefficient D of the SRP-Cy5.5-cRADfK was not modified in presence of the integrin, indicating as expected the total absence

of interaction between the non-specific SRP-Cy5.5-cRADfK and the integrin $\alpha_v\beta_3$. In other words, absolutely no complex was formed between the particle and the integrin. To resume, FCS analyses indicated that SRP-Cy5.5-cRGDfK were able to form a complex in presence of the $\alpha_v\beta_3$ integrin in solution whereas their non-binding analogues (*i.e.* SRP-Cy5.5-cRADfK) cannot (See **Table 3**).

A competitive assay was also performed to evaluate deeper the binding of the cyclic RGDfK peptide grafted to SRPs. This competitive assay was expressed in terms of IC_{50} values (See **Figure 7**). Precisely, IC_{50} values evaluate SPR-cPept concentration necessary to inhibit 50% of some cell attachment to a vitronectin substrate. The vitronectin substrate is a substrate specific of the $\alpha_v\beta_3$ integrin and the cells chosen are Hek β_3 . The HEK293(β_3) cell line was genetically modified to over-express $\alpha_v\beta_3$ integrins, and is a great model to evaluate the targeting RGD-dependent *in vitro*.

Previous studies on Regioselectively Addressable Functionalized Template (RAFT) cyclodecapeptide scaffold bearing up to four cyclic RGDfK peptides have shown improved tenfold affinity for $\alpha_v\beta_3$ integrin and an improved integrin-mediated internalization compared to the monomeric cyclic RGDfK peptide.^[25c, 26] The same protocol of IC_{50} was used to perform the competitive binding assay on SRP-cRGDfK. The IC_{50} values of the RAFT scaffolds bearing 1, 2, 3 and 4 cyclic RGDfK peptides were respectively 48.8, 7.1, 2.8 and 4.1 μM . On Figure 7, the SRP-cRGDfK, which bore approximately 2.2 cRGDfK, possessed an efficient IC_{50} of 1.7 μM . This demonstrates a very high affinity of the SRP-cRGDfK for $\alpha_v\beta_3$ integrins equivalent to those of RAFT-RGD designed in the best conditions. As expected, their non-binding counterparts, *i.e.* SRP-cRADfK, were not able to disrupt cell adhesion to vitronectin. The SRP-cRGDfK were evidenced to be promising candidates for $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting.^[25c]

2.2.2. Affinity towards cells expressing $\alpha_v\beta_3$ integrins

The cellular uptake processes of SRP-Cy5.5, SRP-Cy5.5-cRGDfK and SRP-Cy5.5-cRADfK were also assayed into HEK293(β_3) cells by fluorescence microscopy and flow cytometry. The results obtained after incubation at 4 and 37°C of SRP-Cy5.5-cPept (0.1 mmol/L in Gd) with HEK293(β_3) cells are summarized in **Figure 8**. The incubation at 4°C is suitable for studying specific targeting (Figure 8. (A and B)), while the incubation at 37°C allows SRP internalization (Figure 8. (C and D)).

Fluorescence microscopy evidenced specific some HEK293(β_3) targeting of SRP-Cy5.5-cRGDfK, in comparison with SRP-Cy5.5-cRADfK and SRP-Cy5.5 after 15 minutes of incubation at 4°C. The SRP-Cy5.5-cRGDfK were observed on the surface of the cells and at cell junctions, where the $\alpha_v\beta_3$ integrins are likely to be over-expressed (Figure 8(A)). The specific interaction of HEK293(β_3) with SRP-Cy5.5-cRGDfK led additionally to the internalization of some nanoparticles with an endosome-like pattern after 30 minutes of incubation at 37°C, as evidenced by fluorescence microscopy (Figure 8. (C)). In all conditions, no SRP was observed inside the nucleus. These results were confirmed by flow cytometry analyses. Indeed, after incubations at 4°C or 37°C, the percentage of cells labeled by SRP-Cy5.5-cRGDfK was around 92% compared to 5-11% for SRP-Cy5.5-cRADfK or 2% for SRP-Cy5.5 (Figure 8. (B and D)). The huge gap between the functionalized SRPs with cRGDfK and the functionalized SRPs with cRADfK or the unfunctionalized SRPs highlights again the specific interactions that exist between the SRP-Cy5.5-cRGDfK and the cells expressing $\alpha_v\beta_3$ integrins.

Similar experiments were also performed with cells expressing lower levels of $\alpha_v\beta_3$ integrin than HEK293(β_3). For example, incubations of SRP-Cy5.5-cPept with U87MG cells provided similar results by flow cytometry analysis or fluorescence microscopy (See supplementary information), than those obtained with HEK293(β_3) cells.

2.3. *In vivo* targeting of SRP-Cy5.5-cPept

The targeting of the human radioresistant glioblastoma U87MG, expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrin, presents a major interest. Indeed, glioblastoma is the most common form of primary brain tumor; its aggressive nature and evasiveness to conventional treatments make it one of the most lethal cancers. We have tested ungrafted SRPs on different HEK293(β_3) and U87MG tumors to quantify the passive targeting of the particles on these models (See Supplementary Information) due to the above-described enhanced permeability and retention effect. We observed that about no passive targeting was observed for HEK293(β_3) tumors probably due to the slow growth of the tumor. However, a minimum uptake by EPR effect is needed to observe an efficient active targeting, and this passive targeting was clearly visualized for U87MG tumors. We have then evaluated the ability of SRP-Cy5.5-cRGDfK to target specifically U87MG sub-cutaneous tumors.

The *in vivo* behavior of the SRP-Cy5.5-cPept was assessed following their intravenous injection in the tail vein of *Nude* mice bearing U87MG xenografts. The fluorescence imaging was performed at multiple time points after injection ($[\text{Gd}^{3+}] \sim 10 \text{ mmol/L}$). Representative whole-body fluorescent images at 24 hours after injection are shown in **Figure 9**.

The covalent conjugation of the cyclic RGDfK and RADfK peptides may not appear to modify drastically the biodistribution of the SRPs. Each SRP-Cy5.5, functionalized or not with peptides, presented a passive accumulation in tumors, due to the EPR effect. But, similarly to the *in vitro* results a significant specific and active additional accumulation of SRP-Cy5.5-cRGDfK was observed in the tumor area. Indeed, the fluorescence intensities quantified on the remote tumors containing SRP-Cy5.5-cRGDfK are twice higher than in the case of the negative control SRP-Cy5.5-cRADfK ($p < 0.01^{**}$). This indicates the specific and active capability of SRP-Cy5.5-cRGDfK to target $\alpha_v\beta_3$ expressing tumors. These results are

NANO MICRO
Submitted to **small**

very interesting because in all the previous published studies *in vivo* active targeting was never observed.^[14] In the most favorable cases, the grafting of peptides (like cRGDfk or cRADfl) could increase tumor passive accumulation compared to unfunctionalized nanoparticles but no difference between the targeting particles and their negative control could be detected. On the contrary, the present results show that the grafting with the negative control (cRADfk) does not increase passive particles accumulation in tumors compared with unfunctionalized particles. Additional accumulation is only obtained using the targeted particles by cRGDfk which demonstrates unambiguously the presence of an active effect. The size and more generally the design of the SRPs developed here permit to get model particles that respond to the expected behavior of active particles.

3. Conclusions

The $\alpha_v\beta_3$ integrin is over-expressed on neoformed endothelial cells of the tumor vasculature and on many tumor cells. The RGD sequence is a highly selective ligand for the $\alpha_v\beta_3$ integrin and the natural recognition process of this RGD motif by the integrin is mediated by multivalent interactions. In this context, we aimed to develop multimeric RGD containing scaffolds. The SRPs were selected as the RGD carriers thanks to their interesting properties in terms of size, rigidity, detection and radiosensitizing effects. First, and according to their small size, the SRPs ensure rapid renal clearance but they are sufficiently large to avoid extravasation from normal blood vessels and to display long circulation time in the bloodstream. Then, these SRPs enable multimodal imaging (MRI, SPECT, fluorescence imaging) and are very promising for radiotherapy.^[17-18] The covalent grafting of RGD containing peptides on the SRP surface renders them hopeful for tumor selective diagnosis and for targeted-therapy. To benefit from multivalent interaction of cRGDfK towards $\alpha_v\beta_3$ integrins, about 2 peptides have been grafted per particles. The *in vitro* $\alpha_v\beta_3$ integrin targeting of cRGDfK functionalized SRPs was evidenced directly towards $\alpha_v\beta_3$ integrins or cells known

to express $\alpha_v\beta_3$ integrins such as HEK293(β_3) and U87MG. The active targeting of these particles have been confirmed by complementary tests fusing cRADfK functionalized SRPs as negative control. Finally, *in vivo* tumor uptake was significantly highlighted using fluorescence imaging after intravenous injection of the fluorescently labeled SRPs functionalized with cRGDfK in *Nude* mice bearing U87MG tumors. U87MG tumors have been chosen because of the radiosensitizing properties of this type of particle against glioma tumors. We hope that this first *in vivo* active targeting proof for SRP on U87MG models will be particularly interesting for further radiotherapy guided by imaging experiments performed on glioblastoma.

4. Experimental Section

A. Synthesis and characterization of targeting particles

A.1 Chemicals

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, >98.0%), N-hydroxysuccinimide (NHS, >97.0%), gadolinium chloride hexahydrate ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 99%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5-38%), sodium chloride (NaCl, >99.5%), dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5%), acetonitrile (CH_3CN , >99.9%) and trifluoroacetic acid (TFA, >99%) were purchased from Aldrich[®] Chemical (France) and used without further purification. Pre-activated Cyanine 5.5, later abbreviated Cy5.5-NHS, was purchased from GE Healthcare[®]. The cyclic RGDfK and RADfK peptides were purchased from GeneCust[®] (Luxembourg). The SRPs synthesis has been already described elsewhere¹⁷. The core shell nanoparticles (core: gadolinium oxide and shell polysiloxane) and the SRPs were purchased from Nano-H SAS (Saint-Quentin Fallavier, France). the DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid) chelate was purchased from ChemaTech[®] (Dijon, France). For the preparation of an aqueous solution of nanoparticles, only milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) was used.

Each synthesis step was performed at room temperature. SRP concentrations are stated in mol/L of Gadolinium element.

A.2 Grafting of Cy5.5 on SRPs.

Cy5.5-NHS was diluted in anhydrous DMSO (2.5 mg/mL) and added to an aqueous solution of SRPs (100mM) at pH 7-7.4 for 8 hours (molar ratio Cy5.5/Gd 0.044:1). Exclusively SRP-Cy5.5 allotted to cRGDfK or cRADfK grafting were submitted to tangential filtration to a 100 factor over a 5 kDa membrane before being treated by EDC and NHS activation reagents. This intermediate step remained necessary to remove any unconjugated dye and to avoid any future possible covalent conjugation between Cy5.5-NHS and cyclic RGDfK or RADfK peptides.

A.3 Activation of carboxylic acids from DOTA molecules.

For the synthesis without Cy5.5, SRPs were dispersed in water 15 min before being added to EDC and NHS. The previous SRP and SRP-Cy5.5 solutions were treated by EDC and NHS at pH 5 for 30 min (molar ratio EDC/NHS/Gd 3:3:1).

A.4 Grafting of cRGDfK peptide on SRPs.

The previously activated SRP solutions, *i.e.* SRP and SRP-Cy5.5, were divided into three aliquots: one to be grafted with cyclic RGDfK peptide, another one to be grafted with cyclic RADfK peptide and the last one to be used as a reference. At the same time, both cyclic RGDfK and RADfK peptides were dissolved in DMSO (100 mg/mL). Each peptide was mixed with one of the previously activated SRP aliquots at pH 7-7.4 for 8 hours (molar ratio cPept./Gd 2:1). Similarly, the last sample considered as the reference was subjected to the same conditions, *i.e.* previously remaining activated SRP aliquot was mixed with DMSO at pH 7-7.4 for 8 hours.

A.5 Addition of Gd³⁺ ions.

To achieve higher proton longitudinal relaxivities, additional Gd³⁺ ions were inserted to each SRP solution by adding a 100mM Gd³⁺ solution prepared with GdCl₃.6H₂O in water (additional Gd³⁺/initial Gd molar ratio 0.5:1). The final mixture was stirred for 6 hours at pH 5-6.

A.6 Purification and Storage.

Each SRP aliquot (*i.e.* SRP, SRP-cRGDfK, SRP-cRADfK, SRP-Cy5.5, SRP-Cy5.5-cRGDfK and SRP-Cy5.5-cRADfK) was subjected to tangential filtration to a 1000 factor over a 5 kDa membrane to remove any unconjugated product and was freeze-dried for storage, using a Christ Alpha 1-2 lyophilizer. The freeze-dried SRPs are stable for months without alteration.

A.7 Phosphorescence spectra for free DOTA quantification.

Phosphorescence measurements were carried out using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, with the time-resolved phosphorescence mode. Samples were pipetted into disposable glass-walled cells. Excitation slit was set to 20 nm while emission slit was set to 10 nm. The spectra were recorded with an excitation wavelength of 395 nm and emission wavelengths from 550 to 650 nm. The photomultiplier tube (PMT) voltage was set to 800V. The following parameters were used: delay time for data collection 100 μ s and gate time 5 ms.

A.8 Size measurement and surface potential

Hydrodynamic diameters (HD) and ζ -Potentials of our samples were determined with a Zetasizer NanoS PCS (Photon Correlation Spectroscopy, laser He-Ne 633 nm) from Malvern Instruments[®]. For HD measurements, 200 μ L of an aqueous solution of SRPs (10 mM) were pipetted into a disposable micro-cuvette (ZEN0040). Attenuator and position were optimized by the device. Prior to ζ -Potential experiments, the SRPs (10 mM) were diluted in an aqueous solution containing 0.01 M NaCl and adjusted to the desired pH. ζ -Potential measurements were recorded at 25 °C with palladium electrodes within a high concentration cell (ZEN1010). The ζ -Potential was automatically calculated from electrophoretic mobility based on the Smoluchowski equation, $v = (\epsilon E / \eta) \zeta$, where v is the measured electrophoretic velocity, η is the viscosity, ϵ is the electrical permittivity of the electrolytic solution and E is the electric field.

FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) study was performed as previously described²⁶ on the ConfoCor 2 system (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 40X water immersion C-Apochromat objective lens (numerical aperture (N.A.) = 1.2). The measurements were carried out at room temperature in 8-well Lab-Tek I chambered coverglass (Nalge Nunc International, Illkirch, France). The 633 nm He-Ne laser beam was focused into 50 μ L solutions at 150 μ m over the cover glass. The fluorescence emission was collected through a pinhole and a 650 nm-long pass filter. Photon counts were detected by an Avalanche PhotoDiode at 20 MHz for 30 seconds. For each sample, FCS measurements were repeated 10 times. The data evaluation was performed using the Zeiss FCS Fit software (Zeiss, Jena, Germany).

A.9 Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) Analysis.

The determination of the accurate concentration of gadolinium in SRP samples was performed by ICP-OES with a Varian[®] 710-ES spectrometer. First, SRPs were pre-dispersed in water (100mM).

Small amounts of SRP aqueous solutions were diluted and heated at 80°C for 3h in 5 mL of concentrated nitric acid (67% HNO₃ (w/w)). Subsequently, the samples were scattered in 50mL of water. For the calibration of the ICP-OES, single element standard solution was used and prepared from 1000 ppm Gd-standard from SCP Science® by successive dilutions with an HNO₃ 5% (w/w) matrix.

A.10 Mass measurement

Full scan mass experiments were performed using a linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) with enlargement for the high 400-4000 Th range. The nanoparticle solution was electrosprayed at a flow rate of 5 µg/min in positive ion mode. Isotopic distributions of fragment ions were recorded using the zoom scan mode of the LTQ quadrupole ion trap mass spectrometer.

A.11 Infrared (IR) spectra.

The IR spectra of solid dry SRP samples were acquired on an IRAffinity-1, Shimadzu® with an ATR platform by applying the attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy from 600 to 4000 cm⁻¹.

A.12 Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD) Profile

NMRD profiles extending from 0.12 mT to 1.2 T were recorded on a fast field cycling relaxometer (Stellar, Mede, Italy) on 0.8 mL solutions contained in 10-mm o.d. tubes at 37°C. Proton relaxation rates were also measured at 0.47 and 1.5 T with Minispec mq-20 and mq-60 (Bruker®, Karlsruhe, Germany).

A.13 Ultraviolet-visible Absorption spectra.

Aqueous solutions of SRPs were analyzed by UV-vis spectrophotometer (Varian Cary50) in the range of 200 to 800 nm, with a Hellma semi-micro cell, 10 mm light path, 1400 µL, manufactured from Suprasil quartz.

A.14 Fluorescence spectra for cRGDfK quantification.

Fluorescence measurements were carried out on an F-2500 Hitachi® fluorescence spectrophotometer (Xe lamp). For all measurements, excitation and emission slits were set to 2.5 nm. The spectra were recorded with a final excitation wavelength of 240 nm and emission wavelengths from 240 to 310 nm. The photomultiplier tube (PMT) voltage was set to 700V.

A.15 High Performance Liquid Chromatography.

Gradient HPLC analysis was carried out using the Shimadzu® Prominence series UFLC system equipped with a CBM-20A controller bus module, an LC-20AD liquid chromatograph, a CTO-20A column oven, an SPD-20A UV-visible detector and an RF-20A fluorescence detector. Sample UV-visible absorption and fluorescence emission were respectively measured at 295 nm (UV-visible absorption single wavelength detection), 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) and 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm) (simultaneous monitoring of two fluorescence emission wavelengths). Sample aliquots of 20 μ L were loaded in 95% solvent A – 5 % solvent B (A = Milli-Q water/TFA 99.9:0.1 v/v ; B = CH₃CN/Milli Q water/TFA 90:9.9:0.1 v/v/v) onto a Jupiter C4 column (150 x 4.60 mm, 5 μ m, 300 Å, Phenomenex®) at a flow rate of 1 mL/min over 5 min. In a second step, samples were eluted by a gradient developed from 5 to 90 % of solvent B in solvent A over 30 min. The concentration of solvent B was maintained over 10 min. Then, the concentration of solvent B was decreased to 5 % over a period of 10 min to re-equilibrate the system, followed by additional 10 min at this final concentration. Before each sample measurement, a baseline was performed following the same conditions by loading Milli-Q water into the injection loop.

B. In Vitro characterization of targeting properties

B.1 Cell lines and culture conditions

HEK293(β_3) cells, stable transfectants of human β_3 subunit from the human embryonic kidney 293 cell line, were kindly supplied by J.-F. Gourvest (Aventis, France). They were cultured in DMEM (PAA, Linz, Austria), enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose, 1 % glutamine and supplemented with 10% FBS, 700 μ g.mL⁻¹ G418 (G418 sulfate, PAA, Linz, Austria). U87MG cells, human radioresistant gliosarcoma cell line, were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1X non-essential amino acids. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. All the cells used here are integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive.

B.2 Affinity for integrin $\alpha_v\beta_3$ by FCS measurement

FCS equipment is described above. Most of the intensity autocorrelation curves were fitted using a free diffusion model with two components: the nanoparticle coupled to the fluorochrome alone and the fluorescent nanoparticle–integrin complex. Interaction assays were performed at RT in HBSS containing Mg²⁺ and Ca²⁺. Soluble integrin $\alpha_v\beta_3$ (0.2nmol, #CC1021, Chemicon) was mixed with RGD-

NP or NP coupled to cyanine 5.5. FCS measurements were performed 5 minutes and 1 hour after mixing. Preliminary studies enabled us to fix the diffusion time value of the first component and structural parameter. Moreover, a calibration step with 4 nmol/l Cy5 made it possible to evaluate the size of the confocal volume ($\approx 1 \mu\text{m}^3$).

B.3 Competitive cell adhesion assays – IC₅₀ assay.

Competitive assay was performed as described in Garanger *et al.*, 2006²⁷. Briefly, 96-well assay plates (Falcon, Becton Dickinson, France) were coated for 1h at room temperature with 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ vitronectin in PBS and blocked for 30min with 3% bovine serum albumin (BSA). Varying amounts of peptides were added simultaneously with 10E5 trypsinated HEK293(β_3) cells to the wells and the plate was incubated for 30 min at 37°C. Wells were rinsed three times with cold PBS to remove vitronectin-unbound cells. Attached cells were then fixed with absolute ethanol, stained with methylene blue and quantified by OD reading at 630nm. The activity of peptides was expressed as IC₅₀ values (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of cell attachment to the vitronectin substrate) and determinates from triplicates in three separate experiments.

B.4 Fluorescence microscopy analysis of SRP-Cy5.5-cPept incubated in the presence of integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive cells.

HEK293(β_3) cells were grown on coverslips over-night at 37°C, rinsed once with PBS, then with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. They were then incubated for 15 min at 4°C (binding analysis) or 30 min at 37°C (internalization analysis) in the presence of either SRP-Cy5.5, SRP-Cy5.5-cRGDfK, or SRP-Cy5.5-cRADfK at a concentration of 0.1 mmol.L⁻¹ in Gd. They were subsequently rinsed with PBS Mg²⁺/Ca²⁺ (1 mM) and fixed (10 min with 0.5 % paraformaldehyde). Nuclei were labeled with Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (5 μM) during 10 min. After being rinsed with PBS, coverslips were mounted in Mowiol. Fluorescence microscopy was performed on Apotome (Carl Zeiss, Jena, Germany).

B.5 Flow cytometry analyses of SRP-Cy5.5-cPept incubated in the presence of integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive cells

For binding analyses, adherent cells were resuspended with trypsin, washed once with cold PBS, and another time with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. One million of cells in a final volume of 200 μL were resuspended in SRP-Cy5.5-cPept suspensions (0.1 mmol.L⁻¹ in Gd) in PBS Mg²⁺/Ca²⁺ (1 mM) and incubated 15 min at 4°C. SRP-Cy5.5-cPept solutions were removed and pellets

carefully rinsed twice with PBS Mg^{2+}/Ca^{2+} (1 mM) at 4°C. Cells were then rapidly analyzed by flow cytometry (LSRII, Becton Dickinson, France). The results were reported as Cy5.5 fluorescence histogram counts. For internalization analyses, the same experiment was performed with reagents at 37°C, and the SRP-Cy5.5-cPept suspensions were incubated at 37°C during 30 min.

C. In vivo characterization of targeting properties

C.1 In vivo fluorescence imaging

Female NMRI *Nude* mice (6 weeks old, Janvier, Le Genest Saint Isle, France), received a subcutaneous xenograft of U87MG cells (5.10^6 per mouse). After tumor growth, mice ($n=3$ per group) were anesthetized (isoflurane/oxygen 4%/3.5% for induction and 2% thereafter) and were injected intravenously in the tail vein with 200 μ L of SRP-Cy5.5-cPept suspension ($[Gd^{3+}] \sim 10$ mmol/L), then they were illuminated by 660-nm light-emitting diodes equipped with interference filters. Fluorescence images as well as black and white pictures were acquired by back-thinned CCD camera at -80°C (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu, Massy, France) fitted with high pass filter RG9 (Schott, Jena, Germany)¹⁴. All animal experiments were done in accordance with protocols approved by the Ethical comity of Grenoble. After imaging, the mice were killed and dissected for imaging organs. Image display and analysis were performed using the Wasabi software (Hamamatsu, Massy, France). Semi-quantitative data were obtained from the fluorescent images by drawing regions of interest (ROI) on each organ. The results of organ fluorescence quantifications were expressed as a number of relative light units (RLU) per pixel per unit of time exposure.

C.2 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using two-tailed nonparametric Mann-Whitney t-test. Statistical significance was assigned for values of $p < 0.05$.

Acknowledgements

We wish to thank the COST action TD1004 “theranostics imaging and therapy: an action to develop novel nanosized systems for imaging-guided drug delivery” and the COST action D38 “Metal-based systems for molecular imaging applications”. M.D., S.L., L.V.E. and R.N.M thank the French Community of Belgium (ARC Programmes 95/00–194, 00/05–258

and 05/10–335), the Fond National de la Recherche Scientifique (FNRS), the support and concerted sponsorship of COST Action D38, the EMIL Programme and the Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), supported by the European Regional Development Fund and the Walloon Region.

[1] (a) K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen, D. M. Shin, *Clin Cancer Res*, **2008**, *14*, 1310-1316; (b) M. E. Davis, Z. G. Chen, D. M. Shin, *Nat Rev Drug Discov*, **2008**, *7*, 771-782; (c) M. Ferrari, *Nat Rev Cancer*, **2005**, *5*, 161-171; (d) J. R. Heath, M. E. Davis, *Annu Rev Med*, **2008**, *59*, 251-265; (e) R. K. Jain, T. Stylianopoulos, *Nat Rev Clin Oncol*, **2010**, *7*, 653-664; (f) K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2009**, *48*, 872-897; (g) D. A. Scheinberg, C. H. Villa, F. E. Escorcía, M. R. McDevitt, *Nat Rev Clin Oncol*, **2010**, *7*, 266-276.

[2] (a) S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. Torchilin, R. K. Jain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 4607-4612; (b) Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res*, **1986**, *46*, 6387-92.

[3] (a) J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat Rev Cancer*, **2010**, *10*, 9-22; (b) D. B. Kirpotin, D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz, J. W. Park, *Cancer Res*, **2006**, *66*, 6732-6740; (c) J. W. Park, C. C. Benz, F. J. Martin, *Semin Oncol*, **2004**, *31*, 196-205.

[4] A. J. Beer, M. Schwaiger, *Cancer Metastasis Rev*, **2008**, *27*, 631-644.

[5] (a) V. Beck, H. Herold, A. Benge, B. Lubber, P. Hutzler, H. Tschesche, H. Kessler, M. Schmitt, H. G. Geppert, U. Reuning, *Int J Biochem Cell Biol*, **2005**, *37*, 590-603; (b) X. Chen, S. Liu, Y. Hou, M. Tohme, R. Park, J. R. Bading, P. S. Conti, *Mol Imaging Biol*, **2004**, *6*, 350-359; (c) Q. Ding, J. Jr. Stewart, M. A. Olman, M. R. Klobe, C. L. Gladson, *J Biol Chem*

Submitted to **NANO MICRO**
small

2003, 278, 39882-39891; (d) S. Kuphal, R. Bauer, A. K. Bosserhoff, *Cancer Metastasis Rev*, **2005**, 24, 195-222.

[6] J. D. Hood, D. A. Cheresh, *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2, 91-100.

[7] (a) L. W. Dobrucki, E. D. de Muinck, J. R. Lindner, A. J. Sinusas, *J Nucl Med*, **2010**;

(b) K. Temming, R. M. Schiffelers, G. Molema, R. J. Kok, *Drug Resist Updat*, **2005**, 8, 381-402.

[8] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H. J. Wester, *Acc Chem Res*, **2009**, 42, 969-980.

[9] (a) E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, *Anticancer Agents Med Chem*, **2007**, 7, 552-558; (b) S. Liu, *Mol Pharm*, **2006**, 3, 472-487.

[10] (a) K. Chen, J. Xie, H. Xu, D. Behera, M. H. Michalski, S. Biswal, A. Wang, X. Chen, *Biomaterials* **2009**, 30, 6912-6919; (b) F. Zhang, X. Huang, L. Zhu, N. Guo, G. Niu, M. Swierczewska, S. Lee, H. Xu, A. Y. Wang, K. A. Mohamedali, M. G. Rosenblum, G. Lu, X. Chen, *Biomaterials*, **2012**, 33, 5414-5422.

[11] T. J. Wadas, H. Deng, J. E. Sprague, A. Zheleznyak, K. N. Weilbaecher, C. J. Anderson, *J Nucl Med*, **2009**, 50, 1873-1880.

[12] R. Haubner, C. Decristoforo, *Front Biosci*, **2009**, 14, 872-886.

[13] M. A. Borden, H. Zhang, R. J. Gillies, P. A. Dayton, K. W. Ferrara, *Biomaterials*, **2008**, 29, 597-606.

[14] (a) M. Goutayer, S. Dufort, V. Jossierand, A. Royere, E. Heinrich, F. Vinet, J. Bibette, J. L. Coll, I. Texier, *Eur J Pharm Biopharm*, **2010**, 75, 137-147; (b) K. T. Yong, R. Hu, I. Roy, H. Ding, L. A. Vathy, E. J. Bergey, M. Mizuma, A. Maitra, P. N. Prasad, *ACS Appl Mater Interfaces*, **2009**, 1, 710-719.

[15] (a) M. P. Borgman, O. Aras, S. Geyser-Stoops, E. A. Sausville, H. Ghandehari, *Mol Pharm*, **2009**, 6, 1836-1847; (b) H. D. Han, L. S. Mangala, J. W. Lee, M. M. Shahzad, H. S. Kim, D. Shen, E. J. Nam, E. M. Mora, R. L. Stone, C. Lu, S. J. Lee, J. W. Roh, A. M. Nick,

NANO MICRO
Submitted to **small**

- G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, *Clin Cancer Res*, **2010**, *16*, 3910-3922; (c) J. Jiang, S. Yang, J. C. Wang, L. J. Yang, Z. Z. Xu, T. Yang, X. Y. Liu, Q. Zhang, *Eur J Pharm Biopharm*, **2010**, *76*, 170-178; (d) C. Zhan, B. Gu, C. Xie, J. Li, Y. Liu, W. Lu, *J Control Release*, **2010**, *143*, 136-142.
- [16] Z. Li, P. Huang, X. Zhang, J. Lin, S. Yang, B. Liu, F. Gao, P. Xi, Q. Ren, D. Cui, *Mol Pharm*, **2010**, *7*, 94-104.
- [17] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Jossierand, J. L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Remy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *Angew Chem Int Ed Engl*, **2011**, *50*, 12299-12303.
- [18] (a) G. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Brauer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 9566-9574; (b) P. Mowat, A. Mignot, W. Rima, F. Lux, O. Tillement, C. Roulin, M. Dutreix, D. Bechet, S. Huger, L. Humbert, M. Barberi-Heyob, M. T. Aloy, E. Armandy, C. Rodriguez-Lafrasse, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, *J Nanosci Nanotechnol*, **2011**, *11*, 7833-7839.
- [19] H. S. Choi, W. Liu, F. Liu, K. Nasr, P. Misra, M. G. Bawendi, J. V. Frangioni, *Nat Nanotechnol*, **2010**, *5*, 42-47.
- [20] (a) M. S. Braiman, D. M. Briercheck, K. M. Kriger, *J. Phys. Chem.*, **1999**, *103*, 4744-4750; (b) E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-Garcia, L. M. De Leon-Rodriguez, C. L. Santos-Cuevas, R. Garcia-Becerra, L. A. Medina, L. Gomez-Olivan, *Bioconjug Chem*, **2011**, *22*, 913-922.
- [21] J. J. Hagen, C. A. Monning, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 1877-1883.
- [22] A. G. Harrison, K. W. Siu, H. El Aribi, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2003**, *17*, 869-875.

- [23] A. J. Lawaetz, C. A. Stedmon, *Appl Spectrosc*, **2009**, *63*, 936-940.
- [24] A. P. Kafka, T. Rades, A. McDowell, *Biomed Chromatogr*, **2010**, *24*, 132-139.
- [25] (a) G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, L. G. Griffith, *J Cell Sci*, **2000**, *113*, 1677-1686; (b) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew Chem Int Ed Engl*, **1998**, *37*, 2754-2794; (c) M. Galibert, L. Sancey, O. Renaudet, J. L. Coll, P. Dumy, D. Boturyn, *Org Biomol Chem*, **2010**, *8*, 5133-5138.
- [26] L. Sancey, E. Garanger, S. Foillard, G. Schoehn, A. Hurbin, C. Albiges-Rizo, D. Boturyn, C. Souchier, A. Grichine, P. Dumy, J. L. Coll, *Mol Ther*, **2009**, *17*, 837-843.
- [27] E. Garanger, D. Boturyn, J. L. Coll, M. C. Favrot, P. Dumy, *Org Biomol Chem*, **2006**, *4*, 1958-65.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Revised: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

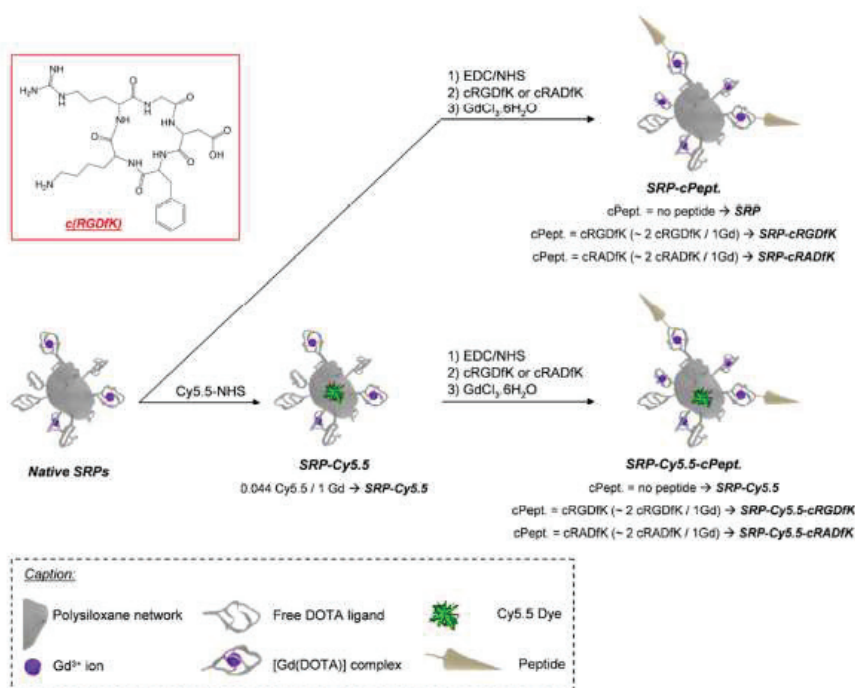


Figure 1. Scheme of Cy5.5 and cRGDFK (or cRADfK) peptide grafting reactions to SRPs and cRGDFK molecule design.

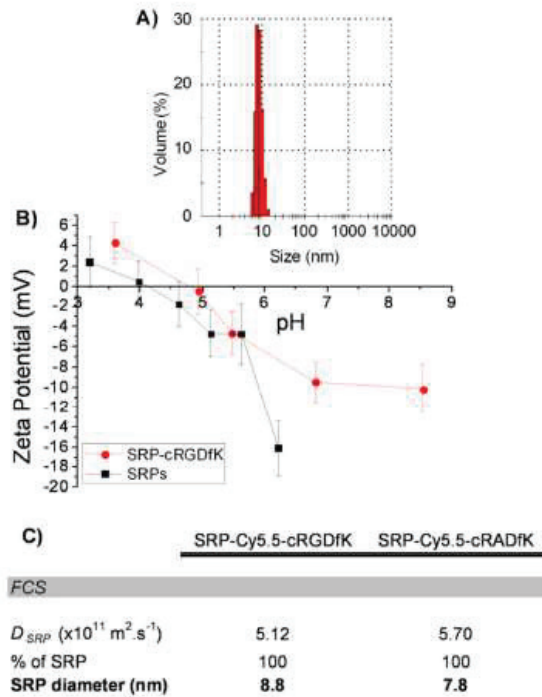


Figure 2. (A) SRP-cRGDfK PCS size measurements (B), SRP-cRGDfK and SRP ζ -Potentials. (C) FCS analyses of SRP-Cy5.5-cRGDfK and SRP-Cy5.5-cRADfK at 633 nm. *D* is the diffusion coefficient.

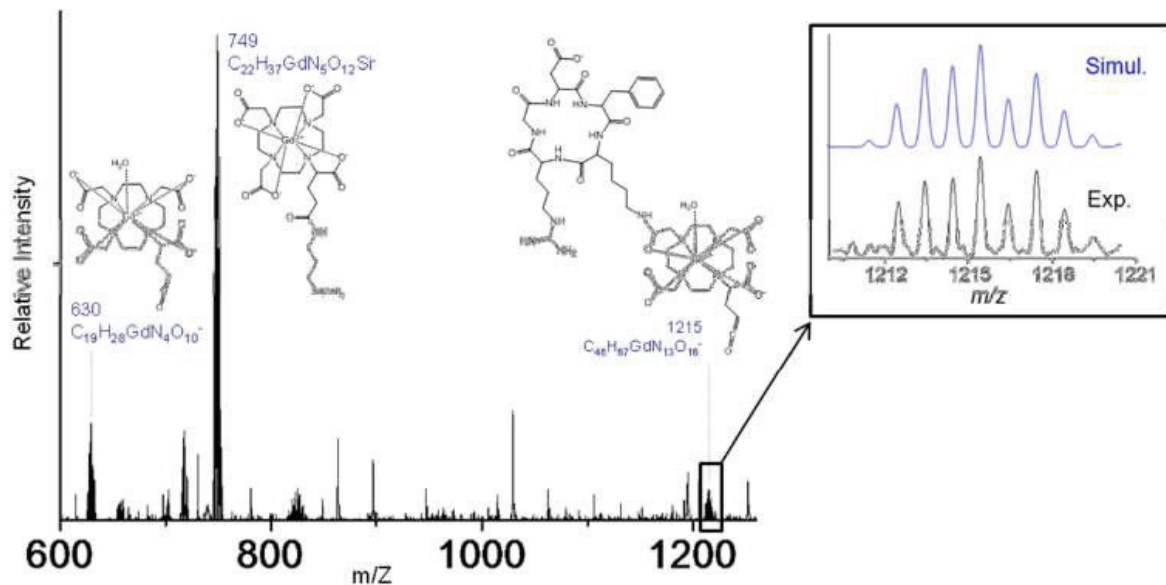


Figure 3. SRP-cRGDfK ESI spectra in a negative mode at low masses.

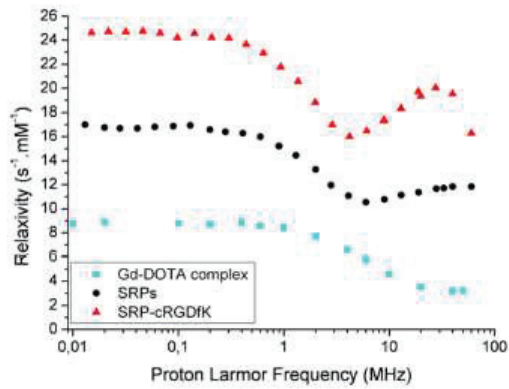


Figure 4. NMRD profiles of $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ complex, SRPs and SRP-cRGDFK

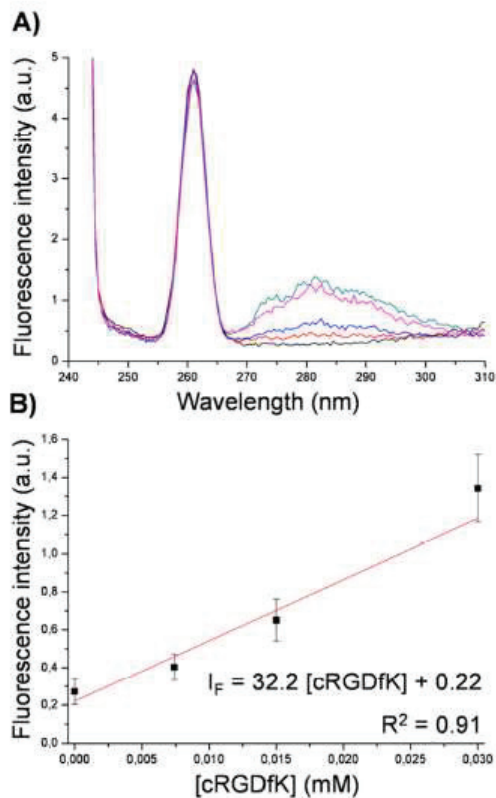


Figure 5. (A) Fluorescence Spectra of free cRGDFK in growing concentrations in presence of SRPs (constant concentration) for grafted cRGDFK determination (magenta, black, red, blue, dark cyan and dark yellow lines). (B) cRGDFKmaxima fluorescence emission at $\lambda_{\text{em}} = 282 \text{ nm}$ versus the concentration of peptide added.

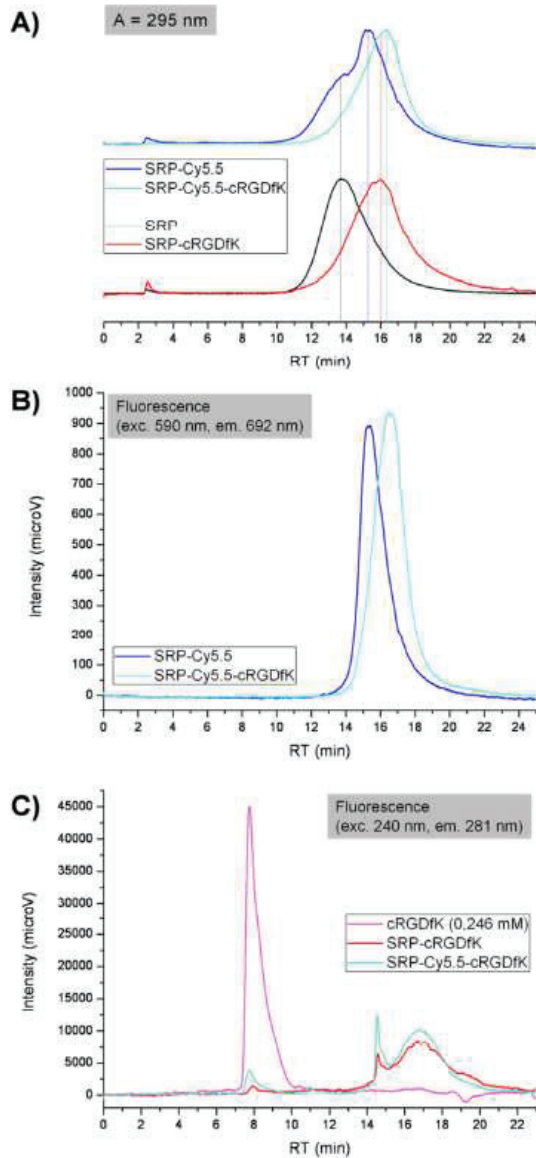


Figure 6. (A) Normalized chromatograms of SRP (black), SRP-cRGDfK (red), SRP-Cy5.5 (blue) and SRP-Cy5.5-cRGDfK (cyan) at UV-visible Absorption wavelength = 295 nm. (B) Chromatograms of SRP-Cy5.5 (blue) and SRP-Cy5.5-cRGDfK (cyan) at Fluorescence Emission wavelength = 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm). (C) Chromatograms of cRGDfK (0,246 mM) (magenta), SRP-cRGDfK (red) and SRP-Cy5.5-cRGDfK (cyan) at Fluorescence Emission wavelength = 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm).

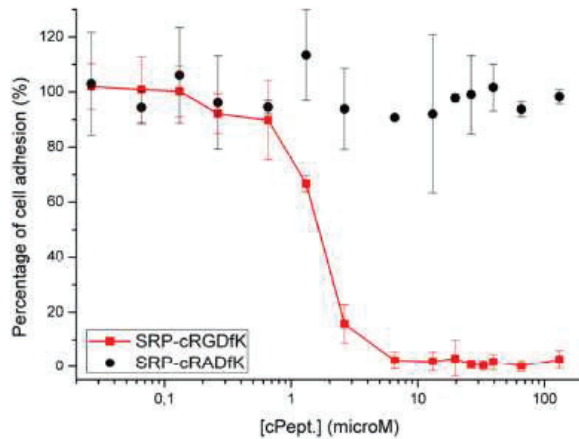


Figure 7. IC₅₀ of SRP-cRGDfK and SRP-cRADfK on Hekβ3 cells on vitronectin substrate. The IC₅₀ curves depict a percentage of cell adhesion *versus* the concentration of the cyclic peptide.

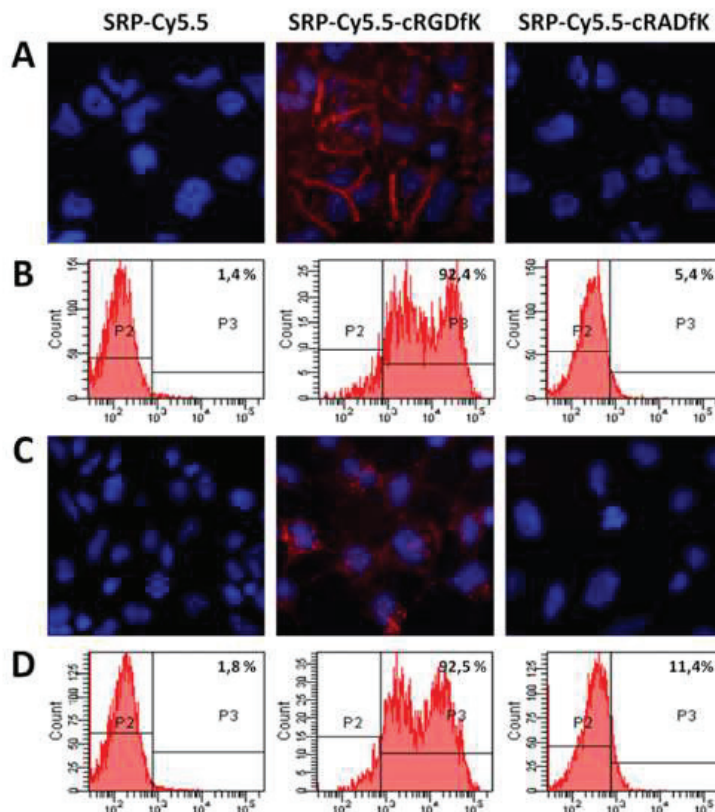


Figure 8. *In vitro* test of SRP-Cy5.5-cRGDfK, SRP-Cy5.5-cRADfK and SRP-Cy5.5 in the presence of HEK293(β3) cells after 15 minutes incubation at 4°C (**A and B**) or 30 minutes at 37°C (**C and D**). Fluorescence microscopy pictures (**A and C**) and flow cytometry (**B and D**) evidenced the specific SRP-Cy5.5-cRGDfK (red) binding (**A and B**) and internalization (**C and D**), in comparison with the negative control SRP-Cy5.5-cRADfK and with SRP-Cy5.5. The cell nuclei were labeled in blue (Hoechst) on the fluorescence microscopy photographs

(A and C). The figures on the flow cytometry plots (B and D) represent the percentages of labeled cells.

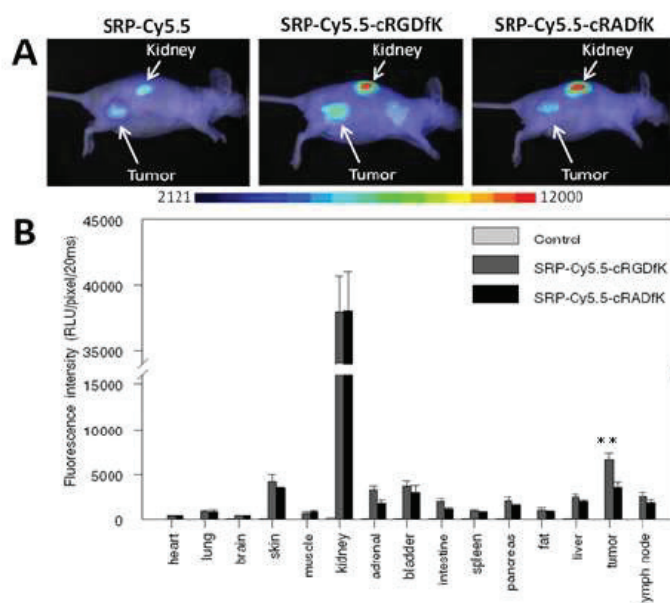


Figure 9. *In vivo* injection of SRP-Cy5.5, SRP-Cy5.5-cRGDfK, SRP-Cy5.5-cRADfK ($[Gd^{3+}] \sim 10$ mmol/L) in *Nude* mice carrying sub-cutaneous U87MG tumors. (A) Fluorescence images obtained 24h after injection evidenced an accumulation of all particles in the tumor area, which was increased with SRP-Cy5.5-cRGDfK. Fluorescence images (20 ms integration time, color scale with contrast fixed between 2121 and 12000) were surimposed to visible light images (white and black). (B) Fluorescence images were then performed on isolated organs 24h after injection, and ROIs were defined on the extracted organs in order to semi-quantify the amount of photons detected per pixels after an exposure of 20 ms. Fluorescence is expressed in relative light unit per pixel per 20 ms. Controls were non-injected mice.

Table 1. Initial and final molar dye/Gd and dye/SRP ratios and percentage of remaining Cy5.5 after purification for SRP-Cy5.5-cPept.

	Cy5.5 grafting yield	Final Cy5.5/Gd ratio	Final Cy5.5/SRP ratio
<i>UV-vis. Absorption</i>			
SRP-Cy5.5	89%	0.029	0.15
SRP-Cy5.5-cRGDfK	73%	0.049	0.25
SRP-Cy5.5-cRADfK	71%	0.047	0.24

Table 2. Final cRGDfK/SRP molar ratios provided by Fluorescence Emission Spectra and by HPLC and its chromatograms performed by detection of fluorescence emission at 281nm. Final cRGDfK/SRP ratios are also determined from Elemental Analysis assuming that each SRP displays 10 DOTA molecules and that the APTES/TEOS molar ratio remains constant during the purification steps.

	SRPs	SRP-cRGDfK	SRP-Cy5.5	SRP-Cy5.5-cRGDfK
Fluorescence emission ($\lambda_{exc}=240\text{nm}$, $\lambda_{em}=282\text{nm}$)				
Final cRGDfK / SRP ratio	/	2.1	/	1.9
HPLC ($\lambda_{exc}=240\text{nm}$, $\lambda_{em}=281\text{nm}$)				
Final cRGDfK / SRP ratio	/	2	/	2.4
Elemental Analysis				
Number of ... atoms/molecules per SRP				
Gd ^{III}	5	5	5	5.5
DOTA	10	10	10	10
SiO _x	34,4	32,3	37,9	40,2
Cy5.5	/	/	0.15	0.27
cRGDfK	/	2.5	/	2.2

Table 3.

	SRP-Cy5.5- cRGDfK + $\alpha_v\beta_3$ integrin	SRP-Cy5.5- cRADfK + $\alpha_v\beta_3$ integrin
FCS		
D_{SRP} ($\times 10^{11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	5.12	5.70
$D_{SRP \text{ with integrin}}$ ($\times 10^{11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	0.584	NA
% of SRP	82.2	100
% of SRP with integrin	17.8	0
SRP diameter (nm)	8.8	7.8
SRP with integrin diameter (nm)	76.2	NA
Result	Association	No association

III.3. Résultats complémentaires

L'article ci-dessus décrit les stratégies mises en place pour le greffage de plusieurs pentapeptides cycliques contenant le motif RGD aux SRPs, la caractérisation du greffage et l'observation *in vitro* et *in vivo* du ciblage des SRPs vectorisées sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Certains tests biologiques *in vitro* et *in vivo* reposant sur la détection d'un fluorophore organique, une partie des SRPs est marquée par de la Cyanine 5.5 (Cy5.5), pour les raisons exposées dans le Chapitre II. L'article détaille le mode opératoire pour le couplage covalent de la Cy5.5, du c(RGDfK) et du c(RADfK) aux SRPs. La Cy5.5-NHS est greffée aux fonctions amines primaires provenant des molécules d'APTES de la matrice de polysiloxane ; quant aux pentapeptides cycliques RGDfK et RADfK, leur fonction amine primaire issue de la lysine est greffée aux acides carboxyliques – préalablement activés par voie EDC/NHS – des molécules de DOTA vacantes, c'est-à-dire non engagées dans la complexation d'un ion Gd^{III} . Dans les deux cas, il s'agit d'un couplage peptidique par activation carbodiimide standard (*cf.* Chapitre II). Ensuite, les SRPs sont « remontées en Gd^{III} » : des ions Gd^{III} sont ajoutés après l'étape de couplage peptidique afin de compléter un maximum de DOTA vacants dans le but d'obtenir une meilleure relaxivité longitudinale des SRPs (*cf.* Chapitre II). Enfin, les SRPs sont purifiées puis lyophilisées (*cf.* article).

L'objectif de cette thèse consistant à greffer des molécules ciblantes en surface des SRPs, puis à valider le couplage et à quantifier le nombre de molécules greffées par SRPs, nous souhaitons détailler plus amplement les différentes méthodes ayant permis la caractérisation du couplage du c(RGDfK) aux SRPs. Ainsi, nous reprenons ici toutes les techniques de caractérisation physicochimiques utilisées pour valider et quantifier le greffage du pentapeptide cyclique aux SRPs.

Toutes les analyses sont réalisées sur les SRPs finales, donc « remontées en Gd^{III} », et les concentrations en ions Gd^{III} sont mesurées par ICP-OES.

III.3.1. Validation du greffage du c(RGDfK) aux SRPs

III.3.1.1. Spectroscopie Infrarouge (IR)

Les spectres IR du c(RGDfK) et des deux types de SRPs (fonctionnalisées ou non) ont été collectés. Les 2 spectres de SRPs ont ensuite été corrigés par un facteur multiplicateur de façon à les ramener à la même concentration. Pour ce faire, nous avons sélectionné le pic à 1317 cm^{-1} , spécifique des SRPs, et non spécifique du c(RGDfK) : il correspond aux déformations O-H dans le plan des groupements acides carboxyliques issus des molécules de DOTA des SRPs. Le pentapeptide c(RGDfK) contient lui aussi un acide carboxylique mais ne présente pas de signal à 1317 cm^{-1} : les déformations O-H dans le plan du groupement acide carboxylique issu de l'acide aspartique sont repérées à 1287 cm^{-1} . Les spectres IR des deux types de SRPs ont alors été corrigés par un facteur multiplicateur de manière à ramener les SRPs fonctionnalisées et les SRPs non

fonctionnalisées à la même valeur de transmittance au niveau du pic à 1317 cm^{-1} , afin de pouvoir comparer les SRPs entre elles à une même concentration. Le spectre IR corrigé des SRPs non fonctionnalisées a été soustrait à celui des SRPs fonctionnalisées, afin de constater la présence du pentapeptide c(RGDfK) dans l'échantillon des SRPs fonctionnalisées. La courbe résultant de la soustraction de ces spectres IR a été superposée au spectre IR du pentapeptide cyclique (Figure III.4).

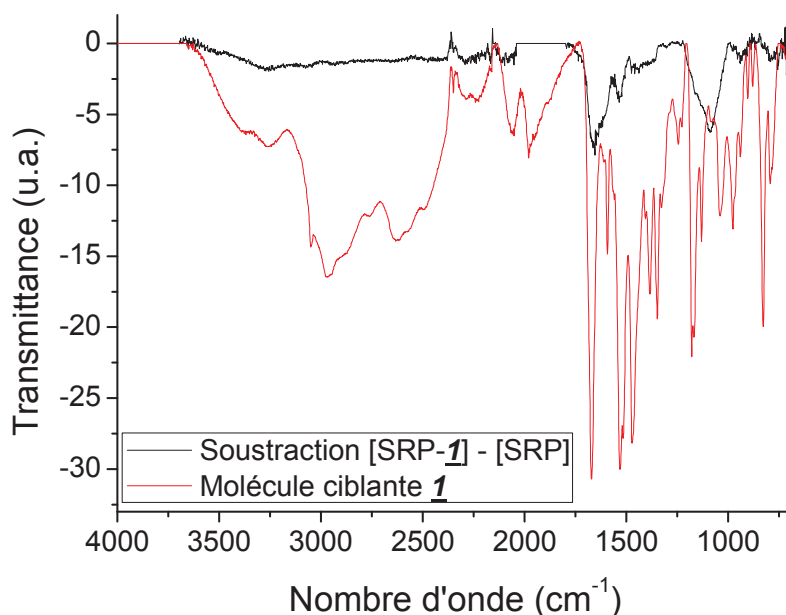


Figure III.4. Spectres IR : Spectre résultant de la soustraction des spectres IR des SRPs aux SRP-c(RGDfK) et Spectre IR du peptide c(RGDfK) seul, sous forme de sel de TFA (c(RGDfK)^+ , TFA).

L'augmentation de la bande comprise entre 1500 et 1720 cm^{-1} – comprenant les pics à 1654 cm^{-1} attribué à l'élongation C=O des amides primaires, à 1636 cm^{-1} attribué à l'élongation C-N du groupement guanidine de l'arginine (Arg^1) (Morales-Avila *et al.*, 2011 ; Braiman *et al.*, 1999), et à 1598 cm^{-1} attribué à la déformation N-H des amides primaires – atteste de la présence du peptide. La bande à 1430 cm^{-1} assignée à la déformation C-O-H des acides carboxyliques, et celle à $1084\text{-}1198\text{ cm}^{-1}$, caractéristique de l'élongation C-O des acides carboxyliques, semblent conservées. Ces observations concordent avec l'hypothèse du couplage covalent du c(RGDfK) aux SRPs.

III.3.1.2. Spectrométrie de Masse (SM)

Les études de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'ILM, au sein de l'équipe Spectrométrie des Biomolécules et Agrégats, en collaboration avec les Directeurs de Recherche Philippe Dugourd et Rodolphe Antoine, afin de confirmer le couplage covalent du pentapeptide cyclique aux SRPs.

Dans un premier temps, une solution aqueuse de SRP-c(RGDfK) a été soumise à une ionisation électrospray (ESI) pour générer des ions intacts en phase gazeuse, de manière à obtenir des informations sur le rapport masse sur charge (m/Z). Comme l'article ci-dessus le décrit, les SRPs comprennent de nombreux groupements ionisés (comme les complexes $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$), responsables de la distribution d'états de charge observée sur chaque spectre de masse obtenu. Un algorithme de corrélation multiplicatif a permis d'estimer la masse moyenne des SRP-c(RGDfK) à partir du spectre présentant le rapport m/Z , obtenu par ESI (Figure III.5). La distribution principale a été observée à une masse de $10,1 \pm 0,4$ kDa, avec une distribution plus large aux alentours de 8,7 kDa. Les états de charge pour les SRP-c(RGDfK) vont jusqu'à 8.

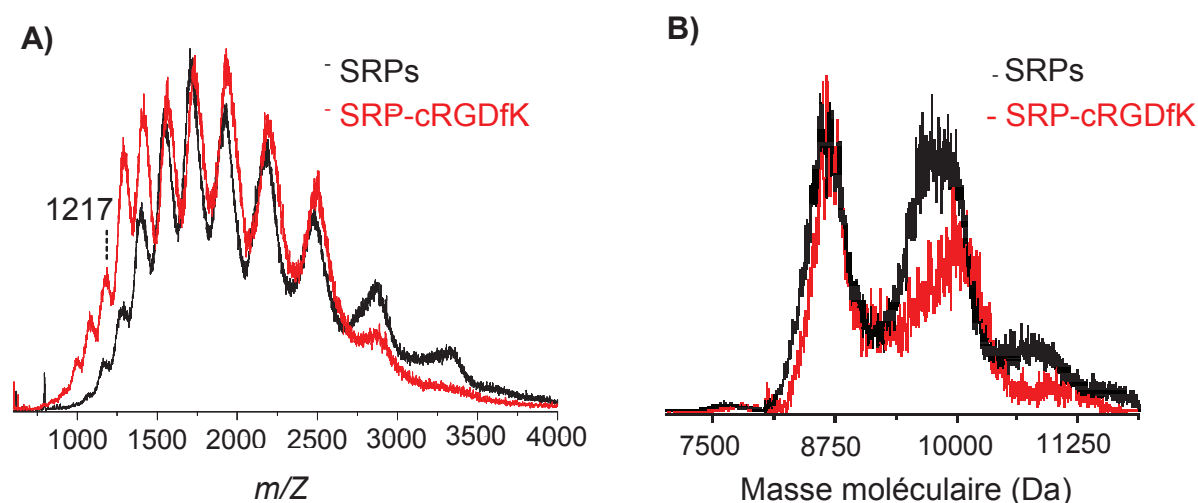


Figure III.5. (A) Spectre ESI des SRPs et des SRP-c(RGDfK) en mode positif. Le pic à m/Z 1217 semble caractéristique des SRP-c(RGDfK). (B) Algorithmes de corrélation multiplicatifs des SRPs et des SRP-c(RGDfK) déduits des spectres ESI.

De précédentes études menées sur les SRPs non fonctionnalisées ont apporté des informations supplémentaires sur la structure des SRPs aux basses masses, en mode négatif (Lux *et al.*, 2011). Par exemple, il a été démontré que le pic à m/Z 749 était spécifique du fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA-Si}(\text{OH})_3)]^-$, à savoir, le complexe $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ porté par un silanetriol issu de la matrice de polysiloxane ; la charge négative est partagée par les 4 carboxylates du ligand DOTA (Figure III.6). Conformément à nos attentes, ce pic a été observé à la fois pour les SRPs et les SRP-c(RGDfK). Un pic supplémentaire à m/Z 630 a également été observé pour les SRPs et les SRP-c(RGDfK), correspondant au clivage de la liaison amide entre les molécules de DOTA et d'APTES par la perte d'un fragment $[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OH})_3]^-$ (Harrison *et al.*, 2003). Cette rupture s'accompagne par la création d'une double liaison C=C. Aussi, le nombre de coordination de l'ion Gd^{III} variant entre 8 et 9, une molécule d'eau complète la sphère de coordination de l'ion métallique (Figure III.6).

Les pics à m/Z 1215 en mode négatif et à m/Z 1217 en mode positif décrivent le même fragment : $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA-c}(\text{RGDfK}))]$, comme le démontre la distribution isotopique, à savoir, le peptide c(RGDfK) conjugué à une molécule de DOTA complexant aussi un ion Gd^{III} ; la charge négative est cette fois-ci portée par le carboxylate de l'acide aspartique du peptide (Figure III.6). D'ailleurs, cette masse (1215 Da) correspond au pic observé à m/Z 630 auquel on additionnerait la masse du peptide

seul (603 Da) et auquel on enlèverait la masse d'une molécule d'eau (18 Da) pour la création de la liaison amide entre la molécule de DOTA et le pentapeptide cyclique.

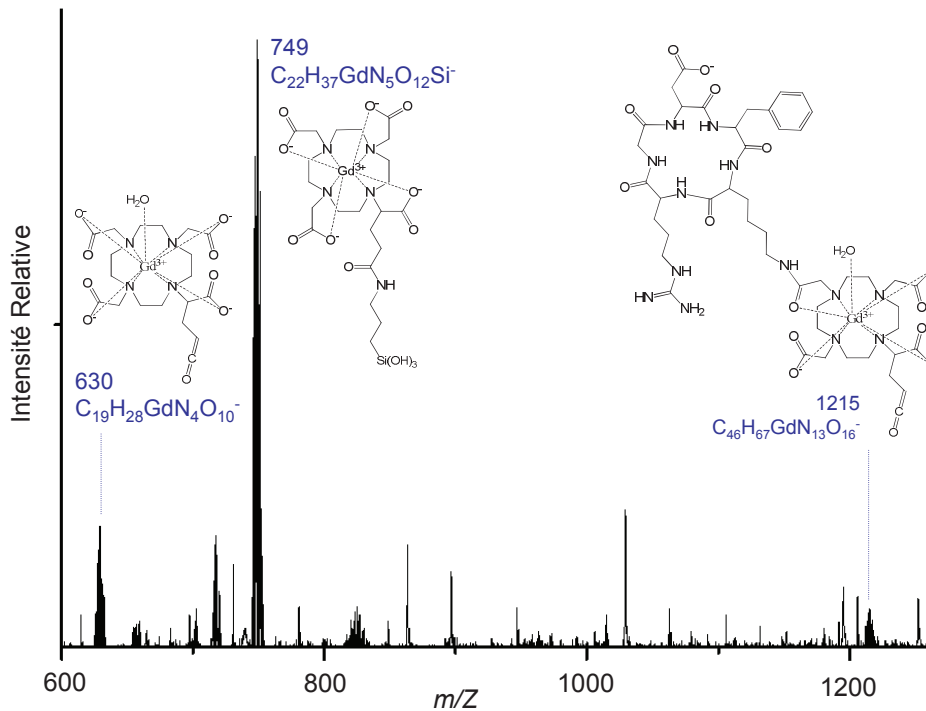


Figure III.6. Spectre ESI des SRP-c(RGDfK) aux basses masses, en mode négatif. Les pics à m/z 630 et 749 ont été observés à la fois pour les SRPs et les SRP-c(RGDfK). Le pic à m/z 1215, lui, est caractéristique des SRP-c(RGDfK).

Afin d'obtenir de plus amples informations sur la structure des SRPs, une technique de spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) a été utilisée. L'ion d'intérêt est sélectionné par le premier analyseur de masse et est ensuite activé par des collisions avec de l'hélium, provoquant une « dissociation induite par collision » (CID) dans le deuxième analyseur de masse (Paizs *et al.*, 2005). Dans notre cas, l'ion à m/z 1215 a été sélectionné pour réaliser la SM/SM en mode négatif. Le spectre obtenu par la spectrométrie de masse en tandem est dominé par 4 fragments anioniques issus de l'ion précurseur (m/z 1215) (Figure III.7).

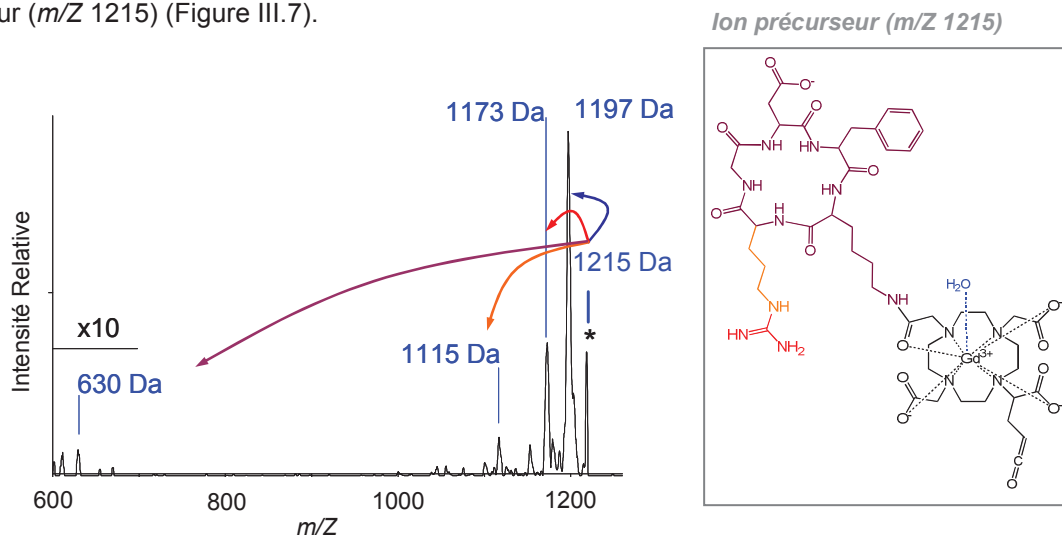


Figure III.7. Spectre obtenu après CID des SRP-c(RGDfK) en mode négatif, à partir de l'ion précurseur à m/z 1215. Les distributions isotopiques ont été réalisées pour chacun des fragments et correspondent aux formules brutes proposées.

Le pic à m/Z 1197 correspond à la perte d'un fragment de 18 Da, soit la molécule d'eau de la sphère de coordination de l'ion Gd^{III} (représentée en bleu sur la Figure III.7). Le pic à m/Z 1173 coïncide avec la perte d'un fragment de 42 Da (m/Z 1215 \rightarrow 1173), soit le groupement guanidine ($HN=C=NH$) de l'arginine (représenté en rouge sur la Figure III.7) (Paizs *et al.*, 2005 ; Summerfield *et al.*, 1995). Le pic à m/Z 1115 correspond à la perte d'un fragment de 100 Da (m/Z 1215 \rightarrow 1115), c'est-à-dire la perte complète de la chaîne latérale de l'arginine (représenté en orange sur la Figure III.7). La perte de la chaîne latérale de l'arginine se produit par clivage homolytique de la liaison reliant la chaîne latérale à l'acide aminé (Laraillet *et al.*, 2010 ; Summerfield *et al.*, 1995). Enfin, le pic à m/Z 630 correspond au fragment $[Gd^{III}(DOTA)]$, observé également en ESI (Figure III.6).

Les observations tirées des spectres ESI et CID confirment le couplage covalent du c(RGDfK) aux SRPs. Elles démontrent également que, lors de l'étape de l'ajout d'ions Gd^{III} supplémentaires pour atteindre des relaxivités plus élevées, les ions Gd^{III} peuvent être aussi bien complexés par des ligands DOTA vacants que par des ligands DOTA couplés au pentapeptide cyclique.

III.3.1.3. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible

Le spectre d'absorption UV-visible du pentapeptide c(RGDfK) en solution aqueuse présente 4 pics caractéristiques ($\lambda = 252, 258, 264$ et 308 nm) (Figure III.8. (A)). Une gamme d'étalonnage a été réalisée en milieux aqueux, afin d'obtenir les coefficients d'extinction molaire du c(RGDfK) pour les différentes longueurs d'onde : $\epsilon_{252\text{ nm}} = 24.1$, $\epsilon_{258\text{ nm}} = 64.2$, $\epsilon_{264\text{ nm}} = 55.1$ et $\epsilon_{308\text{ nm}} = 12.1$ L.mol⁻¹.cm⁻¹.

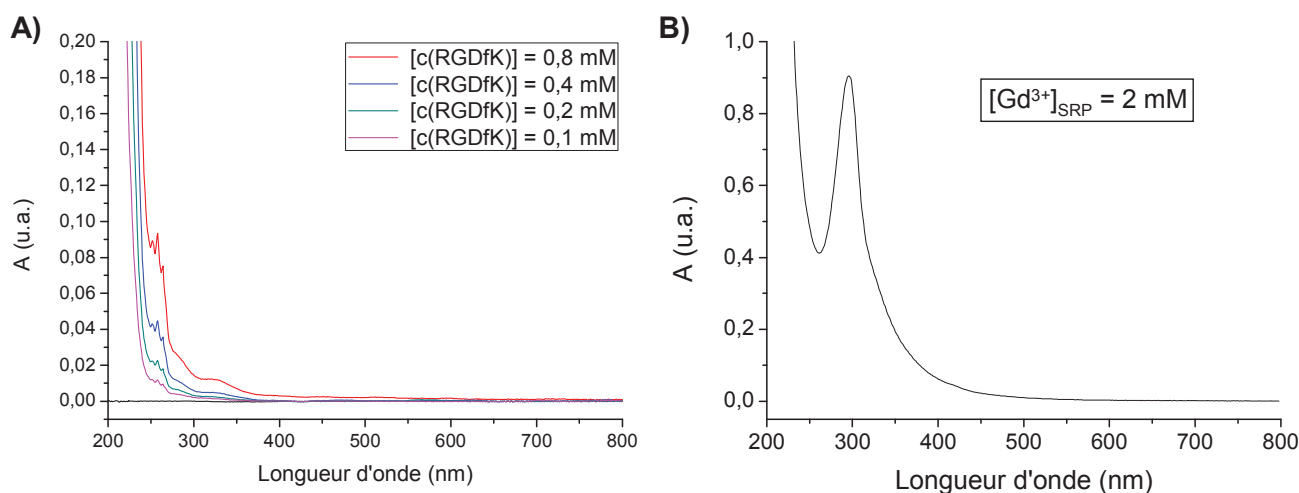


Figure III.8. (A) Gamme d'étalonnage du c(RGDfK) par absorption UV-visible. (B) Spectre d'absorption UV-visible des SRPs.

Le spectre d'absorption UV-visible des SRPs en solution aqueuse présente un pic intense à 295 nm (Figure III.8. (B)). Par conséquent, une nouvelle gamme d'étalonnage du peptide a été réalisée, en présence de SRPs : l'absorption a été mesurée pour des quantités croissantes de peptide, en présence d'une quantité constante de SRPs (Figure III.9).

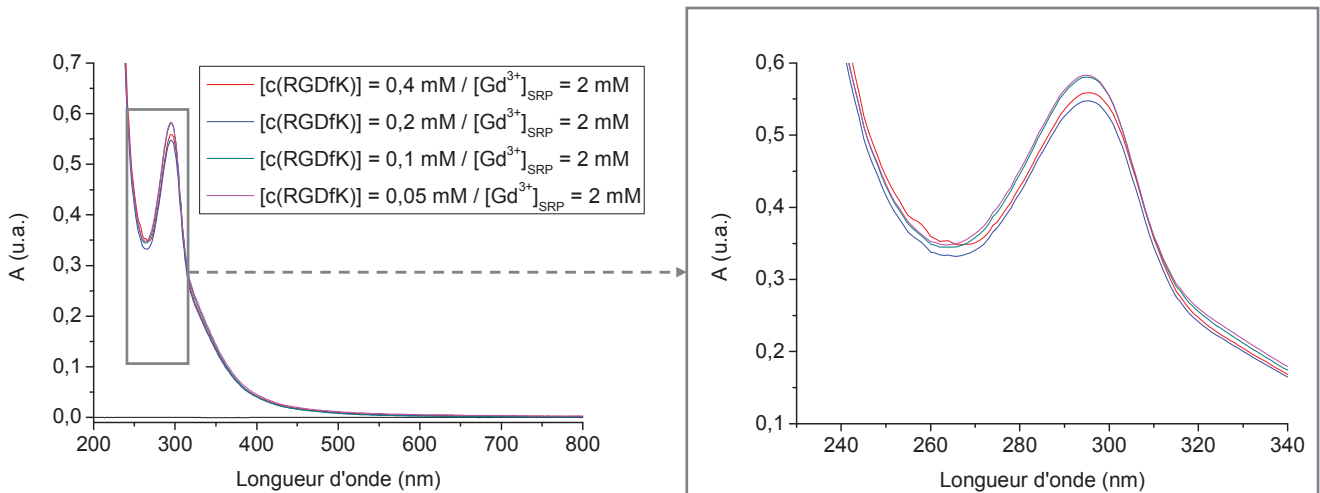


Figure III.9. Gamme d'étalonnage du c(RGDfK), en présence de SRPs, par absorption UV-visible.

La courbe représentant l'absorption du peptide (en présence de SRPs) en fonction de sa concentration a été tracée : l'absorption varie très peu et ce, de manière aléatoire. Ce phénomène était prévisible du fait des faibles valeurs des coefficients d'extinction molaire du pentapeptide cyclique : l'absorption des SRPs semble trop intense par rapport à celle du c(RGDfK) et rend l'étalonnage du peptide impossible, lorsqu'il est en présence de SRPs. La spectrophotométrie d'absorption UV-visible est donc un moyen rapide de détecter la présence du peptide dans une solution aqueuse de SRP-c(RGDfK), mais cette technique reste cependant inadaptée pour le calcul du taux de greffage du c(RGDfK) aux SRPs. En revanche, elle convient parfaitement pour la quantification du nombre de molécules de Cy5.5 greffées aux SRPs (*cf. article*).

III.3.2. Estimation du taux de greffage du c(RGDfK) aux SRPs

La spectroscopie infrarouge et la spectrophotométrie d'absorption UV-visible ont démontré la présence du c(RGDfK) dans les échantillons de SRP-c(RGDfK) et la spectrométrie de masse a mis en évidence le couplage covalent du peptide aux SRPs. Le greffage du pentapeptide cyclique aux SRPs a été validé mais ces dernières techniques ont montré leurs limites pour la quantification du nombre de c(RGDfK) par SRP. Afin d'estimer le rendement de greffage du peptide aux SRPs, 3 techniques quantitatives ont été utilisées : la spectroscopie de fluorescence, la chromatographie liquide haute performance et l'analyse élémentaire.

III.3.2.1. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est un outil qualitatif et quantitatif puissant, du fait de sa sensibilité élevée et de sa grande sélectivité (Lawaetz *et al.*, 2009). Cette technique de caractérisation nous a permis d'estimer le taux de greffage du c(RGDfK) aux SRPs.

- Réglages de l'appareil pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage du c(RGDfK) :

Une gamme d'étalonnage de fluorescence du peptide a tout d'abord été réalisée, de manière à optimiser les paramètres du spectrophotomètre. En considérant les spectres d'absorption UV-visibles du c(RGDfK) précédents, la longueur d'onde d'excitation a d'abord été fixée à 250 nm. Le spectre d'émission de fluorescence du peptide présente un signal global, résultant de la contribution de deux espèces : le Raman de l'eau et l'émission du peptide. Le pic du Raman de l'eau est une conséquence de la perte d'énergie des photons incidents issus de la vibration dans les molécules d'eau ; la fréquence de cette perte d'énergie a été fixée approximativement autour de 3400 cm^{-1} . L'équation suivante permet de calculer la position spectrale du pic du Raman de l'eau pour toute solution aqueuse en fonction de la longueur d'onde d'excitation (Lawaetz *et al.*, 2009) :

$$\lambda_{em \text{ pic Raman eau}} = 10^7 / [(10^7 / \lambda_{exc}) - 3400]$$

où $\lambda_{em \text{ pic Raman eau}}$ est la longueur d'onde d'émission du pic du Raman de l'eau et λ_{exc} la longueur d'onde d'excitation (en nm). Dans notre cas, la longueur d'onde d'excitation a été décalée de 10 nm et fixée à 240 nm, de manière à séparer le pic du Raman de l'eau du pic d'émission de fluorescence du peptide.

- Réglages de l'appareil pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage du c(RGDfK) en présence de SRPs :

Les paramètres du spectrophotomètre doivent être judicieusement choisis et adaptés au c(RGDfK) en présence des SRPs. Par exemple, la longueur d'onde d'excitation a été fixée la plus basse possible ($\lambda_{exc} = 240 \text{ nm}$), non seulement pour décaler le pic du Raman de l'eau, mais aussi pour éviter une éventuelle interférence avec la luminescence du gadolinium contenu dans les SRPs. En effet, l'ion Gd^{III} dispose d'une intensité d'émission de luminescence maximale à 312 nm lorsqu'il est excité à 274 nm. Ainsi, plus la longueur d'onde d'excitation est basse, moins l'émission de fluorescence du c(RGDfK) sera perturbée par la luminescence des ions Gd^{III} contenus dans les SRPs. Pour les mêmes raisons, la largeur des fentes d'excitation et d'émission a été réduite au maximum, de manière à centrer l'excitation sur le peptide et à récupérer son signal sans être gêné par la luminescence des ions Gd^{III} . Par conséquent, la largeur des fentes d'excitation et d'émission a été fixée à 2,5 nm.

D'autre part, pour des solutions fortement concentrées, un phénomène de ré-absorption du photon est susceptible de se produire, et plus particulièrement pour les photons émis à la longueur d'onde correspondant au domaine de recouvrement des spectres d'absorption et d'émission. L'intensité de l'émission de fluorescence risque alors de ne pas être proportionnelle à la concentration de l'espèce mesurée (Valeur, 2001). Pour éviter ce phénomène de ré-absorption, les échantillons doivent être suffisamment dilués pour atteindre des valeurs d'absorption UV-visible les plus faibles possibles au niveau de la longueur d'onde d'excitation sélectionnée (dans notre cas : $\lambda_{exc} = 240 \text{ nm}$). Par conséquent, la cuve servant aux mesures de fluorescence doit présenter le chemin optique le plus court (dans notre cas : 5 mm).

- Réalisation de la gamme d'étalonnage du c(RGDfK) en présence de SRPs par spectroscopie de fluorescence :

Les paramètres du spectrophotomètre ayant été optimisés et l'absorbance des échantillons étant la plus faible possible ($A_{240\text{ nm}} < 0,1$), la gamme d'étalonnage du c(RGDfK) en présence des SRPs a pu être réalisée par fluorescence. Une quantité invariante de SRPs a été ajoutée aux échantillons contenant le peptide à différentes concentrations, puis les spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés entre 240 et 315 nm (Figure III.10. (A)). Ces spectres présentent deux pics : le plus large et le plus intense, dont le maximum d'émission de fluorescence est à 282 nm, correspond au c(RGDfK) et varie linéairement en fonction de sa concentration. L'autre pic, dont le maximum d'émission de fluorescence est à 261 nm, est attribué au Raman de l'eau et son intensité reste constante, quelle que soit la concentration du peptide.

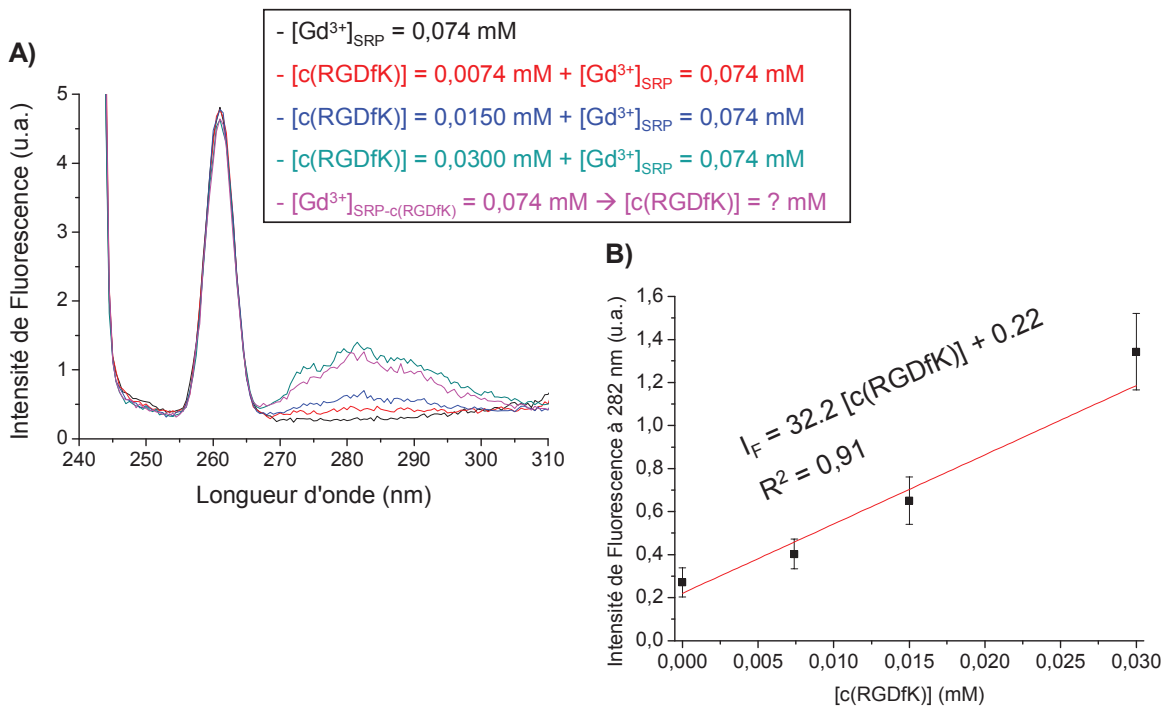


Figure III.10. (A) Spectres d'émission de fluorescence d'échantillons contenant du c(RGDfK) à différentes concentrations et des SRPs en quantités égales pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage du peptide, en présence de SRPs (courbes noire, rouge, bleue et cyan foncé) ($\lambda_{exc} = 240\text{ nm}$). Spectre d'émission de fluorescence des SRP-c(RGDfK) pour le calcul du taux de greffage du peptide aux SRPs (courbe magenta) ($\lambda_{exc} = 240\text{ nm}$). **(B)** Courbe représentant l'intensité de fluorescence à 282 nm en fonction de la concentration du c(RGDfK).

La courbe représentant les *maxima* d'intensité d'émission fluorescence du peptide en fonction de sa concentration est tracée (Figure III.10. (B)) : il s'agit d'une droite affine dont l'équation est la suivante :

$$I_F (\lambda_{em} = 282\text{ nm}) = 32.2 [c(RGDfK)] + 0.2$$

(où I_F est l'intensité d'émission de fluorescence observée à 282 nm et $[c(RGDfK)]$ la concentration du peptide (en mmol/L), $R^2=0.91$).

- Fluorescence des SRP-c(RGDfK) et estimation du taux de greffage du c(RGDfK) aux SRPs :

Les mesures de fluorescence des SRP-c(RGDfK) ont été réalisées dans les conditions définies précédemment. Le spectre d'émission de fluorescence des SRP-c(RGDfK) a été superposé à la gamme d'étalonnage précédente (Figure III.10. (A)). La quantité de c(RGDfK) par ion Gd^{III} est déterminée grâce à l'équation de la courbe d'étalonnage du peptide en présence des SRPs. Les résultats sont regroupés dans le Tableau III.1.

	c(RGDfK)	SRP-c(RGDfK)	SRP-Cy5.5-c(RGDfK)
<i>Emission de Fluorescence</i>	$(\lambda_{exc}=240nm, \lambda_{em}=282nm)$		
	$I_f = 32.2 [c(RGDfK)] + 0.22$		
Intensité de fluorescence	/	1.201	1.062
Rapport c(RGDfK) / Gd^{III}	/	0.41	0.35

Tableau III.1. Exploitation des spectres obtenus par émission de fluorescence à 282 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) pour l'estimation du nombre de c(RGDfK) par ion Gd^{III} .

Les SRP-c(RGDfK) présentent 0,41 peptide par ion Gd^{III} ; ce rapport est légèrement inférieur pour les SRP-Cy5.5-c(RGDfK) (0,35).

III.3.2.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les spectres d'absorption UV-visible et d'émission de fluorescence des SRP-c(RGDfK) et des SRP-Cy5.5-c(RGDfK) ont permis de sélectionner 3 longueurs d'ondes spécifiques pour réaliser les mesures d'HPLC. La longueur d'onde du détecteur d'absorption UV-visible est fixée à 295 nm ; cette longueur d'onde est spécifique aux SRPs et permettra de détecter toutes les populations de SRPs (fonctionnalisées ou non). Les émissions de fluorescence seront mesurées simultanément à 2 longueurs d'onde différentes : 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) et 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm) pour observer respectivement les signaux dus au c(RGDfK) et ceux dus à la Cy5.5. Les chromatogrammes de chacun des échantillons de SRPs (fonctionnalisées avec du cRGDfK ou non, et marquées par de la Cy5.5 ou non) ont été réalisés pour les 3 longueurs d'onde différentes.

- Observation des chromatogrammes détectant un signal d'absorption UV-visible à 295 nm :

La proportion principale du signal détecté par absorption UV-visible à 295 nm est observée à des temps de rétention compris entre 13 et 23 min (Figure III.11). Le plus petit pic à 2,5 min est attribué à des fragments de dégradation et reste négligeable devant le signal précédent. A 295 nm, l'absorption détectée entre 13 et 23 min suggère la présence de plusieurs populations de SRPs, pouvant résulter d'une hétérogénéité en taille, ainsi qu'en quantité d'éléments greffés à la surface des SRPs.

Les SRPs fonctionnalisées par de la Cy5.5 et/ou du c(RGDfK) semblent être plus retenues par la colonne que les SRPs non fonctionnalisées. Au vu des chromatogrammes obtenus pour les

différents échantillons de SRPs à 295 nm, une première population de SRPs non fonctionnalisées semble être détectée à un temps de rétention avoisinant 13,7 min, puis une seconde population de SRPs marquées par de la Cy5.5 serait détectée aux alentours de 15,2 min et une troisième population autour de 16 min pourrait être attribuée aux SRPs fonctionnalisées par du c(RGDfK).

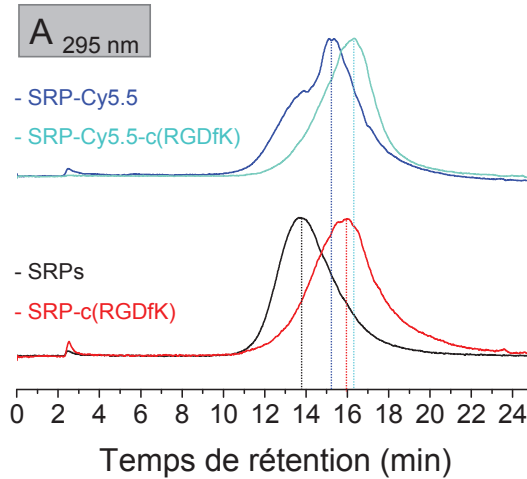


Figure III.11. Chromatogrammes normalisés de chacun des échantillons de SRPs, obtenus par détection du signal d'absorption UV-visible à 295 nm.

- Observation des chromatogrammes détectant un signal d'émission de fluorescence à 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm) :

Les hypothèses énoncées ci-dessus sont confirmées par les chromatogrammes obtenus par détection d'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 692$ nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm)) (Figure III.12). Les pics uniques observés par émission de fluorescence à 692 nm sont exclusivement dus à la conjugaison de la Cy5.5 aux SRPs. La population relative aux SRP-Cy5.5 est détectée à un temps de rétention autour de 15,2 min tandis que celle des SRP-Cy5.5-c(RGDfK) est trouvée à 16,5 min. Ce décalage suggère que les particules observées dans le deuxième cas sont plus grosses et par conséquent, confirme le greffage du peptide.

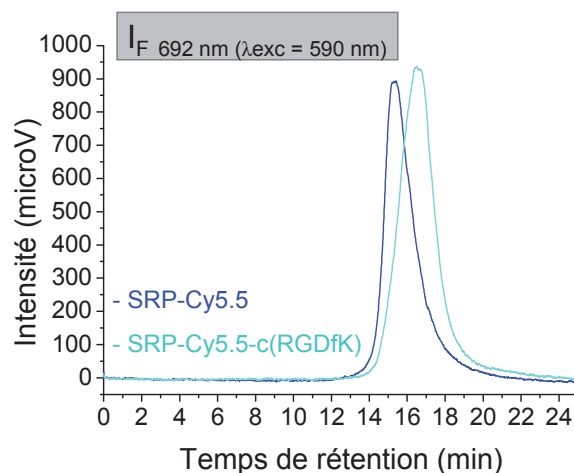


Figure III.12. Chromatogrammes des échantillons de SRPs marqués par de la Cy5.5, obtenus par détection du signal d'émission de fluorescence à 692 nm ($\lambda_{exc} = 590$ nm).

- Observation des chromatogrammes détectant un signal d'émission de fluorescence à 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) :

En ce qui concerne l'étude des chromatogrammes détectant un signal d'émission de fluorescence à 281 nm, une étude préliminaire s'est avérée nécessaire : le chromatogramme du peptide seul en solution aqueuse a été réalisé. Un unique pic dont le temps de rétention est centré sur 7,75 min a été détecté (Figure III.13). Les chromatogrammes des deux échantillons de SRPs fonctionnalisés par du c(RGDfK) (SRP-c(RGDfK) et SRP-Cy5.5-c(RGDfK)) présentent un petit pic à ce même temps de rétention, attribué aux fragments de dégradation des SRPs, à savoir $\text{Si(OH)}_3\text{-DOTA-c(RGDfK)}$ et/ou $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{Si(OH)}_3\text{-DOTA-c(RGDfK)})]$ (Figure III.13). Cependant, la majeure proportion d'émission de fluorescence observée a été détectée pour des temps de rétention compris entre 13 et 23 min, rendant la quantité de fragments de dégradation négligeable.

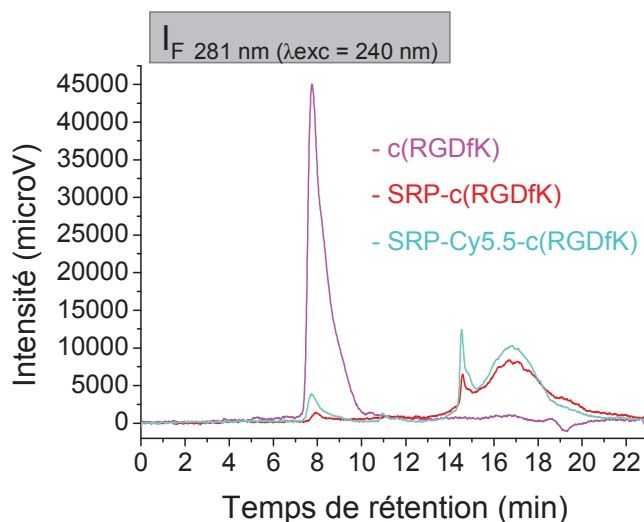


Figure III.13. Chromatogrammes du c(RGDfK) seul et des échantillons de SRPs fonctionnalisés avec du c(RGDfK), obtenus par détection du signal d'émission de fluorescence à 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm).

En considérant la linéarité de la relation entre l'aire sous le pic et la concentration du peptide (pas d'émission de fluorescence détectée en l'absence de peptide), l'aire sous le pic des SRP-c(RGDfK) et sous celui des SRP-Cy5.5-c(RGDfK) devrait être proportionnelle à la concentration en c(RGDfK) (Kafka *et al.*, 2010). Pour faciliter la quantification du peptide, une seule gaussienne a été tracée ; l'aire de cette gaussienne et son temps de rétention sont rapportés dans le Tableau III.2.

	c(RGDfK)	SRP-c(RGDfK)	SRP-Cy5.5-c(RGDfK)
HPLC	$(\lambda_{exc}=240\text{nm}, \lambda_{em}=281\text{nm})$		
	$([\text{c(RGDfK)}] = 0.246\text{mM})$		
Temps de Rétention (min)	7.93	16.85	16.61
Aire sous la Gaussienne	29423	30190	32604
Rapport c(RGDfK) / Gd^{III}	/	0.40	0.44

Tableau III.2. Exploitation des chromatogrammes obtenus par détection d'émission de fluorescence à 281 nm ($\lambda_{exc} = 240$ nm) pour l'estimation du nombre de c(RGDfK) par ion Gd^{III} .

Les quantités de peptide par ion Gd^{III} obtenues par HPLC (0,40 pour les SRP-c(RGDfK) et 0,44 pour les SRP-Cy5.5-c(RGDfK)) sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par fluorescence.

III.3.2.3. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont également permis d'évaluer le taux de greffage du c(RGDfK) aux SRPs. Les pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire sont regroupés dans le Tableau III.3 et les rapports molaires déduits de ces pourcentages massiques sont rapportés dans le Tableau III.4.

Deux hypothèses ont été faites pour estimer la composition chimique de chacun des échantillons contenant les SRPs :

- chaque SRP possède 10 molécules de DOTA ;
- le rapport molaire APTES/TEOS de la matrice de polysiloxane reste constant pendant les différentes étapes de synthèse et de purification (0,6 APTES / 0,4 TEOS).

Enfin, en accord avec les résultats de dosage des molécules de DOTA vacantes par phosphorescence (*cf.* article), une dernière hypothèse sur le nombre d'atomes de gadolinium par SRP est prise en compte : les SRPs initiales contenaient 3 (± 0.5) atomes de gadolinium par SRP tandis que les SRPs finales (après marquage à la Cy5.5 et/ou greffage du c(RGDfK), et « remontée en ions Gd^{III} ») en contiennent 5 (± 0.8).

En considérant ces hypothèses et les rapports molaires – à savoir Si/Gd, C/Gd and N/Gd – il est possible de déduire une formule brute approximative par une méthode empirique. Comme seuls les pourcentages massiques des atomes de Gd, Si, C et N ont été mesurés, il convenait de prendre en compte dans nos calculs les atomes différents de ceux-ci, susceptibles d'être contenus dans les échantillons. Par exemple, les molécules d'eau ont dû être prises en compte, tout comme les molécules de solvant. D'ailleurs, les SRPs initiales ayant été synthétisées dans du diéthylène glycol (DEG), quelques molécules de solvant ont pu être piégées au sein de la matrice de polysiloxane durant la synthèse.

Les formules brutes indiquées dans le Tableau III.5 sont approximatives. Le nombre de molécules d'eau a été estimé à titre indicatif et ces molécules d'eau pourraient d'ailleurs être remplacées par des contre-ions par exemple. Ces formules brutes ont été déduites avec une erreur absolue inférieure à 0,55% par rapport aux pourcentages massiques fournis dans le Tableau III.3.

	SRPs			SRP-c(RGDfK)			SRP-Cy5.5			SRP-Cy5.5-c(RGDfK)		
<i>Analyses Élémentaires - (Pourcentages massiques)</i>												
%Gd	Exp. 8.23	Theo. 8.24	Err. 0.01	Exp. 6.98	Theo. 7.35	Err. 0.37	Exp. 7.88	Theo. 8.10	Err. 0.22	Exp. 7.11	Theo. 7.22	Err. 0.11
%Si	10.08	10.13	0.05	8.03	8.48	0.45	10.64	10.97	0.33	9.26	9.43	0.17
%N	8.63	8.91	0.28	10.42	10.72	0.30	8.60	9.10	0.50	10.40	9.88	0.52
%C	31.94	31.72	0.22	35.85	35.42	0.43	35.54	35.17	0.37	32.86	33.38	0.52

Tableau III.3. Analyses élémentaires (en pourcentages massiques). Pour chaque échantillon, les données expérimentales sont présentées en premier (en noir) ; elles sont fournies par le Service Central d'Analyses de Solaize, du CNRS. Ensuite, les

Chapitre III – Fonctionnalisation des SRPs avec un peptide cyclique contenant le motif RGD pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

pourcentages massiques théoriques sont indiqués (en bleu) : ils correspondent aux pourcentages massiques déduits des formules brutes estimées présentées dans le Tableau III.5. Enfin, les écarts absolus entre les données expérimentales et théoriques sont indiqués.

	SRPs	SRP-c(RGDfK)	SRP-Cy5.5	SRP-Cy5.5-c(RGDfK)
Analyses Élémentaires - Rapports molaires				
Si/Gd	6.9	6.5	7.6	7.3
N/Gd	11.8	16.8	12.3	16.4
C/Gd	50.9	67.3	59.1	60.6

Tableau III.4. Rapports molaires déduits des pourcentages massiques fournis par le Service Central d'Analyses de Solaize.

	SRPs	SRP-c(RGDfK)	SRP-Cy5.5	SRP-Cy5.5-c(RGDfK)
Analyses Élémentaires - Formules brutes				
Nombre d'atomes/molécules de par SRP				
Gd	5	5	5	5.5
DOTA	10	10	10	10
APTES/TEOS	20.6 / 13.8	19.4 / 12.9	22.7 / 15.2	24.1 / 16.1
Cy5.5	/	/	0.15	0.27
c(RGDfK)	/	2.5	/	2.2
H ₂ O (ou contre-ions)	60	54	15	83
DEG	0	0	5	0

Tableau III.5. Formules brutes estimées pour chacun des échantillons et déduites des pourcentages massiques fournis par le Service Central d'Analyses de Solaize.

Par analyse élémentaire, le nombre de c(RGDfK) par SRP est estimé à 2,5 pour les SRP-c(RGDfK) et à 2,2 pour les SRP-Cy5.5-c(RGDfK).

III.3.2.4. Récapitulatif des 3 techniques ayant permis l'estimation de la quantité de c(RGDfK) par SRP

En multipliant les rapports molaires c(RGDfK)/Gd^{III} obtenus par spectrométrie de fluorescence et par HPLC par le nombre d'ions Gd^{III} estimés par analyse élémentaire, nous obtenons un nombre de peptide par SRP. Les résultats sont regroupés dans le Tableau III.6.

	SRP-c(RGDfK)	SRP-Cy5.5-c(RGDfK)
Analyse élémentaire		
Nombre d'ions Gd ^{III} par SRP	5	5,5
Nombre de c(RGDfK) par SRP	2,5	2,2
Spectroscopie de Fluorescence		
Nombre de c(RGDfK) par SRP	2,1	1,9
HPLC		
Nombre de c(RGDfK) par SRP	2	2,4
Moyenne	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,3

Tableau III.6. Récapitulatif des quantités de c(RGDfK) par SRP obtenues par les 3 techniques de caractérisation différentes.

Les quantités de c(RGDfK) par SRP obtenues sont du même ordre de grandeur pour les 3 techniques de caractérisation (analyse élémentaire, spectroscopie de fluorescence et HPLC). Les SRP-c(RGDfK) et les SRP-Cy5.5-c(RGDfK) présentent environ 2,2 peptides par SRP. La présentation multimérique du ligand RGD étant connue pour améliorer le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, les SRPs fonctionnalisées avec du c(RGDfK) disposent des pré-requis nécessaires pour exprimer une forte affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ lors des tests de ciblage *in vitro* et une captation accrue par les tumeurs sur-exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ lors des tests *in vivo* (cf. résultats *in vitro* et *in vivo* dans l'article).

III.4. Conclusion

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est sur-exprimée par les cellules endothéliales néoformées de la vascularisation tumorale, ainsi que par les cellules tumorales de nombreux cancers. La séquence RGD étant un ligand hautement sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le pentapeptide cyclique RGDfK a été greffé aux SRPs dont le fort potentiel en termes de détection par imagerie médiale et de radiosensibilisation a déjà été présenté (Lux *et al.*, 2011).

Des techniques qualitatives – à savoir : les profils NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion), la PCS (Photon Correlation Spectroscopy), la FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), la mesure du potentiel ζ , la spectroscopie infrarouge, la spectrométrie de masse et la spectroscopie par absorption UV-visible – ont validé le greffage covalent du c(RGDfK) aux SRPs. Trois méthodes de caractérisation – à savoir : la spectroscopie de fluorescence, la chromatographie liquide haute performance et les analyses élémentaires – ont ensuite permis d'estimer la quantité de peptide par nanoparticule. Les SRPs fonctionnalisées avec du c(RGDfK) présentant plus de 2 peptides par nanoparticule, ce sont des candidats prometteurs pour un diagnostic tumoral sélectif et une thérapie ciblée.

Le ciblage des SRPs fonctionnalisées avec du c(RGDfK) sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a d'ailleurs été mis en évidence par différentes techniques biologiques *in vitro* (cytométrie de flux, FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), tests IC_{50} et microscopie de fluorescence) sur deux lignées cellulaires : HEK293(β_3) and U87MG. La sélectivité des SRPs fonctionnalisées avec du c(RGDfK) pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été démontrée par la mise en place de témoins négatifs comme les SRPs non fonctionnalisées ou les SRPs fonctionnalisées avec du c(RADfK).

Enfin, la captation tumorale des SRPs fluorescentes fonctionnalisées avec du c(RGDfK) a été reflétée de manière significative lors de tests *in vivo* par imagerie optique sur des souris porteuses de tumeurs issues de la lignée U87MG. Cette première expérience de ciblage actif sur les modèles U87MG s'avère prometteuse pour de futures études sur la radiothérapie guidée par imagerie sur glioblastome.

Chapitre IV

*Fonctionnalisation des SRPs avec des
molécules dérivées de la quinoxaline pour
le ciblage de la mélanine*

IV. Fonctionnalisation des SRPs avec des molécules dérivées de la quinoxaline pour le ciblage de la mélanine

IV.1. INTRODUCTION	193
IV.1.1. LE MELANOME	193
IV.1.2. LA MELANINE, UNE CIBLE DE CHOIX POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU MELANOME – STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES	193
IV.1.2.1. DIFFERENTS ROLES DE LA MELANINE DANS LE CORPS HUMAIN	193
IV.1.2.2. STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA MELANINE	194
IV.1.3. PRESENTATION DES MOLECULES CIBLANT LA MELANINE	197
IV.1.4. MOLECULES FINALES SELECTIONNEES POUR LE COUPLAGE AUX SRPs EN VUE D'UN CIBLAGE ACTIF DE LA MELANINE	197
IV.1.5. VALIDATION IN VITRO DE L’AFFINITE DES SRPs FONCTIONNALISEES PAR LES MOLECULES CIBLANTES DERIVEES DE LA QUINOXALINE POUR LA MELANINE	199
IV.1.5.1. PRINCIPE DE LA RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE	199
IV.1.5.2. PRINCIPE DU BIACORE®	200
IV.1.5.3. VALIDATION DE L’AFFINITE DES SRPs FONCTIONNALISEES PAR LES MOLECULES CIBLANTES DERIVEES DE LA QUINOXALINE PAR LA TECHNOLOGIE BIACORE®	202
IV.2. ARTICLE	204
IV.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	218
IV.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DES MOLECULES CIBLANTES 1, 2 ET 3, DERIVEES DE LA QUINOXALINE, AUX SRPs	218
IV.3.1.1. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE (IR)	218
IV.3.1.2. SPECTROMETRIE DE MASSE (SM)	220
IV.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DES MOLECULES CIBLANTES 1, 2 ET 3, DERIVEES DE LA QUINOXALINE, AUX SRPs	222
IV.3.2.1. SPECTROPHOTOMETRIE D’ABSORTION UV-VISIBLE	223

IV.3.2.2. ANALYSE ELEMENTAIRE	224
IV.3.2.3. RECAPITULATIF DES 2 TECHNIQUES AYANT PERMIS L'ESTIMATION DE LA QUANTITE DE MOLECULES CIBLANTES PAR SRP	225
IV.4. CONCLUSION	226

IV.1. Introduction

IV.1.1. Le mélanome

Le mélanome est un cancer qui affecte 132 000 nouveaux patients chaque année dans le monde. Le mélanome représente seulement 4% des cas de cancer de la peau, pourtant, il cause 79% des décès liés aux cancers de la peau et il concerne plus particulièrement les individus situés dans la tranche d'âge comprise entre 30 et 50 ans. Alors que les tumeurs primaires localisées au niveau de la peau sont généralement traitées avec succès par ablation chirurgicale, il n'existe aucun traitement satisfaisant pour le mélanome métastatique. Ces 25 dernières années, les efforts réalisés dans le but d'améliorer le pronostic du mélanome métastatique ont été vains. Le taux de survie moyen des patients atteints d'un mélanome au stade IV est d'environ 9 mois, et les cas de taux de survie au-delà de 3 ans sont inférieurs à 15% (Baldea *et al.*, 2012 ; Ballard *et al.*, 2011).

Les mélanomes peuvent se développer dans tous les territoires anatomiques comportant des mélanocytes. Le mélanome cutané, qui se développe à partir des mélanocytes épidermiques de la peau, est le site d'origine le plus courant. Cependant, des mélanocytes non cutanés – comme ceux qui tapissent la couche choroïdienne de l'œil, les surfaces respiratoires, gastro-intestinales et celles des muqueuses génito-urinaires, ou encore les méninges (membranes enveloppant le système nerveux central) – peuvent parfois faire l'objet d'une transformation maligne, bien qu'à une fréquence relativement lente (Tsao *et al.*, 2012).

IV.1.2. La mélanine, une cible de choix pour le diagnostic et le traitement du mélanome – Structure et propriétés physicochimiques

La plupart des mélanomes sont pigmentés par la présence de mélanine. Bien que certains mélanomes puissent être amélanotiques (incolores), ils contiennent de la mélanine (Ballard *et al.*, 2011). Les pigments de mélanine sont détectés dans plus de 90% des mélanomes primaires (McClain *et al.*, 2012) et dans 40 à 50% des lésions métastatiques (Premkumar *et al.*, 1996). La mélanine est donc une cible de choix pour le développement d'agents d'imagerie, de thérapie ou théranostiques, pour le diagnostic et/ou le traitement du mélanome métastatique.

IV.1.2.1. Différents rôles de la mélanine dans le corps humain

Les mélanines sont particulièrement connues pour absorber la lumière ultraviolette et visible et la dissiper sous forme de chaleur : elles ont longtemps été considérées comme des pigments, dont le rôle principal était de protéger la peau, les yeux et les cheveux des effets néfastes du rayonnement solaire (Shanmuganathan *et al.*, 2011). Cependant, leur présence dans la *substantia nigra* (substance noire, noyau du système nerveux) au sein du tronc cérébral et dans d'autres régions non exposées au soleil suggère d'autres fonctions. Par exemple, il a été proposé que les mélanines jouent un rôle plus important en termes de réponse immunitaire qu'en termes de photoprotection. Paradoxalement, les

précurseurs d'eumélanine et de phéomélanine – les deux formes prédominantes de mélanine dans le corps humain – sont impliqués dans le développement du mélanome. De plus, des insuffisances en neuromélanine (une forme hybride d'eumélanine et de phéomélanine) ont été remarquées au niveau du tronc cérébral des patients souffrant de différentes maladies neuro-dégénératives comme Parkinson. Manifestement, ces bio-macromolécules sont importantes d'un point de vue biologique et médical (Meredith *et al.*, 2006).

IV.1.2.2. Structure et propriétés physicochimiques de la mélanine

L'organisation supramoléculaire des macromolécules biologiques comme les protéines et l'ADN influe directement sur leurs propriétés physicochimiques et leurs fonctions correspondantes. Cette organisation est essentiellement dirigée par des interactions non covalentes, et plus particulièrement les liaisons hydrogène et les forces de Van der Waals. Les interactions non covalentes contrôlent une grande variété de phénomènes biomoléculaires, à savoir : (i) la conformation en double hélice des brins complémentaires d'ADN, (ii) la formation de structures secondaire ou tertiaire d'une protéine, (iii) les mécanismes de reconnaissance moléculaire, ainsi que (iv) les délocalisations électroniques et transferts de charges dans les systèmes photosynthétiques (Watt *et al.*, 2009).

- Structure de la mélanine :

La mélanine est un copolymère amorphe et statistique d'eumélanine (pigments brun-noir) et de phéomélanine (pigments jaune à rouge), tous deux dérivés d'un précurseur commun : la dopaquinone (Figure IV.1) (Sono *et al.*, 2012 ; Shanmuganathan *et al.*, 2011 ; Wakamatsu *et al.*, 2002 ; Wood *et al.*, 1999 ; Jimbow *et al.*, 1984).

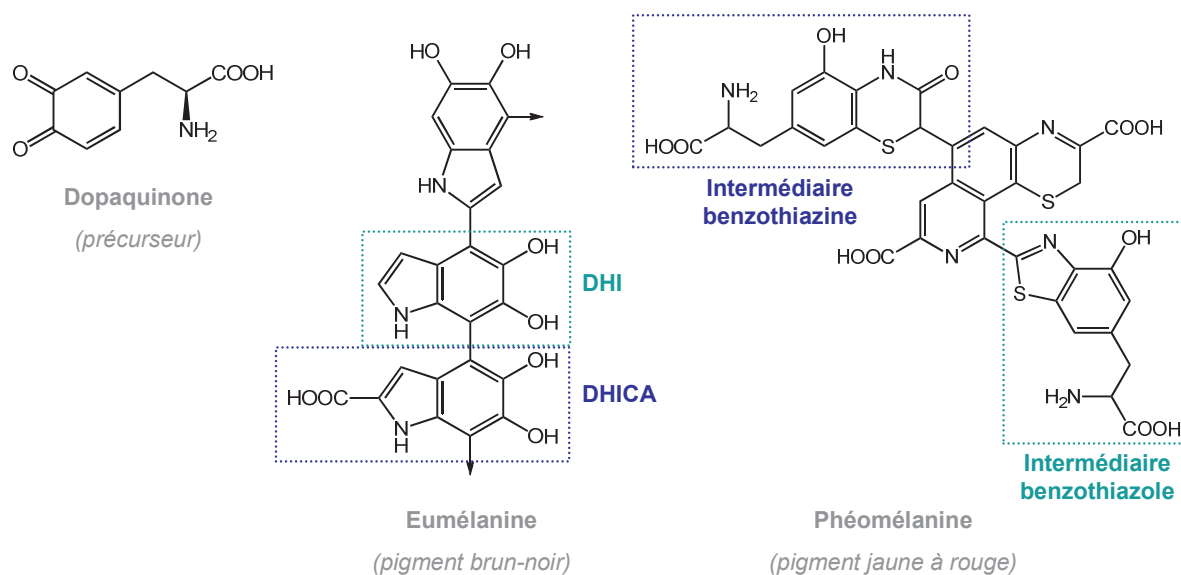


Figure IV.1. Représentation de la dopaquinone, précurseur commun à l'eumélanine et à la phéomélanine, les deux formes prédominantes de mélanine dans le corps humain (Sono *et al.*, 2012 ; Shanmuganathan *et al.*, 2011). L'eumélanine est un pigment brun-noir dérivé de la polymérisation par couplage oxydant de la DHI (5,6-dihydroxyindole) et de la DHICA (5,6-

dihydroxyindole-2-carboxylic acid). La phéomélanine est un pigment jaune à rouge dérivé d'unités cysteinyl-dopa impliquées dans la formation des intermédiaires benzothiazine et benzothiazole.

Si les sous-unités basiques de la mélanine telles que l'eumélanine et la phéomélanine sont bien connues, l'organisation de ces sous-unités est néanmoins encore incomprise et reste à l'origine de nombreux débats. En effet, certains s'accordent à dire que les mélanines sont des polymères hétérogènes hautement réticulés tandis que d'autres affirment qu'il s'agit d'oligomères condensés sous formes de nano-agrégats (Bernsmann *et al.*, 2011 ; Shanmuganathan *et al.*, 2011). De récentes études ont mis en évidence l'organisation supramoléculaire des sous-unités sous forme de feuillets planaires empilés et espacés de manière régulière, ce qui concorde avec la deuxième hypothèse. L'interaction dite aromatique est d'ailleurs une sous-classe particulièrement importante d'effets non covalents : elle est dominée par de fortes interactions intermoléculaires attractives entre les systèmes π . Ces interactions π - π provoquent un empilement (« stacking ») des molécules dont les distances de « stacking » sont comprises entre 3 et 4 Å (Watt *et al.*, 2009).

- Propriétés physicochimiques de la mélanine :

Les mélanines naturelles sont des pigments amorphes insolubles dans l'eau, les solutions acides et la plupart des solvants organiques, ce qui a souvent limité leurs analyses physicochimiques (Shanmuganathan *et al.*, 2011 ; Zonios *et al.*, 2008). Les mélanines naturelles sont généralement uniquement solubles dans des solutions alcalines (Ye *et al.*, 2011). Le développement de mélanines synthétiques solubles dans le DMF (diméthylformamide), présentant des propriétés physicochimiques semblables à celles des mélanines naturelles, a permis de contourner ce problème (Shanmuganathan *et al.*, 2011 ; Zonios *et al.*, 2008).

Les mélanines, et plus particulièrement l'eumélanine, possèdent un ensemble de propriétés physicochimiques particulières, à savoir (Shanmuganathan *et al.*, 2011 ; Solis *et al.*, 2007 ; Meredith *et al.*, 2006) :

- une large bande d'absorption monotone dans l'UV et le visible (Figure IV.2). Comparé à la plupart des systèmes organiques aromatiques, aucune bande spécifique d'un substituant chromophorique n'est observée : le profil de la bande d'absorption est comparable à celui d'une exponentielle. L'absorbance est maximale dans l'UV : c'est ce qui confère à la peau sa propriété photoprotectrice.
- un très faible rendement quantique radiatif (de l'ordre de 10^{-4}).
- une forte capacité à piéger les radicaux libres, signe d'une importante activité antioxydante.
- et, curieusement, une conductivité électrique et une photoconductivité en phase condensée. Il a d'ailleurs été suggéré que de tels systèmes soient employés comme semi-conducteurs bio-organiques amorphes.

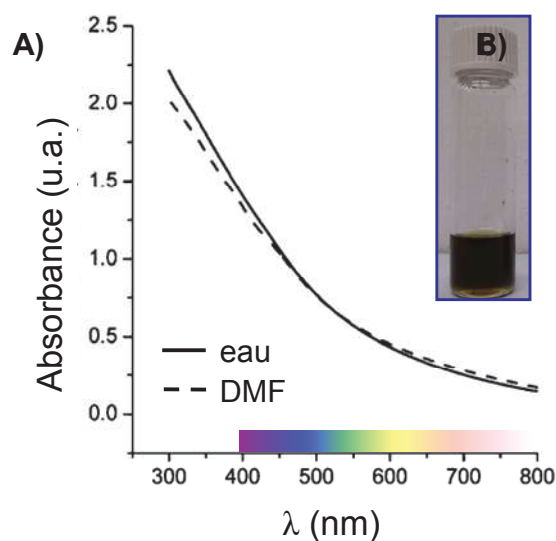


Figure IV.2. (A) Spectre d'absorption de l'eumélanine synthétique dans l'eau à pH 7 et dans le DMF (concentration d'eumélanine : 0,005 % m/m). Adaptée de [Watt et al., 2009](#). (B) Photo d'une solution de mélanine synthétique dispersée dans du Soluène (concentration de mélanine : 1 mg/mL). Adaptée de [Shanmuganathan et al., 2011](#).

Les spectres d'absorption de l'eumélanine synthétique présentés en Figure IV.2 ont été réalisés dans l'eau et dans le DMF à la même concentration (0,005 % m/m). Le mode opératoire de dissolution de l'eumélanine synthétique consiste, dans un premier temps, à mettre 5 mg d'eumélanine en suspension dans 45 mL d'eau et 5 mL d'ammoniac à 25 %, le tout plongé dans un bain d'ultrasons pendant 20 min. Ensuite, les protocoles diffèrent selon le solvant retenu. Pour la réalisation d'une solution aqueuse d'eumélanine synthétique à 0,005 % (m/m) à pH 7, 70 mL d'eau sont ajoutés aux 50 mL de solution précédente, puis le tout est agité et chauffé à 90 °C pendant plusieurs heures jusqu'à évaporation complète de l'ammoniac. La neutralité du pH est alors vérifiée, puis de l'eau est ajoutée pour compléter le volume à 100 mL. Dans le cas d'une préparation dans le DMF, les 50 mL de solution aqueuse d'eumélanine synthétique sont ajoutés à 50 mL d'eau et 100 mL de DMF. Le tout est alors placé sous vide partiel et chauffé à 80 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, afin d'évaporer l'eau et d'éliminer l'ammoniac. Lorsque le volume total est abaissé jusqu'à 30 mL environ, 100 mL de DMF supplémentaires sont ajoutés et la procédure d'évaporation est répétée jusqu'à ce que le volume total soit encore abaissé à 30 mL. Enfin, le volume est complété à 106 mL par du DMF pour atteindre la concentration finale d'eumélanine souhaitée (0,005 % m/m). Ces deux protocoles de solubilisation de l'eumélanine synthétique ([Watt et al., 2009](#)), relativement fastidieux, témoignent des difficultés de mise en place d'expériences avec de la mélanine.

L'étude de la mélanogenèse – c'est-à-dire la synthèse de mélanine au sein des mélanosomes – a permis de fournir des approches rationnelles pour le diagnostic et le traitement du mélanome. Les mélanosomes contiennent de la mélanine et pourtant, historiquement, la mélanine n'était pas considérée comme une cible de choix pour ces approches de diagnostic et/ou de traitement. En effet, la mélanine étant produite de manière intracellulaire, le développement d'anticorps spécifiques de la mélanine n'avait aucun intérêt car la cible était inatteignable. Cependant, les mélanomes sont des tumeurs à croissance relativement rapide, et la nécrose cellulaire libère de la mélanine dans l'espace

extracellulaire, rendant alors le ciblage de la mélanine possible (Revs kaya *et al.*, 2009). Comme Dadachova *et al.* l'ont démontré dans leurs études de radioimmunothérapie du mélanome, la mélanine extracellulaire, uniquement contenue dans l'environnement d'un mélanome est devenue une cible attractive dans le cadre d'un ciblage tumoral spécifique (Revs kaya *et al.*, 2009 ; Dadachova *et al.*, 2004).

IV.1.3. Présentation des molécules ciblant la mélanine

Lors de la dernière décennie, plusieurs molécules ciblant spécifiquement la mélanine ont été développées, comme la série de dérivés de la benzamide (BZA) (Figure IV.3) (Al Jammaz *et al.*, 2011 ; Farouk, 2011 ; Moura *et al.*, 2010 ; Pham *et al.*, 2007 ; Moins *et al.*, 2002 ; Eisenhut *et al.*, 2000).

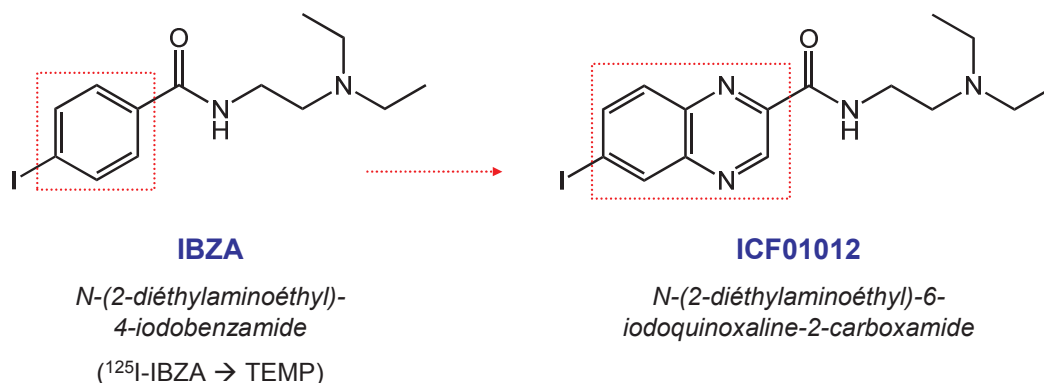


Figure IV.3. Représentation d'une molécule dérivée de la benzamide (BZA) : la *N*-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide (IBZA), dont l'homologue radiomarqué à l'iode 125 est utilisé pour l'imagerie TEMP du mélanome (Farouk, 2011). La partie benzénique peut être remplacée par une structure hétéroaromatique pour une meilleure affinité envers la mélanine, comme c'est le cas de la *N*-(2-diéthylaminoéthyl)-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide (ICF01012) (Chezal *et al.*, 2008).

Leur affinité pour la mélanine est due à une interaction ionique entre l'amine tertiaire de la molécule ciblant lorsqu'elle est protonée et les charges négatives de la mélanine. D'autre part, le remplacement du groupement benzénique des BZAs par une structure hétéroaromatique, et, plus particulièrement, par des cycles hétéroaromatiques coplanaires fusionnés (Figure IV.3), a permis d'améliorer l'affinité de telles molécules pour la mélanine (Desbois *et al.*, 2008). Une deuxième classe d'interactions intervient pour stabiliser l'interaction ionique : il s'agit d'interactions de type « π -stacking » entre le bloc polycyclique aromatique de la molécule ciblant et celui des sous-unités de la mélanine (forces d'attraction non covalentes entre les noyaux aromatiques) (Ings, 1984).

IV.1.4. Molécules finales sélectionnées pour le couplage aux SRPs en vue d'un ciblage actif de la mélanine

La molécule dérivée de la quinoxaline (ICF01012) présentée en Figure IV.3 a déjà démontré une forte affinité spécifique et durable pour la mélanine sur des modèles animaux (Bonnet-Duquennoy *et al.*, 2009 ; Madelmont *et al.*, 2008) ; par conséquent, elle a été sélectionnée comme molécule

ciblante à greffer aux SRPs. Afin de faciliter le greffage d'une telle molécule aux SRPs, il était nécessaire d'insérer une fonction réactive. Un groupement amine primaire aliphatique a donc été introduit (Figure IV.4, Molécule **1**) pour faciliter le couplage peptidique aux groupements carboxylates des molécules de DOTA des SRPs.

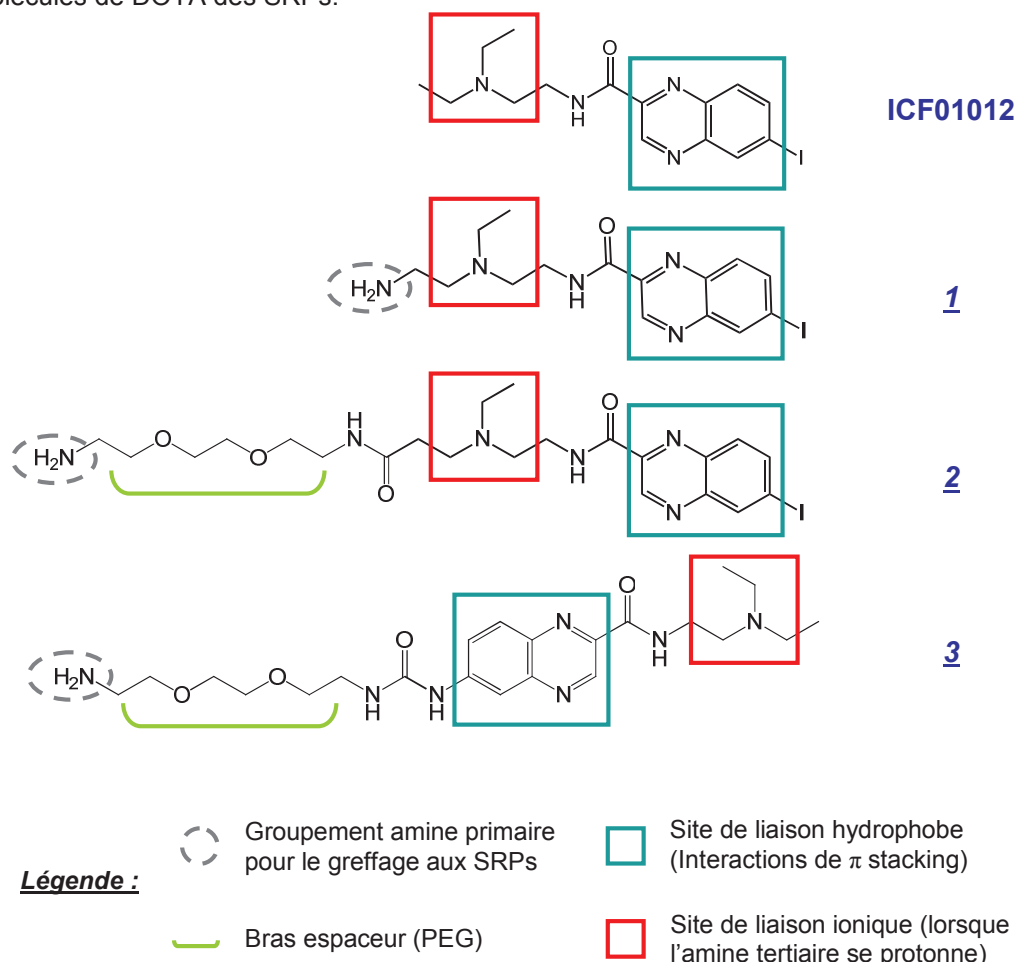


Figure IV.4. Représentation des molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline.

Cependant, les propriétés de ciblage des molécules dérivées de la quinoxaline pourraient être altérées par leur greffage aux SRPs. En effet, les SRPs pourraient causer une gêne stérique pour les molécules ciblantes et affecter leur affinité pour la mélanine. Pour affirmer ou infirmer cette hypothèse, un bras espaceur pegylé a été introduit (Figure IV.4, Molécules **2** et **3**), de manière à tenir le vecteur éloigné des SRPs.

D'autre part, l'affinité des molécules dérivées de la quinoxaline pour la mélanine est le résultat de deux interactions : une interaction ionique et une interaction hydrophobe de type « π -stacking ». Pour tenter de déterminer la prédominance d'un site de liaison par rapport à l'autre, les molécules ciblantes **2** et **3** présentent l'amine tertiaire et le bloc polycyclique aromatique de façon inversée. Ainsi, lorsque la molécule ciblante **2** est greffée aux SRPs, le bloc polycyclique aromatique est orienté vers l'extérieur, tandis que dans le cas de la molécule ciblante **3**, c'est l'amine tertiaire qui est présentée en premier à la mélanine.

Les molécules ciblantes **1**, **2** et **3**, dérivées de la quinoxaline, ont été synthétisées par l'équipe du Professeur J.M. Chezal, au sein de l'unité « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée » de l'INSERM de Clermont-Ferrand. Les SRPs vectorisées par les molécules ciblantes **1**, **2** ou **3** sont abrégées SRP-**1**, SRP-**2** et SRP-**3**, respectivement.

IV.1.5. Validation in vitro de l'affinité des SRPs fonctionnalisées par les molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline pour la mélanine

Compte tenu de l'hétérogénéité de la structure de la mélanine et des difficultés à réaliser de la spectrophotométrie optique sur une telle bio-macromolécule, la technologie BIAcore® utilisant le principe de résonance plasmonique de surface est apparue comme particulièrement adaptée pour observer l'affinité des SRPs fonctionnalisées par les molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline pour la mélanine. En effet, les biocapteurs de résonance plasmonique de surface sont décrits comme des outils performants pour détecter et caractériser les interactions biomoléculaires en temps réel (Liedberg *et al.*, 1995).

IV.1.5.1. Principe de la résonance plasmonique de surface

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique vient frapper une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie du faisceau incident est réfléchi sur l'interface tandis que l'autre partie est réfractée à travers la surface (Figure IV.5. (A)).

Pour qu'il y ait réflexion totale – c'est-à-dire pour qu'il n'y ait plus de rayon réfracté et que seul le rayon réfléchi subsiste – l'indice de réfraction du milieu dans lequel se trouve le faisceau incident doit être supérieur à celui de l'autre milieu. Lorsque le faisceau de lumière polarisée monochromatique arrive à l'interface des deux milieux avec un angle d'incidence supérieur à une valeur critique, la lumière est réfléchi totalement et l'angle de réfraction est nul (Figure IV.5. (B)). La lumière est caractérisée par différentes composantes électromagnétiques et l'une d'entre elles est l'onde évanescente qui se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde.

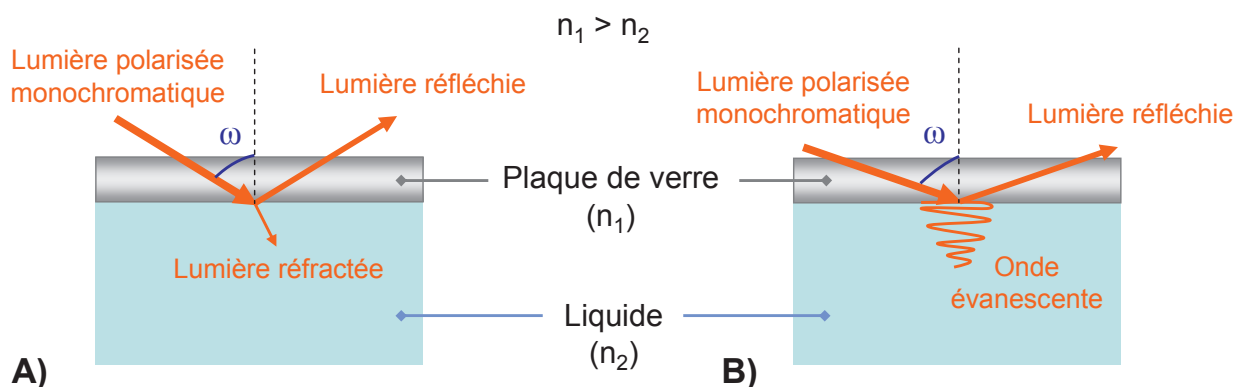


Figure IV.5. (A) Illustration des phénomènes de réflexion et de réfraction. (B) Illustration du phénomène de réflexion totale.

Le faisceau incident étant riche en photons, ces derniers peuvent éventuellement entrer en résonance avec des électrons libres. En déposant sur l'interface une couche métallique riche en électrons libres, on permet aux photons du faisceau incident d'entrer en résonance avec les électrons libres de la couche métallique : ce phénomène est appelé « résonance plasmonique de surface » (Figure IV.6). L'intensité de la lumière réfléchi va chuter à l'endroit où le phénomène de résonance plasmonique de surface est observé. L'intensité du faisceau réfléchi est mesurée en fonction de l'angle θ que forme le faisceau réfléchi avec l'interface. L'angle de résonance est l'angle pour lequel l'intensité du faisceau réfléchi est minimale.

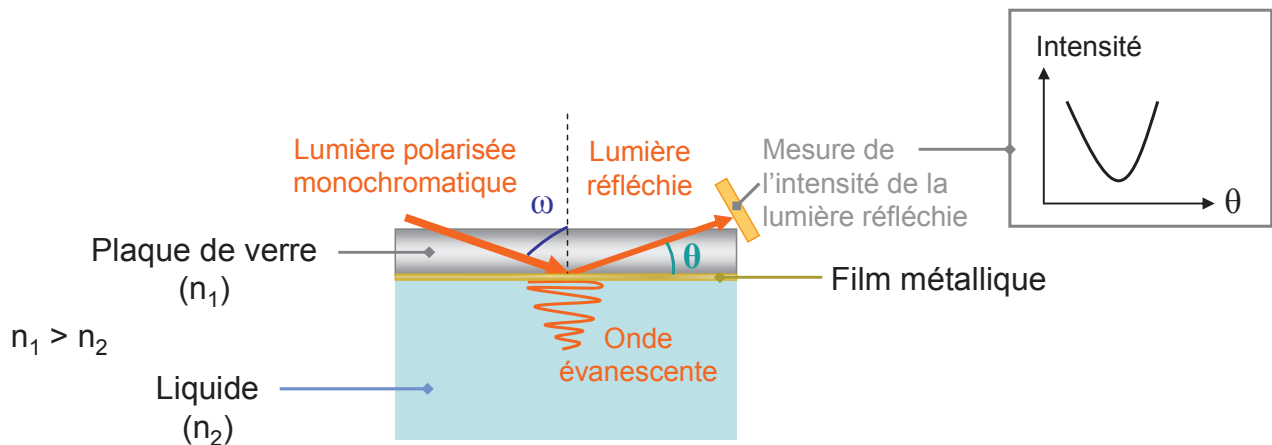


Figure IV.6. Illustration du phénomène de résonance plasmonique de surface.

Dans les conditions de réflexion totale, l'angle de résonance dépend de la densité du milieu. Tout changement de densité à l'interface provoquera une variation de l'indice de réfraction du milieu, qui entraînera à son tour une variation de l'angle de résonance. De ce fait, l'enregistrement de l'évolution de l'angle de résonance permet la visualisation des interactions en temps réel.

IV.1.5.2. Principe du BIAcore®

La technologie BIAcore® est un système de résonance plasmonique de surface conventionnel au sein duquel le film conducteur métallique est une fine couche d'or (riche en électrons), le capteur de verre est intégré au biocapteur, aussi appelé *Sensor Chip*, et la solution contenant l'échantillon correspond au milieu d'indice de réfraction inférieur (Lin *et al.*, 2006). La surface d'or est elle-même recouverte d'une matrice de dextran carboxyméthylé, permettant ainsi le couplage peptidique de toutes sortes de biomolécules réceptrices (Figure IV.7).

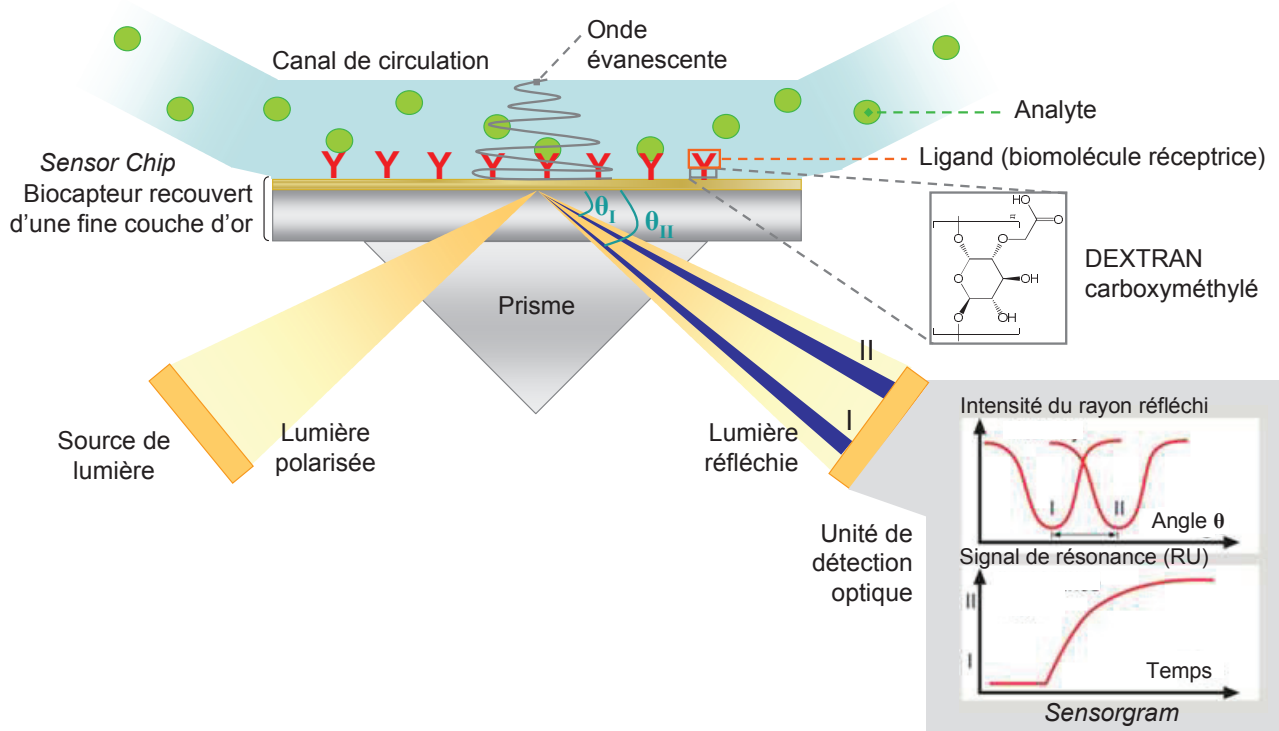


Figure IV.7. Illustration de la technologie BIAcore®.

Les photons de l'onde évanescente vont entrer en résonance avec le nuage électronique de la couche d'or (plasmon). L'intensité du faisceau réfléchi va alors chuter, à un angle θ défini : l'angle de résonance. Les interactions moléculaires entre le ligand, immobilisé à la surface par couplage peptidique à la matrice de dextran carboxyméthylé, et l'analyte en solution, injecté à débit constant par un circuit microfluidique, vont entraîner un changement de masse. Ce changement de masse, induit par l'association ou la dissociation des deux partenaires, va susciter une modification de l'indice de réfraction du milieu et décaler la position de l'angle de résonance. La variation de l'angle de résonance est proportionnelle à la quantité d'analyte fixée sur le ligand immobilisé sur la surface du biocapteur (*Sensor Chip*) (Figure IV.7) (Edwards, 2007). Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de $0,1^\circ$. L'enregistrement de ce signal (en RU) en fonction du temps est appelé *Sensorgram* (Figure IV.8) (Taguchi *et al.*, 2012 ; Ghosh *et al.*, 2011).

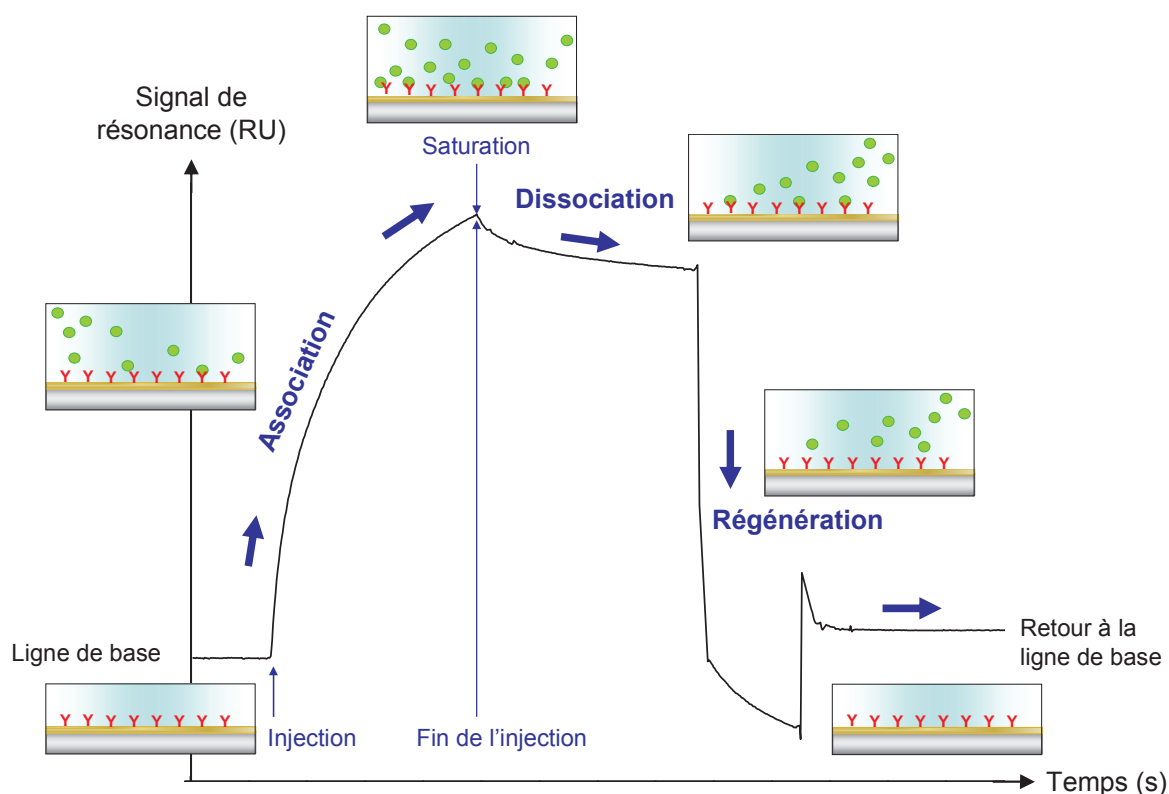


Figure IV.8. Exemple de *Sensorgram* et représentation des différentes étapes d'un cycle.

Le débit de tampon (solution) est représenté par la ligne de base du *Sensorgram*. Dès l'injection de l'analyte, les deux partenaires (analyte et ligand immobilisé à la surface) peuvent s'associer pour former des complexes. Cette association provoque une augmentation de la masse au voisinage de la surface d'or, et par conséquent, une modification de l'indice de réfraction du milieu, ce qui décale la position de l'angle de résonance. A la fin de l'injection, le débit de tampon est assuré. Lorsque les interactions entre le ligand et l'analyte sont faibles, le complexe se dissocie : l'analyte est chassé par les molécules du tampon. Seuls les complexes dont les interactions entre le ligand et l'analyte sont spécifiques, donc fortes, subsistent. Enfin, la dernière étape consiste à régénérer la surface : il s'agit de dissocier les complexes restants afin de revenir à la ligne de base.

IV.1.5.3. Validation de l'affinité des SRPs fonctionnalisés par les molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline par la technologie BIAcore®

Les tests de ciblage des SRP-1, 2 et 3 sur la mélanine, ont été réalisés par l'équipe du Professeur R. Cohen, à la Faculté de Pharmacie de Lyon. L'ISPB (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques) est équipé d'un appareil BIAcore® 2000 qui contient 4 cellules de mesure, et offre par conséquent la possibilité de détecter des signaux de résonance sur 4 canaux différents, sur un même biocapteur.

Pour les études de ciblage sur la mélanine, 2 cellules de mesure ont été utilisées. Sur le premier canal, la matrice de dextran carboxyméthylé a été conservée sous sa forme initiale, de

manière à observer d'éventuelles interactions non spécifiques, notamment des interactions ioniques entre les charges positives des différentes SRPs et les charges négatives des molécules de dextran (Figure IV.10). Sur le deuxième canal, de la mélanine a été immobilisée, afin d'observer la spécificité des interactions entre les SRPs fonctionnalisées et la mélanine (ainsi que la non-spécificité des interactions entre les SRPs non fonctionnalisées et la mélanine). Pour ce faire, de l'éthylènediamine a d'abord été greffée par couplage peptidique aux groupements carboxylates de la matrice de dextran carboxyméthylé, puis la mélanine a été greffée à son tour par couplage peptidique aux molécules d'éthylènediamine immobilisées sur la matrice de dextran (Figure IV.9).

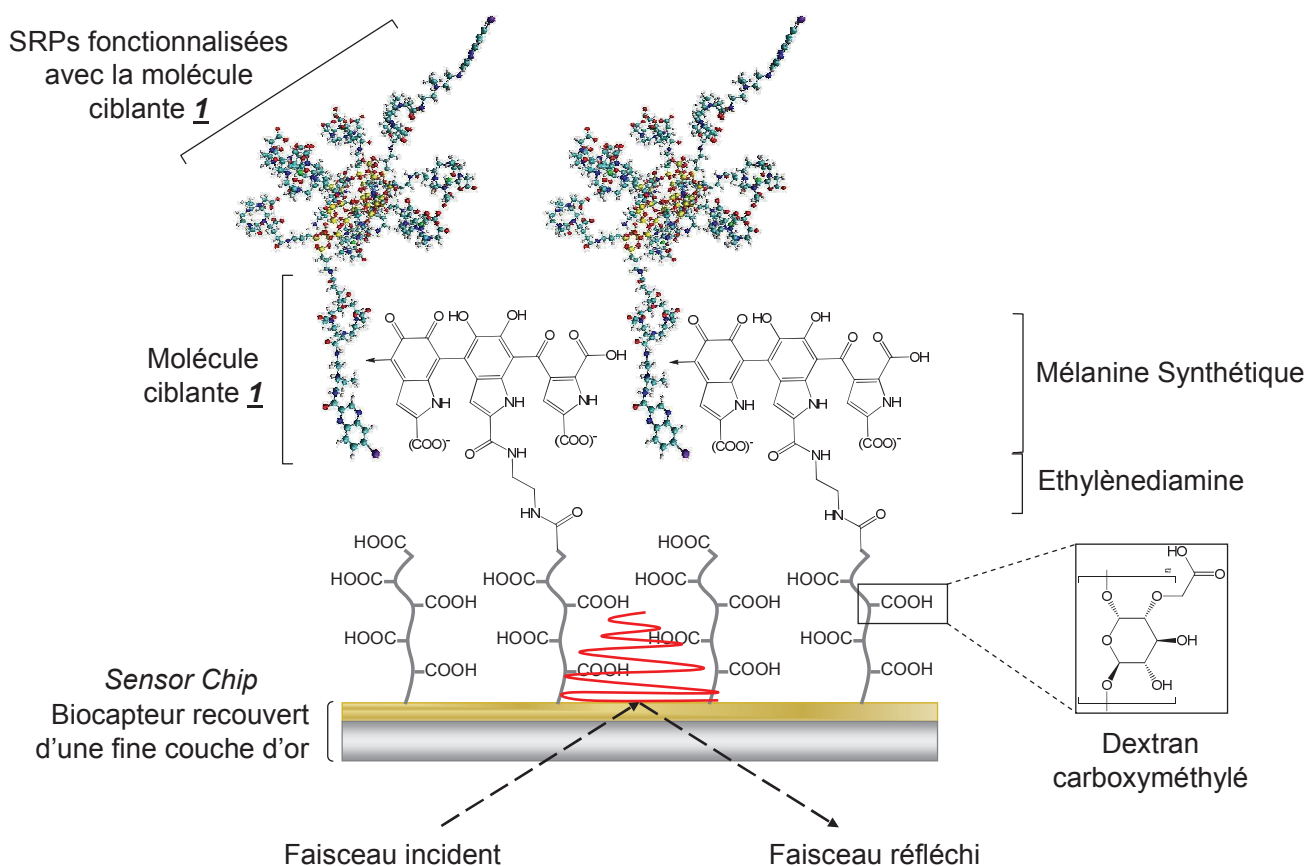


Figure IV.9. Illustration de la technologie BIAcore® appliquée aux études de ciblage de la mélanine (exemple donné avec les SRP-1).

Les SRPs fonctionnalisées avec les molécules ciblantes, ainsi que les SRPs non fonctionnalisées sont injectées plusieurs fois à différentes concentrations. Les différents *Sensorgrams* sont recueillis et l'intensité du signal de résonance au temps correspondant à 140 s après l'injection de l'analyte est relevée. Le point représentant l'intensité du signal de résonance à 140 s après l'injection de l'analyte apparaît comme le plus représentatif de la spécificité de l'interaction entre les différentes SRPs et la mélanine. L'intensité du signal de résonance sur le canal 1 (dextran) est soustraite à celle du canal 2 (mélanine), afin de s'affranchir des problèmes liés aux interactions non spécifiques. Les courbes représentant cette différence d'intensité de signaux de résonance (canal 2 –

canal 1) à 140 s après l'injection de l'analyte en fonction des différentes concentrations en gadolinium sont tracées.

Une deuxième expérience est réalisée : cette fois-ci, les différentes SRPs sont injectées à la même concentration, de manière à sélectionner le meilleur candidat parmi les 3 SRPs fonctionnalisées avec les molécules dérivées de la quinoxaline pour la mélanine (et à vérifier la non spécificité des interactions entre les SRPs non fonctionnalisées et la mélanine).

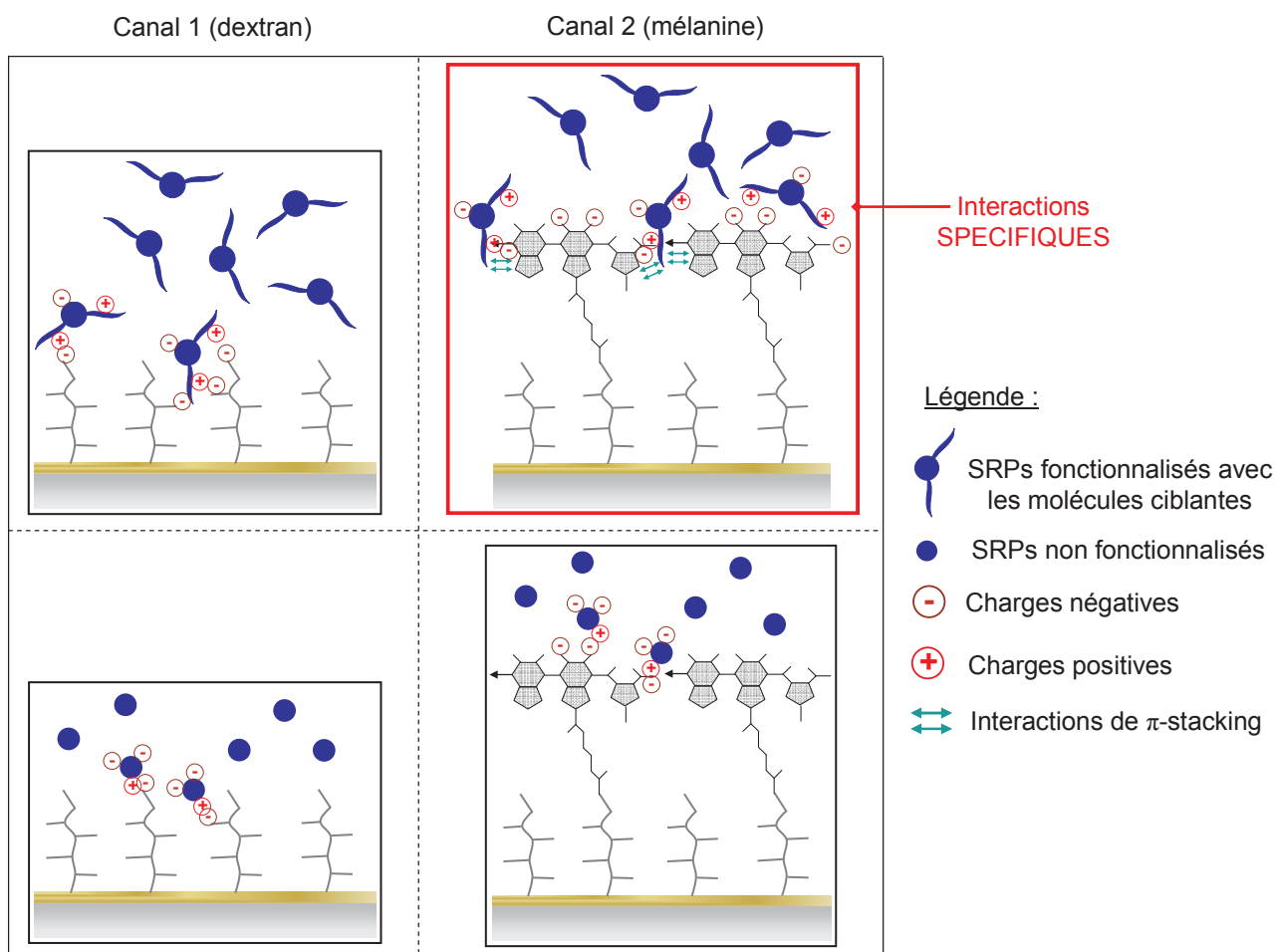


Figure IV.10. Illustration des différentes interactions possibles (spécifiques ou non spécifiques) sur les canaux 1 (dextran) et 2 (mélanine) dans le cas des SRPs fonctionnalisées avec les molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline et des SRPs non fonctionnalisées.

IV.2. Article

Ces travaux ont fait l'objet de l'article ci-après, paru dans la revue *Nanoscale*, qui décrit les synthèses des 3 molécules ciblantes dérivées de la mélanine et le couplage peptidique des ces molécules aux SRPs et présente les études de validation de l'affinité des SRPs fonctionnalisées avec les molécules ciblantes pour la mélanine par la technologie BIAcore®.

Development of gadolinium based nanoparticles having an affinity towards melanin†

Cite this: DOI: 10.1039/c2nr33457g

Jessica Morlieras,^a Jean-Michel Chezal,^{bcd} Elisabeth Miot-Noirault,^{bcd} Amandine Roux,^{ef} Laurence Heinrich-Balard,^{ef} Richard Cohen,^{efg} Sébastien Tarrit,^{bcd} Charles Truillet,^a Anna Mignot,^{ahi} Roxanne Hachani,^a David Kryza,^{ag} Rodolphe Antoine,^j Philippe Dugourd,^j Pascal Perriat,^h Marc Janier,^{ag} Lucie Sancey,^a François Lux^{*a} and Olivier Tillement^a

Small Rigid Platforms (SRPs) are sub-5 nanometre gadolinium based nanoparticles that have been developed for multimodal imaging and theranostic applications. They are composed of a polysiloxane network surrounded by gadolinium chelates. A covalent coupling with quinoxaline derivatives has been performed. Such derivatives have proven their affinity for melanin frequently expressed in primary melanoma cases. Three different quinoxaline derivatives have been synthesised and coupled to the nanoparticles. The affinity of the grafted nanoparticles for melanin has then been shown *in vitro* by surface plasmon resonance on a homemade melanin grafted gold chip.

Received 2nd November 2012
Accepted 10th December 2012

DOI: 10.1039/c2nr33457g

www.rsc.org/nanoscale

Introduction

Human melanoma, characterized by an uncontrolled development of melanocytes producing the melanin pigment, is a widespread aggressive skin cancer. Once inaccessible to surgery, it is mainly resistant to treatment by chemo- and radiotherapy.^{1–4} Since median survival time for patients with metastatic melanoma with stage III or IV is limited (about 6–16 months),^{5–7} there is an urgent need to develop agents succeeding in an earlier and more effective diagnosis and being able to treat disseminated melanoma.^{1,8–10}

Our group has been synthesizing ultrasmall multifunctional gadolinium-based nanoparticles associating imaging and therapeutic activities. These nanoparticles were validated for multimodal imaging (MRI, SPECT, CT, fluorescence imaging) and for radiotherapy thanks to their radiosensitizing properties.^{11–13} The last generation of nanoparticles is called Small Rigid Platforms (SRPs) and it displays about ten DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) derivatives grafted on a polysiloxane network. Due to the synthesis process of the nanoparticles, some of the DOTA ligands are chelating Gd³⁺ ions while the other DOTA molecules remain free. These free DOTA ligands are available to chelate other cations of interest (*e.g.* ¹¹¹In for SPECT imaging) and/or to perform amide bonds with NH₂-ended molecules *via* one of the carboxylic acid arms.¹¹ SRPs are attractive in terms of size (3–5 nm), enabling efficient renal clearance¹⁴ with an appropriate circulation time in the bloodstream. These SRPs are likely to take advantage of tumour vasculature abnormalities, *e.g.* porous vessels,¹⁵ to reach tumour tissue by the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect.¹⁶ This passive targeting might be reinforced by an active one to establish tumour-selective diagnosis and to be promising for targeted-therapy.¹⁷ The covalent conjugation of an effective melanoma vector to the surface of the SRPs might enhance tumour uptake and will be first tested *in vitro*.

Melanin is an amorphous and random copolymer of brown-black eumelanin and yellow to reddish brown pheomelanin, both derived from the common precursor dopaquinone.¹⁸ Dopaquinone which is formed by the oxidation of tyrosine by tyrosinase is a highly reactive intermediate.¹⁹ Its intramolecular cyclization gives rise to the formation of eumelanin while the presence of thiols in glutathione or cysteine leads to

^aLaboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France. E-mail: francois.lux@univ-lyon1.fr; Tel: +33 472431200

^bInserm UMR 990 – BP 184, Clermont-Ferrand, 63005 Cedex, France

^cClermont Université, UMR 990 – Université d'Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^dCentre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France

^eUniversité Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France

^fMatériaux, Ingénierie et Sciences, INSA Lyon, UMR 5510 CNRS – Université de Lyon, ISPB-Faculté de Pharmacie, F-69373 Lyon, France

^gHôpitaux de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire et Service de médecine nucléaire, 69437 Lyon Cedex 03, France

^hMatériaux, Ingénierie et Sciences, INSA Lyon, UMR 5510 CNRS – Université de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex, France

ⁱNano-H SAS, 38070 Saint-Quentin Fallavier, France

^jLaboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, UMR 5579 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2nr33457g

cysteinyldopas, underlying the formation of pheomelanin by oxidation of the thiol adducts.^{20,21}

Melanin pigment, detected in more than 90% of primary melanoma cases²² and found in 40–50% of all metastatic lesions,²³ could be a promising target for melanoma-targeting strategy of SRPs. Indeed, metastatic melanomas are fast growing tumors showing numerous areas of necrosis and containing extracellular melanin released from death cells. Extracellular melanin, only present in the melanoma environment, is therefore attractive for specific tumor-targeting concept as demonstrated by Dadachova *et al.*^{24,25} for radioimmunotherapy of melanoma. Nevertheless the radiolabeled anti-melanin mAb (^{99m}Tc-6D2) used in this study displayed a noticeable and long lasting kidney uptake after i.v. injection in nude mice. Furthermore, 6D2 mAb is only produced in very small quantities. In this context, several tumour-specific tracers have been investigated over the last decades, including a series of benzamide (BZA) derivatives.^{26–30} The replacement of the benzene moiety contained in BZAs by a heteroaromatic structure, particularly coplanar fused rings, proved a high affinity of such molecules toward pigmented melanoma.³¹ This affinity may be due in part to the π stacking interaction between the polycyclic aromatic block of the targeting agent and the aromatic ones of the melanin subunits.^{9,32} An ionic interaction occurring between the tertiary amine of the melanin-targeting ligand being protonated and the negative charges borne by melanin might also ease the binding to melanin. In this context, a quinoxaline derivative (ICF01012) which has already shown high, specific and long-lasting binding to melanin in animal models has been selected as a melanoma-seeking agent to be grafted to SRPs.^{9,33,34} However the targeting properties of the quinoxaline derivatives might be highly altered by their coupling to the SRPs. We have opted to introduce into the ICF01012 scaffold an aliphatic primary amino group, which can be easily modified and facilitate the grafting to SRPs. Keeping in mind the importance of the steric hindrance as well as the ionic and hydrophobic sites on the binding to melanin, two different positions of linkage (*i.e.* aromatic and aliphatic parts) have been designed. For the aromatic approach, we have chosen to replace the iodine atom with an amino pegylated-urea residue (melanin-targeting ligand 3 – Scheme 3). As for the aliphatic strategy, amino function has been introduced into the N-terminal ethyl residue directly, or through a pegylated spacer (melanin-targeting ligands 1 and 2 – Scheme 1 and 2 respectively).

Owing to the melanin heterogeneous structure³⁵ and to the difficulties of performing optical spectroscopy on such a macromolecule,^{36–38} surface plasmon resonance appeared to be a very adapted technology to highlight the binding of functionalized SRPs to melanin. The literature described surface plasmon resonance biosensor as an interesting technique to detect and characterize biomolecular interactions in real time.³⁹ BIAcore® is a conventional surface plasmon resonance system where a thin gold film is coated to a prism, which reflects the incident light.⁴⁰ The gold surface is covered with a carboxy-methylated dextran matrix, which enables the covalent conjugation of any receptor biomolecule. Surface plasmon resonance arises through the interaction of the evanescent wave created by total internal reflection with delocalized surface electrons in the

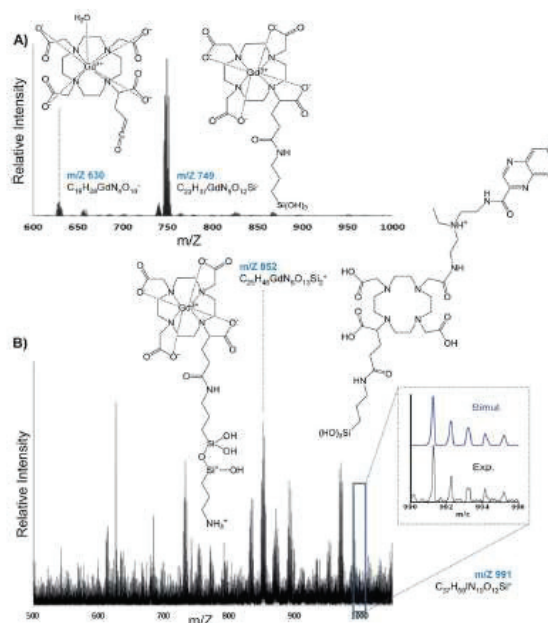


Fig. 1 (A) Low m/z part of the ESI mass spectrum recorded for SRP-1 in a negative mode. (B) Low m/z part of the ESI mass spectrum recorded for SRP-1 in a positive mode.

gold film at the interface with the medium of lower refractive index (solution). This interaction excites collective resonant oscillation named plasmon. The field strength is amplified as a result of plasmon resonance. Surface plasmon resonance is used to probe the refractive index of the aqueous layer immediately adjacent to the gold surface. Surface plasmon resonance is seen as a drop in the intensity of the reflected light. To study an interaction, one partner (the ligand) is immobilized onto the surface and the other (the analyte) is flowed past the surface of the sensor chip through a microfluidic flow cell.⁴¹ When the two partners interact to form a complex, the refractive index is changed near the gold surface which modifies the angle of incidence required to create the surface plasmon resonance phenomenon. This change in the refractive index which is closely correlated with the change in mass near the gold surface is measured in real-time and the signal obtained is plotted in resonance unit (RU) *versus* time to give a sensorgram.^{42,43}

In this work, we describe the syntheses of the three melanin-targeting ligands as well as their covalent conjugation to SRPs. Afterwards and in order to select the best candidate for melanoma-targeting, the binding of synthesized SRPs to melanin has been assessed by surface plasmon resonance assays.

Materials and methods

Chemicals

Synthesis of the melanin-targeting ligands. All reagents and solvents were purchased from the following commercial suppliers: Sigma-Aldrich, Acros organics, Carlo Erba. Column chromatography was performed with Merck neutral aluminium oxide 90 standardized (63–200 μm) or SDS silica gel 60AC.C35-

70 μm , chromagel. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck neutral aluminium oxide 60F₂₅₄ plates or Merck silica gel 60F₂₅₄ plates. The plates were visualized with UV light (254 nm) and/or by development with iodine, ninhydrin (0.2% in ethanol) or potassium permanganate (0.5% in 2.5% aqueous sodium carbonate solution). Melting points were determined on an electrothermal IA9300 (capillary) and were not corrected. NMR spectra 200 MHz for ¹H or 50 MHz for ¹³C were recorded on a Bruker Avance 200 instrument (Bruker Biospin, Wissembourg, France) using CDCl₃, CD₃OD or DMSO-d₆ as solvents. Chemical shifts were referenced by the residual solvent signals relative to tetramethylsilane at 0 ppm. Infrared spectra were recorded in KBr pellets or CCl₄ on a FT vector 22 or on an IRTF Nicolet IS10 instrument with attenuated total reflectance (ATR) accessory (ν expressed in cm⁻¹). Electrospray ionization mass spectra (ESI-MS) were obtained on a TSQ 7000 ThermoQuest Finnigan (Les Ulis, France). The samples were analyzed in CH₃OH/H₂O (1/1, v/v, containing 1% HCOOH) or CH₃CN/H₂O (1/1, v/v, containing 1% HCOOH) in positive mode or in CH₃OH/H₂O (1/1, v/v, containing 1% NH₄OH) in negative mode, at a final concentration of 8–12 pmol μL^{-1} . Each ESI-MS spectrum was recorded by averaging 10 spectra. Microanalyses were performed by Analytical Laboratory of the CNRS (Vernaison, France) for the elements indicated and were within 0.4% of the theoretical values unless indicated. All air-sensitive reactions were run under argon atmosphere. All solvents were dried using common techniques.⁴⁴

SRP functionalization with melanin-targeting ligands. *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, >98.0%), *N*-hydroxysuccinimide (NHS, >97.0%), gadolinium chloride hexahydrate ([GdCl₃·6H₂O], 99%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), sodium chloride (NaCl, >99.5%), dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5%), acetonitrile (CH₃CN, >99.9%) and trifluoroacetic acid (TFA, >99%) were purchased from Aldrich® Chemical (France) and used without further purification. The SRPs synthesis has been already described elsewhere.¹¹ The core-shell nanoparticles (core: gadolinium oxide and shell: polysiloxane) and the SRPs were purchased from Nano-H SAS (Saint-Quentin Fallavier, France) and the DOTAGA anhydride (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4-7-10-triacetic acid) was purchased from CheMatech (Dijon, France). For the preparation of an aqueous solution of nanoparticles, only milli-Q water ($\rho > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) was used.

Surface plasmon resonance assays. HBS-P (HEPES buffer) was purchased from GE Healthcare® and used as running buffer. For immobilization, amine coupling reagents were obtained from the GE Healthcare® kit containing 0.2 M EDC in water and 0.05 M NHS in water and ethanolamine-HCl pH 8.5. The melanin ligand was purchased from Aldrich® and beforehand dissolved at 20 mg mL⁻¹ in a 1 N ammonium hydroxide (NH₄OH) solution.⁴⁵

Experimental

Synthesis of melanin-targeting ligand 1 (Scheme 1)

Step 1. Synthesis of *N*-[2-[*N*-ethyl-*N*-(2-bocaminoethyl)amino]ethyl]phthalimide (S2). To a solution of 2-(boc-amino)ethyl

bromide⁴⁶ (909 mg, 3.57 mmol) in anhydrous acetonitrile (15 mL) were added under argon, potassium carbonate (984 mg, 7.14 mmol) and *N*-[2-(ethylamino)ethyl]phthalimide hydrochloride salt⁴⁷ (S1) (500 mg, 1.35 mmol). The reaction mixture was stirred at 60 °C (external temperature) for 48 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with a saturated aqueous sodium carbonate solution (20 mL) and extracted with dichloromethane (4 × 20 mL). The organic layers collected were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue obtained was purified by alumina column chromatography using a dichloromethane/ethanol solution (99/1, v/v) as eluent to give S2 (544 mg, 1.51 mmol) as a yellow oil. Yield 42%. *R*_f Al₂O₃/CH₂Cl₂/EtOH (99/1, v/v) 0.32; IR (ATR diamond accessory) ν 3317, 2975, 2619, 1708, 1655, 1517, 1471, 1392, 1169 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.93 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.38 (s, 9H), 2.55 (m, 4H), 2.70 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.12 (q, 2H, *J* = 5.5 Hz), 3.74 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 5.03 (brs, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.83 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 11.7, 28.4 (3C), 36.4, 38.2, 47.3, 51.3, 52.7, 78.8, 123.3 (2C), 132.1 (2C), 134.0 (2C), 156.1, 168.5 (2C); ESI-MS *m/z* 362.21 [M + H]⁺.

Step 2. Synthesis of tert-butyl *N*-[2-[*N*-(2-aminoethyl)-*N*-ethylamino]ethyl]carbamate (S3). To a stirred solution of S2 (480 mg, 1.33 mmol) in ethanol (25 mL) was added hydrazine monohydrate (646 μL , 13.3 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 18 h. After cooling to 0 °C, the white precipitate was filtered and washed with ethanol (2 × 5 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by alumina chromatography using dichloromethane/ethanol solution (8/2, v/v) as eluent to give S3 (241 mg, 1.04 mmol) as a yellow oil. Yield 78%. *R*_f Al₂O₃/CH₂Cl₂/EtOH (8/2, v/v) 0.22; IR (ATR diamond accessory) ν 3400–3100, 2973, 1668, 1531, 1474, 1167 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.93 (t, 3H, *J* = 7 Hz), 1.37 (s, 9H), 1.54 (se, 2H), 2.45 (m, 6H), 2.66 (t, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.09 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz), 5.09 (se, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 11.6, 28.4 (3C), 38.5, 39.7, 47.6, 52.9, 56.4, 78.9, 156.1; ESI-MS *m/z* 232.07 [M + H]⁺.

Step 3. Synthesis of *N*-[2-[*N*-ethyl-*N*-(2-bocaminoethyl)amino]ethyl]-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide (S4). To a solution of S3 (230 mg, 0.99 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (15 mL) was added under argon *p*-nitrophenyl 6-iodoquinoxaline-2-carboxylate⁴⁸ (419 mg, 0.99 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 17 h before addition of dichloromethane (30 mL). The resulting solution was poured into a 1 N aqueous sodium hydroxide solution (90 mL) and extracted with dichloromethane (3 × 40 mL). The organic layers were combined, washed with a 5% aqueous sodium carbonate solution (2 × 50 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue obtained was purified by alumina column chromatography using a dichloromethane/ethanol solution (99/1, v/v) as eluent to give S4 (447 mg, 0.87 mmol) as a white solid. Yield 88%; mp 77–79 °C; *R*_f Al₂O₃/CH₂Cl₂/EtOH (99/1, v/v) 0.22; IR (CCl₄) ν 2975, 1718, 1685, 1521, 1170 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.06 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 1.34 (s, 9H), 2.64 (m, 4H), 2.73 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 3.20 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz), 3.56 (q, 2H, *J* = 6 Hz), 5.22 (se, 1H), 7.85 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 8.04 (dd, 1H, *J* = 1.8, 8.8 Hz), 8.31 (m, 1H), 8.58 (d, 1H,

$J = 1.8$ Hz), 9.63 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 11.9, 28.4 (3C), 37.2, 38.8, 47.6, 52.8, 53.0, 79.2, 98.1, 130.9, 138.6, 139.5, 139.7, 144.0, 144.5, 144.7, 156.0, 162.9; ESI-SM m/z 514.17 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 4. Synthesis of N-[2-[N-ethyl-N-(2-aminoethyl)amino]ethyl]-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide trihydrochloride salt (i.e. melanin-targeting ligand 1). To a solution of S4 (200 mg, 0.39 mmol) in anhydrous dichloromethane (15 mL) was added under argon an anhydrous ethereal solution of 2 N hydrochloric acid (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 13 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up with an anhydrous diethyl ether (5 mL), filtered and dried overnight in a desiccator to afford compound 1 (172 mg, 0.33 mmol) as a white solid. Yield 85%. mp 127–129 °C; IR (KBr) ν 3317, 2977, 2641, 1668, 1532, 1474 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz), 3.38 (m, 8H), 3.78 (m, 2H), 3.56 (q, 2H, $J = 6$ Hz), 7.92 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 8.64 (dd, 1H, $J = 1.8, 8.8$ Hz), 8.32 (m, 3H), 8.64 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 9.38 (m, 1H), 9.45 (s, 1H), 10.88 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 8.4, 33.4, 33.8, 47.8, 48.6, 50.6, 99.7, 130.8, 137.6, 139.0, 139.9, 143.6, 144.3, 144.5, 163.6; ESI-SM m/z 414.19 $[\text{M} + \text{H}]^+$; elemental analysis calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{IN}_5\text{O}$, 3HCl, H_2O : C: 33.32; H: 4.66; N: 12.95; Cl: 19.67. Found: C: 33.21; H: 4.29; N: 12.78; Cl: 17.42%.

Synthesis of melanin-targeting ligand 2 (Scheme 2)

Step 1. Synthesis of N-[2-[2-(2-tert-butoxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethyl]acrylamide (S6). Compound S6 was obtained by reacting *tert*-butyl 2-[2-aminoethoxy]ethoxyethyl carbamate⁴⁷ (S5) and acryloyl chloride in the presence of diisopropylethylamine as described by Alterman *et al.*⁴⁹ Yield 83%. IR (KBr) 3459, 3400–3300, 1718, 1678, 1506, 1367, 1174, 1144, 1108 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.42 (s, 9H), 3.30 (m, 3H), 3.50 (m, 10H), 5.64 (dd, 1H, $J = 4, 8$ Hz), 6.22 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 6.23 (d, 1H, $J = 8$ Hz).

Step 2. Synthesis of tert-butyl [2-[2-[3-[N-ethyl-N-[2-[(6-iodoquinoxaline-2-carboxylamino)ethyl]amino] propionylamino]ethoxy]ethoxy]ethylcarbamate (S8). To a solution of *N*-[2-(*N*-ethylamino)ethyl]-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide (S7)⁴⁸ (400 mg, 1.08 mmol) in anhydrous acetonitrile (20 mL) were added under argon, silica gel (800 mg) and a solution of the acrylamide derivative S6 (489 mg, 1.62 mmol) in anhydrous acetonitrile (10 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for 72 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by alumina column chromatography using a chloroform/ethanol solution (99/1, v/v) as eluent to afford compound S8 (172 mg, 0.33 mmol) as a light brown oil. Yield 66%. R_f $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (99/1, v/v) 0.16; IR (ATR diamond accessory) ν 3400–3250, 2971, 2932, 2870, 1667, 1530, 1165 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.05 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 1.38 (s, 9H), 2.35 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 2.65 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 2.75 (m, 4H), 3.33 (m, 4H), 3.50 (m, 10H), 5.11 (se, 1H), 7.78 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.85 (m, 1H), 8.03 (dd, 1H, $J = 1.5, 8.8$ Hz), 8.29 (m, 1H), 8.56 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 9.59 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 11.6, 28.4 (3C), 33.5, 37.7, 38.9, 40.3, 47.4, 49.7, 52.1, 70.0 (4C), 79.5, 98.1, 130.7, 138.6, 139.5, 139.8, 144.0, 144.4, 144.6, 156.0, 163.2, 172.4; ESI-SM m/z 673.43 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 3. Synthesis of N-[2-[N-ethyl-N-[2-[2-(2-aminoethyl)ethoxy]ethylcarbamoyl]amino]ethyl]-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide

(i.e. melanin-targeting ligand 2). A solution of S8 (303 mg, 0.45 mmol) in trifluoroacetic acid (5 mL) was stirred under argon at room temperature for 1 h 30 min. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was taken up with water (10 mL), an aqueous saturated sodium carbonate solution (20 mL) and dichloromethane (10 mL). After decantation, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3×25 mL) and the organic layers collected were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness to give compound 2 (252 mg, 0.44 mmol) as a light brown oil which was used without further purification. Yield 98%. IR (KBr) ν 3500–3100, 2923, 2853, 1690–1600, 1534, 1127 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.03 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 2.34 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 2.59 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 2.74 (m, 4H), 3.36 (m, 2H), 3.55 (m, 12H), 7.77 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.93 (m, 1H), 8.01 (dd, 1H, $J = 1.7, 8.8$ Hz), 8.35 (m, 1H), 8.54 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 9.56 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 11.6, 33.5, 37.7, 38.9, 41.6, 47.4, 49.7, 52.1, 70.1 (4C), 98.1, 130.7, 138.5, 139.4, 139.7, 143.9, 144.3, 144.5, 163.2, 172.4; ESI-SM m/z 573.13 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Synthesis of melanin-targeting ligand 3 (Scheme 3)

Step 1. Synthesis of N-(2-diethylaminoethyl)-6-nitroquinoxaline-2-carboxamide (S10). To a stirred solution of *N,N*-diethyl-ethylenediamine (2.00 mL, 14.23 mmol) in anhydrous dichloromethane (40 mL) was added at 0 °C, under argon, a 2 M trimethylaluminium solution in hexane (7.14 mL, 14.28 mmol). After 10 min, a solution of ethyl 6-nitroquinoxaline-2-carboxylate (S9)⁹ (2.35 g, 9.51 mmol) in anhydrous dichloromethane (30 mL) was added and the mixture was refluxed for 3 h. After cooling to room temperature, water (60 mL) was added. After decantation, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3×40 mL). The organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue obtained was purified by alumina column chromatography using a solution of dichloromethane/ethanol (97/3, v/v) as eluent to give compound S10 (2.71 g, 8.54 mmol) as a yellow solid. Yield 90%. R_f $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{dichloromethane/ethanol}$ (97/3, v/v) 0.71; mp 83–85 °C; IR (KBr) ν 3384, 2967, 2931, 2811, 1685, 1529, 1342 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.08 (t, 6H, $J = 7$ Hz), 2.61 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 2.71 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.57 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 8.27 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 8.44 (m, 1H), 8.28 (dd, 1H, $J = 2.5, 9.2$ Hz), 9.05 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 9.80 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 12.2 (2C), 37.5, 47.2 (2C), 51.4, 124.1, 125.8, 131.5, 142.8, 146.2 (2C), 148.8, 162.2, C–NO₂ carbon not found. ESI-SM m/z 318.06 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 2. Synthesis of 6-amino-N-(2-diethylaminoethyl)quinoxaline-2-carboxamide (S11). A stirred solution of S10 (3.30 g, 10.4 mmol) in ethanol (330 mL) was hydrogenated (1 atm) at room temperature over 10% Pd/C (330 mg) for 4 h. The black suspension was filtered through celite 545, washed with ethanol (20 mL) and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue obtained was purified by alumina column chromatography using a solution of dichloromethane/ethanol (97/3, v/v) as eluent to give compound S11 (2.34 g, 8.14 mmol) as a yellow solid. Yield 78%. R_f $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{dichloromethane/ethanol}$ (97/3, v/v) 0.27; mp 171–173 °C; IR (KBr) ν 3397, 3214, 2969, 2802, 1655, 1613, 1491, 1297, 1221 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.06 (t, 6H, $J = 7$ Hz), 2.60 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 2.69 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.54

(q, 2H, $J = 7$ Hz), 4.52 (se, 2H), 7.19 (m, 2H), 7.82 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz), 8.27 (m, 1H), 9.44 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 12.1 (2C), 37.4, 47.2 (2C), 51.8, 107.5, 122.8, 131.0, 135.2, 140.1, 144.1, 145.9, 149.6, 164.0; ESI-SM m/z 288.09 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 3. Synthesis of 6-[3-[2-[2-(2-tert-butyloxycarbonyl aminoethoxy)ethoxy]ethyl]ureido]-N-(2-diethylaminoethyl)quinoxaline-2-carboxamide (S12). To a stirred solution of S11 (500 mg, 1.74 mmol) in anhydrous dichloromethane (50 mL) were added under argon, anhydrous pyridine (418 mL, 5.17 mmol) and *p*-nitrophenyl chloroformate (386 mg, 1.19 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and evaporated under reduced pressure. The crude product was taken up with anhydrous diethyl ether (40 mL) and filtered to give the unstable *p*-nitrophenyl carbamate hydrochloride salt (830 mg, 1.7 mmol) as an orange solid. The latter was dissolved under argon in anhydrous tetrahydrofuran (40 mL) before addition of anhydrous triethylamine (237 mL, 5.17 mmol) and *tert*-butyl 2-[2-aminoethoxy]ethoxyethyl carbamate¹⁹ (S5). The solution was stirred at room temperature for 24 h and evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in dichloromethane (60 mL) and washed with a 1 N aqueous sodium hydroxide solution (4 × 45 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by alumina column chromatography using a solution of dichloromethane/ethanol (97/3, v/v) as eluent to give compound S12 (762 mg, 1.36 mmol) as a gum. Yield 80%. R_f Al_2O_3 /dichloromethane/ethanol (97/3, v/v) 0.19; IR (ATR diamond accessory) ν 3400–3100, 2971, 2932, 2872, 1668, 1525, 1491, 1213 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 1.12 (t, 6H, $J = 7$ Hz), 1.42 (s, 9H), 2.69 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 2.77 (m, 2H), 3.23 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 3.48 (m, 16H), 7.90 (dd, 1H, $J = 2.4$, 9.1 Hz), 8.30 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 9.37 (s, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 10.4 (2C), 27.4 (3C), 36.5, 39.4, 39.9, 46.8 (2C), 51.2, 69.7, 69.8, 69.9 (2C), 80.1, 114.0, 125.7, 131.3, 138.0, 143.0, 144.5, 144.9, 145.8, 157.3, 158.4, 165.6; ESI-SM m/z 562.43 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 4. Synthesis of 6-[3-[2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]ureido]-N-(2-diethylaminoethyl)quinoxaline-2-carboxamide (i.e. melanin-targeting ligand 3). Compound 3 was prepared according to the procedure developed for the last step of synthesis of 2 starting from 6-[3-[2-[2-(2-tert-butyloxycarbonylaminoethoxy)ethoxy]ethyl]ureido]-N-(2-diethylaminoethyl)quinoxaline-2-carboxamide (S12) (667 mg, 1.19 mmol). The residue was purified by alumina column chromatography using a solution of dichloromethane/ethanol/ammonium hydroxide (90/10/1, v/v/v) as eluent to give compound 3 (508 mg, 1.10 mmol) as a yellow solid. Yield 93%. mp 100–102 °C; R_f Al_2O_3 /dichloromethane/ethanol/ammonium hydroxide (90/10/1, v/v/v) 0.36; IR (KBr) ν 3400–3050, 3000–2750, 1684, 1635, 1521, 1489, 1351, 1212, 1134 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.08 (t, 6H, $J = 7$ Hz), 2.15 (se, 2H), 2.52 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 2.72 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz), 3.05 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 3.60 (m, 12H), 6.15 (m, 1H), 7.82 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.97 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 8.30 (m, 1H), 8.38 (dd, 1H, $J = 2.4$, 9.3 Hz), 9.53 (s, 1H), 9.80 (se, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 12.1 (2C), 37.4, 39.8, 41.2, 47.1 (2C), 51.6, 69.7, 69.9 (2C), 71.6, 113.2, 124.4, 130.1, 136.5, 141.4, 143.7, 143.9, 144.8, 155.7, 163.7; ESI-SM m/z 462.23 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Covalent conjugation of the melanin-targeting ligands to SRPs. Syntheses were performed at room temperature. SRP

concentrations are stated in mol L^{-1} of gadolinium(III) element. 100 μmol of freeze-dried SRPs were dispersed in water (100 mM) for 15 min and treated by EDC and NHS at pH 5 for 30 min (EDC/NHS/Gd molar ratio 2.4 : 2.4 : 1). The activated SRP solution was divided into four aliquots: three to be grafted with each of the three NH_2 -ended melanin-targeted ligands (respectively 1, 2 and 3) and a last one to be used as a reference. Each targeting ligand was mixed with one of the previously activated SRP aliquots at pH 7–7.4 for 8 h (targeting ligand/Gd molar ratios: 1.3 : 1 for SRP-1, 3.5 : 1 for SRP-2 and 2.1 : 1 for SRP-3). Similarly, the last sample considered as the reference was subjected to the same conditions, i.e. previously remaining activated SRP aliquot was stirred at pH 7–7.4 for 8 h. To achieve higher proton longitudinal relaxivities, additional Gd^{3+} ions were inserted to the four SRP aliquots by adding a 100 mM Gd^{3+} solution prepared with $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water (additional Gd^{3+} /initial Gd molar ratio 0.5 : 1). The final mixture was stirred for 3 h at pH 5–6. Each SRP aliquot was subjected to tangential filtration to a 3000 factor over a 5 kDa membrane to remove any unconjugated product or free Gd^{3+} ions and was freeze-dried for storage, using a Christ Alpha 1-2 lyophilizer. The functionalized freeze-dried SRPs are stable for months without alteration.

Techniques of particle characterization

Relaxivity measurements. Relaxivity experiments were performed on a Bruker® mq60 NMR Analyzer at 37 °C. Samples were measured at a specific Gd(III) concentration, calculated from ICP-OES. Measurements were plotted as $1/T_1$ vs. Gd(III) concentration (mM). The slope of this line provides the molar relaxivity.

Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) analysis. The determination of the accurate concentration of gadolinium in SRP samples was performed by ICP-OES with a Varian® 710-ES spectrometer. First, SRPs were pre-dispersed in water (100 mM). Small amounts of SRP aqueous solutions were diluted and heated at 80 °C for 3 h in 5 mL of concentrated nitric acid (67% HNO_3 (w/w)). Subsequently, the samples were scattered in 50 mL of water. For the calibration of ICP-OES, single element standard solution was used and prepared from 1000 ppm Gd-standard from SCP Science® by successive dilutions with an HNO_3 5% (w/w) matrix.

Photon Correlation Spectroscopy (PCS) size and ζ -potential measurements. Hydrodynamic diameters (HDs) and ζ -potentials of our samples were determined with a Zetasizer NanoS PCS (Photon Correlation Spectroscopy, laser He-Ne 633 nm) from Malvern Instruments®. For HD measurements, 200 μL of an aqueous solution of SRPs (10 mM) were pipetted into a disposable micro-cuvette (ZEN0040). Attenuator and position were optimized by the device. Prior to ζ -potential experiments, the SRPs (10 mM) were diluted in an aqueous solution containing 0.01 M NaCl and adjusted to the desired pH. ζ -Potential measurements were recorded at 25 °C with palladium electrodes within a high concentration cell (ZEN1010). The ζ -potential was automatically calculated from electrophoretic mobility based on the Smoluchowski equation, $\nu = (\epsilon E/\eta)\zeta$, where ν is the measured electrophoretic velocity, η is the viscosity, ϵ is the electrical permittivity of the electrolytic solution and E is the electric field.

Mass spectrometry. Full scan mass experiments were performed using a linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) with enlargement for the high 400–4000 Th range. The nanoparticle solution was electro-sprayed at a flow rate of $5 \mu\text{g min}^{-1}$ in positive ion mode. Isotopic distributions of fragment ions were recorded using the zoom scan mode of the LTQ quadrupole ion trap mass spectrometer.

Infrared spectra. The IR spectra of solid dry SRP samples were acquired on an IRAffinity-1, Shimadzu® with an ATR platform by applying attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy from 600 to 4000 cm^{-1} .

Ultraviolet-visible absorption spectra. Aqueous solutions of SRPs were analyzed by a UV-vis spectrophotometer (Varian Cary50) in the range of 200 to 800 nm, with a Hellma semi-micro cell, 10 mm light path, 1400 μL , manufactured from Suprasil quartz.

Surface plasmon resonance. The surface Plasmon resonance assays were performed using a BIAcore® 2000 biosensor. The instrument was equipped with research-grade CM5 sensor-chips (GE Healthcare®, Uppsala, Sweden).

Immobilization of melanin. Immobilization was performed at $32 \text{ }^\circ\text{C}$ and required two steps. The first step consists in derivatizing the CM5 sensor chip into an amine surface. To this end, ethylenediamine was bound to the carboxymethylated dextran layer of the CM5 sensor chip, using the standard amine coupling kit (GE Healthcare®, Uppsala, Sweden). The flow rate was set at $5 \mu\text{L min}^{-1}$. Briefly, the carboxylic acids of the channel 2 (FC2) of the CM5 sensor chip were activated with EDC/NHS for 15 min. Then, ethylenediamine (1 M in a 50 mM borate buffer at pH 8.6) was injected during 15 additional min and the remaining active sites were blocked by adding ethanolamine (1 M at pH 8.5) for 15 min. The second step implies the melanin immobilization. Prior to this immobilization, the carboxylic acids on melanin were activated for 30 min at room temperature by mixing 20 μL of melanin with NH_4OH (1 M),²⁰ 10 μL of EDC (0.2 M in water) and 20 μL of NHS (0.05 M in water). Then, 150 μL of 10 mM borate buffer was added and the whole mixture was injected in channel 2 at $5 \mu\text{L min}^{-1}$ for 30 min. As before, remaining active sites were blocked by adding ethanolamine (1 M at pH 8.5) for 5 min. The signal corresponding to immobilized melanin on channel 2 was approximately 200 RU. Channel 1 (FC1) of the CM5 sensor chip was conserved under the carboxymethylated dextran form in order to be used as a reference surface and to observe possible non-specific interactions.

Experiment progress. Binding analyses were performed at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and the flow rate was set to $20 \mu\text{L min}^{-1}$. An experiment gathered data from several cycles. A cycle typically consisted in the injection of the analyte (unfunctionalized and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands) for 3 min. This step was followed by a waiting period of 2.5 min under running buffer. Then, the surface was regenerated to remove SRPs from the sensorchip with the injection of 20 mM NaOH and 1 M NaCl for 1.5 min at $20 \mu\text{L min}^{-1}$. A waiting period of 2 min under running buffer finished the cycle. Each experiment began with five cycles, called startup, injecting running buffer instead of analyte to stabilize the baseline of the BIAcore®.

Results and discussion

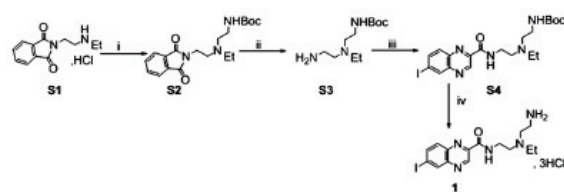
Synthesis of the melanin-targeting ligands

The three melanin-targeting ligands (**1**, **2** and **3**) shown in Fig. 1 were prepared according to the corresponding Schemes 1, 2 and 3. Compound **1** was obtained in four steps starting from *N*-[2-(ethylamino)ethyl]phthalimide hydrochloride salt (**S1**)⁴⁷ (Scheme 1). Briefly, alkylation of amine **S1** with *N*-protected aminoethyl bromide⁴⁶ gave the tertiary amine **S2**. Selective deprotection of the phthalimide group afforded amine **S3** which was conjugated to *p*-nitrophenyl 6-iodoquinoxaline-2-carboxylate⁴⁸ to give amide **S4**. Final *N*-boc deprotection was achieved in an anhydrous ethereal solution of hydrochloric acid to produce ligand **1** as a trihydrochloride salt. Pegylated derivative **2** was obtained by condensation of the previously reported secondary amine **S7**⁴⁸ with acrylamide **S6** according to the procedure developed by You, L. *et al.* for aza-michael addition of amines to α,β -unsaturated amides,⁵⁰ followed by acidic removal of the boc group of **S8** (Scheme 2). The synthesis of the aromatic functionalized ligand **3** started from previously reported nitro ester **S9**,⁹ a key intermediate in the synthesis of ICF01012 (Scheme 3), was hydrogenated over Pd/C to give the aromatic amine **S11**. In order to introduce the amino pegylated linker we converted the amino function of **S11** into *p*-nitrophenylcarbamate using *p*-nitrophenyl chloroformate. The resulting activated carbamate was isolated as a hydrochloride salt and directly coupled with *tert*-butyl 2-[2-aminoethoxy]ethoxy]ethyl carbamate¹⁹ in the presence of triethylamine to give urea **S12**. Next, the deprotection of *N*-boc group afforded melanin-targeting ligand **3**.

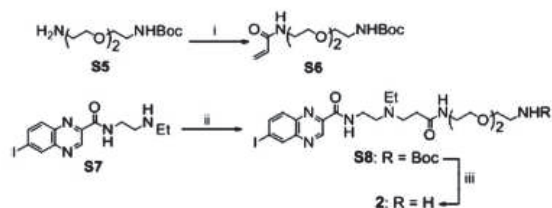
Synthesis – grafting strategy of the melanin-targeting ligands to SRPs

SRPs were synthesised *via* a top-down process according to previous studies.¹¹ This pathway classically allows SRP synthesis displaying an average 3 nm hydrodynamic diameter (HD) and an average 8.5 kDa molecular mass. SRPs consist in a polysiloxane network around which DOTA derivatives are arranged. The number of DOTA molecules per SRP was estimated to be 10. Around 50% of these DOTA ligands chelate Gd^{3+} ions while others remain free for peptide conjugation.

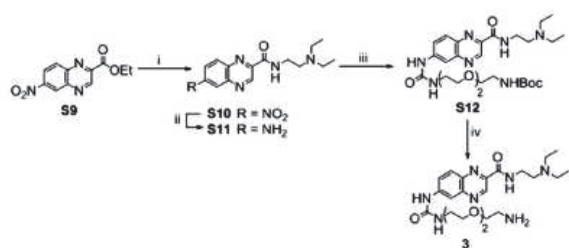
Thus, SRPs exhibit some available carboxylic acid functions (from free DOTA ligands) for grafting. NH_2 -ended melanin-targeting ligands were covalently conjugated to these carboxylic acid functions thanks to an amide bond. The structure of



Scheme 1 Synthesis of melanin-targeting ligand **1**. Reagents and conditions: (i) 2-(*boc*-amino)ethyl bromide, potassium carbonate, acetonitrile, $60 \text{ }^\circ\text{C}$. (ii) Hydrazine hydrate, ethanol, rt. (iii) *p*-Nitrophenyl 6-iodoquinoxaline-2-carboxylate, tetrahydrofuran, rt. (iv) Dichloromethane, 2 N HCl/diethyl ether, rt.



Scheme 2 Synthesis of melanin-targeting ligand **2**. Reagents and conditions: (i) acryloyl chloride, *N,N*-diisopropylethylamine, rt. (ii) **S6**, SiO₂, acetonitrile, reflux. (iii) Trifluoroacetic acid, rt.



Scheme 3 Synthesis of melanin-targeting ligand **3**. Reagents and conditions: (i) *N,N*-diethylethylenediamine, trimethylaluminium, 0 °C then reflux. (ii) H₂, Pd/C 10%, EtOH, rt. (iii) (*p*-Nitrophenyl chloroformate, pyridine, dichloromethane, rt. (b) **S5**, tetrahydrofuran, rt. (iv) Trifluoroacetic acid, rt.

melanin-targeting ligands **1** and **2** was quite similar, the only difference being the insertion of a pegylated spacer for melanin-targeting ligand **2**. This spacer was added in order to demonstrate the possible influence of a steric hindrance. On the other hand, the two binding sites of melanin-targeting ligand **3** were reversed compared to those of melanin-targeting ligand **2** in order to understand the importance of both ionic and hydrophobic sites.

The HDs of the conjugated SRPs were 4.6 ± 1.3 nm, 3.8 ± 1.0 nm and 4.4 ± 1.3 nm for SRP-**1**, **2** and **3** respectively, showing a significant increase in comparison with the native particles (see ESI[†]). ζ -Potentials of unfunctionalized and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands **1**, **2** and **3** were measured for different pH values. The isoelectric point of the unfunctionalized SRPs was about 4.5, while it slightly increased for the functionalized SRPs with melanin-targeting ligands **1**, **2** and **3** (about 5). This small increase was in good agreement with the surface modification of the SRPs by the melanin-targeting ligands which brought one positive charge per grafted ligand when the tertiary amine is protonated.

Validation of the melanin-targeting ligand grafting to SRPs

Longitudinal proton relaxivity measurements. Since Gd(III) increases the spin lattice relaxation rate of water protons, chelates of the paramagnetic metal ion are commonly used as magnetic resonance contrast agents.⁵¹ Relaxivity is an indicator of the efficiency with which the complex enhances the proton relaxation rates of water.⁵² Longitudinal proton relaxivities of different SRPs at 60 MHz were calculated according to the following equation (eqn (1)):⁵¹

$$(1/T_1)_{\text{measured}} = (1/T_1)_{\text{water}} + r_1[\text{Gd}]_{\text{tot}} \quad (1)$$

where $T_{1\text{measured}}$ is the longitudinal relaxation time of the sample (ms), $T_{1\text{water}}$ is the longitudinal relaxation time of water (ms), r_1 is the longitudinal proton relaxivity of the sample ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$) and $[\text{Gd}]_{\text{tot}}$ is the actual gadolinium concentration of the sample (mM) measured by ICP analysis. The slope of this line provides the molar relaxivity. Relaxivity values of water protons in the presence of SRPs are reported in Table 1.

Covalent conjugation of large molecular weight objects to imaging agents is likely to increase rotational correlation time, thus enhancing their relaxivity.^{53,54} Indeed, at 60 MHz, the longitudinal relaxivities of the commonly utilized contrast agents such as Gd-DOTA (e.g. Dotarem®) and Gd-DTPA (e.g. Magnevist®) complexes are about $4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ while the longitudinal relaxivities of unfunctionalized SRPs equals $11.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and exceed $13 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for functionalized SRPs with melanin-targeting ligands. The small increase of the longitudinal relaxivities is in good agreement with an efficient functionalization of SRPs due to an increase of the correlation rotational time thanks to the augmentation of the particle's mass.

Mass Spectrometry (MS). The conjugation of melanin-targeting ligand **1** to SRPs was confirmed by mass spectrometry. First, SRPs were subjected to Electrospray Ionization (ESI) to generate intact ions in the gas phase and to obtain charge and mass information. The ESI spectrum of functionalized SRPs with melanin-targeting ligand **1** is reported in the ESI.† A multiplicative correlation algorithm (MCA) was used to estimate the mass of the SRPs from the mass-to-charge spectrum. The main distribution of SRP-**1** was divided into two parts: $8.7 \text{ kDa} \pm 0.4 \text{ kDa}$ and $9.9 \text{ kDa} \pm 0.3 \text{ kDa}$.

At low mass in the negative mode, some details about the structure of the unfunctionalized SRPs had already been reported in earlier ESI-MS studies.¹¹ For example, it was noticed that the m/z 749 peak was specific to the $[\text{Gd-DOTA-Si}(\text{OH})_3]^-$ fragment, namely the Gd-DOTA complex borne by a silanetriol, belonging to the polysiloxane network (Fig. 1(A)). The negative charge was shared out by the four carboxylic acids from the DOTA molecule. As expected, this peak was observed for both unfunctionalized and functionalized SRPs. An additional peak at m/z 630 was observed for both SRPs, matching an amide bond cleavage between DOTA and APTES molecules by loss of the $[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OH})_3]^-$ fragment.⁵⁵ This cleavage came with a C=C double bond creation and, as the Gd coordination number varies between 8 and 9,⁵⁶ a water molecule addition in its coordination sphere (Fig. 1(A)).

Table 1 Longitudinal relaxivities r_1 ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) of unfunctionalized and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands at 60 MHz calculated according to eqn (1) and considering $(1/T_1)_{\text{water}}$ was negligible with respect to $(1/T_1)_{\text{measured}}$

Longitudinal proton relaxivities ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) at 60 MHz	
Unfunctionalized SRPs	11.2
SRP- 1	13.4
SRP- 2	13.0
SRP- 3	14.4

Then, in the positive mode, the low part of the ESI spectrum was dominated by the m/z 852 peak. This peak was observed for both unfunctionalized SRPs and functionalized SRPs with melanin-targeting ligand **1**. This m/z 852 peak was attributed to the Gd-DOTA complex borne by two APTES molecules belonging to the polysiloxane network (Fig. 1(B)). Finally, another peak was observed at m/z 991 and was specific to functionalized SRPs with melanin-targeting ligand **1**. As evidenced by the isotopic distribution (Fig. 1(B)), this peak was attributed to the [ligand **1**-DOTA-Si(OH)₃]⁺ fragment, *i.e.* melanin-targeting ligand **1** conjugated to the DOTA chelate borne by a silanetriol (belonging to the polysiloxane network). The tertiary amine of melanin-targeting ligand **1** was protonated and gave the positive charge to the whole fragment. This m/z 991 fragment proves the covalent conjugation of the melanin-targeting ligand **1** to SRPs. It is interesting to note the absence of the Gd(III) ion within the DOTA ligand. It confirms the conjugation of the NH₂-ended ligands *via* one of the carboxylic acid functions from “free” DOTA molecules.

Infrared spectroscopy. IR measurements of unfunctionalized and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands were performed to observe the covalent conjugation of the ligands to SRPs. IR spectra of the functionalized SRPs with melanin-targeting ligands were subtracted to the IR spectrum of unfunctionalized SRPs. The resulting spectra were overlaid to the IR spectrum of the corresponding melanin-targeting ligand (*e.g.* for SRP-1: see ESI[†]).

The spectrum of melanin-targeting ligand **1** displayed several characteristic peaks and bands at the following wavenumbers: 1671 cm⁻¹ (C=O stretching vibrations of primary amides), 1592 cm⁻¹ (N-H bending vibrations of primary amides), 1510–1580 cm⁻¹ (C=C stretching vibrations of quinoxaline), 1472 cm⁻¹ (C-H scissoring vibrations of -CH₂-), 1385 cm⁻¹ (C-H symmetric bending vibrations of -CH₃), 1180–1350 cm⁻¹ (C-N stretching vibrations of quinoxaline), 1030–1230 cm⁻¹ (C-N stretching vibrations of primary and tertiary amines) and 700–900 cm⁻¹ (C-H bending vibrations of quinoxaline and N-H bending vibrations of primary amines). On the spectrum resulting from the subtraction of functionalized SRPs with melanin-targeting ligand **1** to unfunctionalized SRPs, the 1580–1720 cm⁻¹ large band increase indicated the presence of primary amide functions. These amide groups originate from the amide of melanin-targeting ligand **1** and from the formation of an amide bond between the primary amine of the ligand and the carboxylic acid of free DOTA molecules. Moreover, the increase of the two large bands at 1500–1560 cm⁻¹ and 1000–1360 cm⁻¹ might result from the presence of the quinoxaline and the tertiary amine, both coming from the melanin-targeting ligand **1**. This three band gain confirmed the covalent conjugation of melanin-targeting ligand **1** to SRPs. Similarly, the covalent conjugation of melanin-targeting ligands **2** and **3** to SRPs was demonstrated (see ESI[†]).

Quantification of the melanin-targeting ligand number per SRP

The absorption spectra of each melanin-targeting ligand displayed strong absorption bands in the UV region (256 and

342 nm for compounds **1** and **2**, 272 and 373 nm for compound **3**), which were assigned to the spin-allowed π - π^* transition of the quinoxaline rings.⁵⁷ UV-visible absorption spectra of SRP-1, **2** and **3** are reported in the ESI.[†] These UV-visible absorption spectra were compared to each other before and after purification in order to evaluate the grafting rate of the melanin-targeting ligands to SRPs (with the hypothesis that coupling only slightly disturbs the molar extinction coefficient of the ligand). The two absorption bands assigned to melanin-targeting ligands **1**, **2** and **3** were observed, as well as a peak at 295 nm, specific to SRPs.

The final ligand/Gd molar ratios were about 0.4 for SRP-1 and **3** and slightly lower (0.35) for SRP-2. The ligand/SRP molar ratios depend on the number of gadolinium atoms per SRP which was evaluated by elemental analysis.

Elemental analyses were performed on unfunctionalized and functionalized SRPs (see ESI[†]). The molar ratios deduced from weight percentages are reported in the ESI.[†] Two major hypotheses were made to estimate the SRP chemical compositions:¹¹

- (i) each SRP displays 10 ± 1 DOTA molecules;
- (ii) the APTES/TEOS molar ratio of the polysiloxane network (1 Si = 0.6 APTES + 0.4 TEOS) remains constant during synthesis and purification steps.

The number of melanin-targeting ligands per SRP deduced by elemental analysis was in relatively good agreement with the values provided by UV-visible Absorption. The average numbers of melanin-targeting ligands per SRP exceeded 2 and equalled 2.5 for SRP-1 and 2.2 for SRP-2 and **3**.

Binding assays by surface plasmon resonance

Melanin is a biopolymer which chemical structure is still under debate; more specifically, the organization of its basic subunits is not clear yet.³⁵ Surface plasmon resonance was evidenced as a good test to highlight the binding of functionalized SRPs with melanin-targeting ligands to melanin for the reasons described below. Since studies involving the use of natural melanin require the isolation of the pigment from its biological environment without altering the pigment, synthetic melanin is generally preferred as a standard to natural melanin.^{58,59} However, synthetic melanin is insoluble in almost all organic solvents,³⁵ which curbs the binding assays of SRPs to melanin in solution. In addition, melanin is characterized by a broadband absorption spectrum that increases exponentially towards the UV region,^{36–38} which prevents the SRP detection in a melanin-containing solution. Finally, the similar molecular weights of both melanin polymers and SRPs made their separation by centrifugation really difficult. The inherent difficulties of performing optical spectroscopy on such macromolecules and their poorly understood heterogeneous structure have limited physical and chemical experiments. Consequently, we identified surface plasmon resonance as an interesting binding assay to melanin for the screening of functionalized SRPs with melanin-targeting ligands.

Binding assays of functionalized SRPs with melanin-targeting ligands to melanin were performed on a BIAcore®

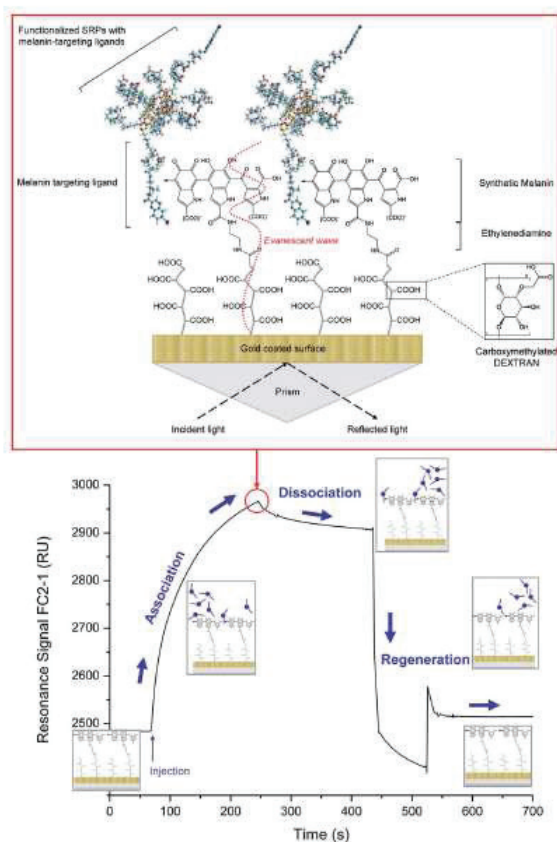


Fig. 2 Sensorgram of SRP-1 ($[Gd^{3+}] = 4.7 \mu M$). The binding of functionalized SRPs with melanin targeting ligands to melanin 140 s after the end of the analyte injection (FC2) is represented in the red box above.

biosensor. Channel 2 was derivatized into a melanin surface to prove the binding of functionalized SRPs with melanin-targeting ligands to synthetic melanin (Fig 2 – red box). On the other hand, channel 1 was maintained in its carboxymethylated

dextran native form in order to observe possible non-specific interactions.

Functionalized SRPs with melanin-targeting ligands as well as unfunctionalized SRPs were injected at different concentrations ($[Gd^{3+}]$ ranging from 0.27 to 4.8 μM for functionalized SRPs with melanin-targeting ligands and from 5.6 to 714 μM for unfunctionalized SRPs). This range of concentrations allowed plotting the curve depicting the previously described relative response of the binding to melanin 140 s after the end of the analyte injection *versus* the Gd concentration of SRPs (Fig. 3(A) and (B)).

Then, the SRPs were injected at the same concentration ($[Gd^{3+}] = 1 \mu M$) to select the best applicant for melanin targeting (Fig. 4). The sensorgrams were collected as shown in Fig. 2. The resonance signal (FC2-FC1) obtained after subtraction of the signal generated by non-specific interactions with the dextran matrix (FC1) is displayed *versus* time. The *sensorgrams* of the four samples had the same profile. Moreover, the relative response on FC2-FC1, 140 s after the end of the analyte injection increased rapidly for low SRP concentrations; in contrast, this response tended to a much slower growth for higher SRP concentrations as if the binding sites began to saturate (Fig. 3(A) and (B)). In order to understand the influence of both ionic and hydrophobic sites on the binding to melanin, unfunctionalized and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands were injected at the same concentration ($[Gd^{3+}] = 1 \mu M$) (Fig. 4).

An initial observation could be made: unfunctionalized SRPs seemed to have an affinity with melanin, most likely due to ionic interactions between the positive charges borne by the APTES molecules from SRPs and the negative charges of melanin. However, as expected, this affinity was much higher for functionalized SRPs with melanin-targeting ligands. Indeed, at the same concentration ($[Gd^{3+}] = 1 \mu M$), the FC2-FC1 signal is more than ten times higher for SRPs functionalized by melanin-targeting ligands (>58 RU) than for unfunctionalized SRPs (4.7 RU) (Fig. 4). This result confirmed that the melanin targeting is due to the ligands grafted on SRPs. A slight advantage might be attributed to SRP-3, then demonstrating the strong influence of the ionic interaction.

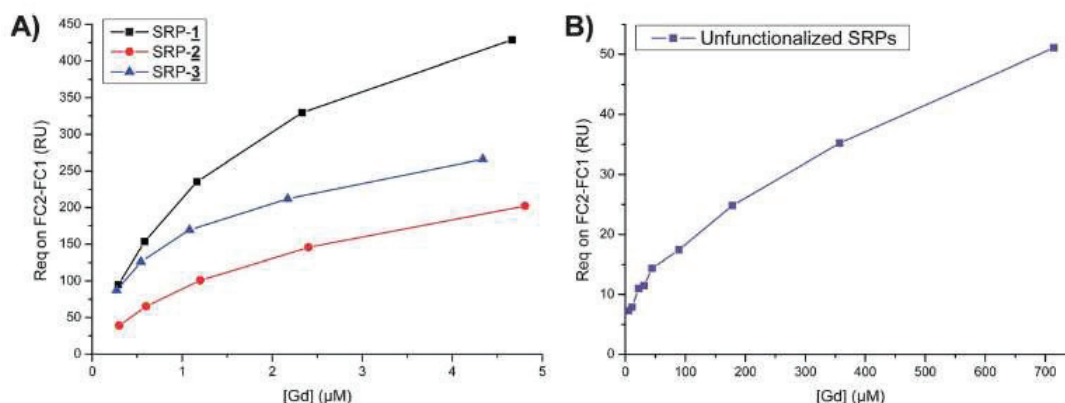


Fig. 3 BIAcore® analyses: relative response on the melanin surface (FC2-FC1) 140 s after the end of the analyte injection *versus* the concentration (in μM of Gd(III)) of (A) functionalized SRPs with melanin-targeting ligands 1, 2 and 3 and (B) unfunctionalized SRPs.

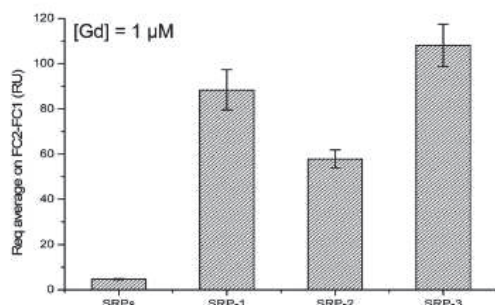


Fig. 4 BIAcore® analyses: relative response average and standard deviation on the melanin surface (FC2-FC1), 140 s after the end of the analyte injection at the same concentration ($[Gd^{3+}] = 1 \mu M$) for unfunctionalized SRPs and functionalized SRPs with melanin-targeting ligands 1, 2 and 3. The injection sequence (SRPs, SRP-1, SRP-2, SRP-3) was repeated 3 times.

However, considering Fig. 3(A), the binding to melanin for SRP-1 and 3 appeared to be quite similar for low concentrations ($[Gd^{3+}] < 1 \mu M$). Therefore, for low concentrations, neither of the two ligands (1 and 3) seems to prevail. In contrast, for higher concentrations, SRP-1 emerged as the best candidate for melanin targeting. Indeed, melanin-targeting ligands 2 and 3 are equipped with a pegylated spacer arm whereas melanin-targeting ligand 1 is not. This spacer was added to take the ligand away from the SRP in order to ease melanin targeting. Surprisingly, this pegylated spacer appeared to hinder the binding of the ligand to melanin. As previously hypothesized, melanin-targeting ligands 2 and 3 might have bent on themselves, precisely thanks to their pegylated spacer. Since the melanin-targeting ligands bear a positive charge, they might have been attracted to the negative charges borne by the carboxylic acids of the DOTA ligands. This ionic interaction is likely to cause the bending of melanin-targeting ligands 2 and 3 on themselves and consequently to hinder their binding to melanin. In contrast, melanin-targeting ligand 1, which is not equipped with a pegylated spacer, was not able to bend on itself, and this might be the reason of the higher binding of SRP-1 to melanin compared to SRP-2 and 3. Consequently, no conclusion on the predominance of one of the two binding sites of the ligands on their binding to melanin could be drawn. However, these results confirm the affinity of the three ligands for melanin. This affinity results from the contribution of two interactions. First, an ionic interaction between the protonated tertiary amine of the melanin-targeting ligand and the synthetic melanin was highlighted in previous studies. On the other hand, the π stacking interactions between the aromatic rings of the melanin-targeting ligand and the aromatic ones of the melanin subunits add a stabilizing effect on the binding to melanin.⁵⁸

Conclusions

Since malignant melanoma is one of the most difficult tumour types to treat, there is an urgent need to improve diagnosis and therapy for patients with disseminated melanoma. In this

context, three quinoxaline derivatives were successfully synthesized as melanin seeking agents. Each of these three targeting molecules was covalently conjugated to SRPs in order to target the nanoparticles to melanin and therefore to melanoma. The grafting was confirmed and the average number of melanin-targeting ligands per SRP could be estimated and exceeded 2. Melanin targeting was observed *in vitro* using BIAcore®, a conventional surface plasmon resonance biosensor. The functionalized SRPs with the three different melanin-targeting ligands demonstrated high affinity for synthetic melanin compared to unfunctionalized SRPs. The binding to melanin is certainly the result of a strong ionic interaction, strengthened by a weaker but stable hydrophobic interaction. The functionalized SRPs with melanin-targeting ligand 1 appeared to be the best candidate for melanin targeting compared to SRP-2 and 3, of which the melanin-targeting ligands are equipped with a pegylated spacer. This active targeting, combined with the tremendous potential of SRPs to be detected by four complementary imaging techniques (MRI, SPECT, CT, fluorescence imaging) and to exhibit sensitizing properties for radiotherapy, supports the concept of an earlier and more accurate diagnosis and of an effective targeted radiotherapy for further *in vivo* studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Cancerpole Lyon Auvergne Rhône-Alpes for the proof of concept project LANTHARAD.

Notes and references

- 1 L. Finn, S. N. Markovic and R. W. Joseph, Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future, *BMC Med.*, 2012, **10**, 23.
- 2 C. Garbe, T. K. Eigentler, U. Keilholz, A. Hauschild and J. M. Kirkwood, Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects, *Oncologist*, 2011, **16**, 5–24.
- 3 M. K. Khan, N. Khan, A. Almasan and R. Macklis, Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents, *OncoTargets Ther.*, 2011, **4**, 137–148.
- 4 A. P. Algazi, C. W. Soon and A. I. Daud, Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects, *Cancer Manage. Res.*, 2010, **2**, 197–211.
- 5 P. Lorigan, T. Eisen and A. Hauschild, Systemic therapy for metastatic malignant melanoma – from deeply disappointing to bright future?, *Exp. Dermatol.*, 2008, **17**, 383–394.
- 6 J. A. Sosman, K. B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A. C. Pavlick, J. S. Weber, G. A. McArthur, T. E. Hutson, S. J. Moschos, K. T. Flaherty, P. Hersey, R. Kefford, D. Lawrence, I. Puzanov, K. D. Lewis, R. K. Amaravadi, B. Chielowski, H. J. Lawrence, Y. Shyr, F. Ye, J. Li, K. B. Nolop, R. J. Lee, A. K. Joe and A. Ribas, Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib, *N. Engl. J. Med.*, 2012, **366**, 707–714.

- 7 M. R. Middleton, J. J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, S. Aamdal, J. Cebon, A. Coates, B. Dreno, M. Henz, D. Schadendorf, A. Kapp, J. Weiss, U. Fraass, P. Statkevich, M. Muller and N. Thatcher, Randomized phase III study of temozolomide *versus* dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma, *J. Clin. Oncol.*, 2000, **18**, 158–166.
- 8 G. A. Mc Arthur, I. Puzanov, R. Amaravadi, A. Ribas, P. Chapman, K. B. Kim, J. A. Sosman, R. J. Lee, K. Nolop, K. T. Flaherty, J. Callahan and R. J. Hicks, Marked, homogeneous, and early [¹⁸F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography responses to vemurafenib in *BRAF*-mutant advanced melanoma, *J. Clin. Oncol.*, 2012, **30**, 1628–1634.
- 9 J. M. Chezal, J. Papon, P. Labarre, C. Lartigue, M. J. Galmier, C. Decombat, O. Chavignon, J. Maublant, J. C. Teulade, J. C. Madelmont and N. Moins, Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of *N*-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3133–3144.
- 10 E. Dadachova, J. D. Nosanchuk, L. Shi, A. D. Schweitzer, A. Frenkel, J. S. Nosanchuk and A. Casadevall, Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**(no. 41), 14865–14870.
- 11 F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Jossierand, J. L. Coll, V. Stupard, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 12299–12303.
- 12 G. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Bräuer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux and O. Tillement, Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium based nanoparticles, *ACS Nano*, 2011, **5**(no. 12), 9566–9574.
- 13 J. L. Bridot, D. Dayde, C. Rivière, C. Mandon, C. Billotey, S. Lerondel, R. Sabattier, G. Cartron, A. Le Pape, G. Blondiaux, M. Janier, P. Perriat, S. Roux and O. Tillement, Hybrid gadolinium oxide nanoparticles combining imaging and therapy, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 2328–2335.
- 14 H. S. Choi, W. Liu, F. Liu, K. Nasr, P. Misra, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni, Design considerations for tumour-targeted nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 42–47.
- 15 A. S. Narang and S. Varia, Role of tumor vascular architecture in drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2011, **63**(no. 8), 640–658.
- 16 H. S. Choi and J. V. Frangioni, Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation, *Mol. Imaging*, 2010, **9**(6), 291–310.
- 17 M. Benezra, O. Penate-Medina, P. B. Zanzonico, D. Schaer, H. Ow, A. Burns, E. DeStanchina, V. Longo, E. Herz, S. Iyer, J. Wolchok, S. M. Larson, U. Wiesner and M. S. Bradbury, Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma, *J. Clin. Invest.*, 2011, **121**(no. 7), 2768–2780.
- 18 K. Jimbow, Y. Miyake, K. Homma, K. Yasuda, Y. Izumi, A. Tsutsumi and S. Ito, Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma, *Cancer Res.*, 1984, **44**, 1128–1134.
- 19 J. M. Wood, K. Jimbow, R. E. Boissy, A. Slominski, P. M. Plonka, J. Slawinski, J. Wortsman and J. Tosk, What's the use of generating melanin?, *Exp. Dermatol.*, 1999, **8**, 153–164.
- 20 K. Sono, D. Lye, C. A. Moore, W. C. Boyd, T. A. Gorlin and J. M. Belitsky, Melanin-based coatings as lead-binding agents, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2012, article ID 361803.
- 21 K. Wakamatsu and S. Ito, Advanced chemical methods in melanin determination, *Pigm. Cell Res.*, 2002, **15**, 174–183.
- 22 S. E. McClain, K. B. Mayo, A. L. Shada, M. E. Smolkin, J. W. Patterson and C. L. Slingluff Jr, Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences, *Int. J. Dermatol.*, 2012, **51**, 420–426.
- 23 A. Premkumar, F. Marincola, J. Taubenberger, C. Chow, D. Venzon and D. Schwartzentruber, Metastatic melanoma: correlation of MRI characteristics and histopathology, *Chin. J. Magn. Reson. Imaging*, 1996, **6**, 190–194.
- 24 A. Dadachova, J. D. Nosanchuk, L. Shi, A. D. Schweitzer, A. Frenkel, J. S. Nosanchuk and A. Casadevall, Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 14865–14870.
- 25 E. Revskaya, A. M. Jongco, R. S. Sellers, R. C. Howell, W. Koba, A. J. Guimaraes, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall and E. Dadachova, Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine, *Clin. Cancer Res.*, 2009, **15**, 2373–2379.
- 26 T. Q. Pham, I. Greguric, X. Liu, P. Berghofer, P. Ballantyne, J. Chapman, F. Mattner, B. Dikic, T. Jackson, C. Loch and A. Katsifis, Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3561–3572.
- 27 I. Al Jammaz, B. Al-Otaibi, S. Okarvi and J. Amartei, Rapid and efficient synthesis of [¹⁸F]fluoronicotamides, [¹⁸F]fluoroisonicotamides and [¹⁸F]fluorobenzamides as potential pet radiopharmaceuticals for melanoma imaging, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2011, **54**, 312–317.
- 28 C. Moura, T. Esteves, L. Gano, P. D. Raposinho, A. Paulo and I. Santos, Synthesis, characterization and biological evaluation of tricarbonyl M(I) (M = Re, ^{99m}Tc) complexes functionalized with melanin-binding pharmacophores, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 2564–2578.
- 29 N. Moins, M. D'Incan, J. Bonafous, F. Bacin, P. Labarre, M. F. Moreau, D. Mestas, E. Noirault, F. Chossat, E. Berthommier, J. Papon, M. Bayle, P. Souteyrand, J. C. Madelmont and A. Veyre, ¹²³I-*N*-(2-diethylaminoethyl)-

- 2-iodobenzamide: a potential imaging agent for cutaneous melanoma staging, *Eur. J. Nucl. Med.*, 2002, **29**, 1478–1484.
- 30 M. Eisenhut, W. E. Hull, A. Mohammed, W. Mier, D. Lay, W. Just, K. Gorgas, W. D. Lehmann and U. Haberkorn, Redioiodinated *N*-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3913–3922.
- 31 N. Desbois, M. Gardette, J. Papon, P. Labarre, A. Maisonia, P. Auzeloux, C. Lartigue, B. Bouchon, E. Debiton, Y. Blache, O. Chavignon, J. C. Teulade, J. Maublant, J. C. Madelmont, N. Moins and J. M. Chezal, Design, synthesis and preliminary biological evaluation of acridine compounds as potential agents for a combined targeted chemo-radionuclide therapy approach to melanoma, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 7671–7690.
- 32 R. M. Ings, The melanin binding of drugs and its implications, *Drug Metab. Rev.*, 1984, **15**, 1183–1212.
- 33 M. Bonnet-Duquennoy, J. Papon, F. Mishellany, P. Labarre, J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, M. Gardette, J. Maublant, F. Penault-Llorca, E. Miot-Noirault, A. Cayre, J. C. Madelmont, J. M. Chezal and N. Moins, Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent, *Int. J. Cancer*, 2009, **125**, 708–716.
- 34 J. C. Madelmont, J. M. Chezal, O. Chavignon, J. C. Teulade, N. Moins, Labelled analogues of halobenzamides as radiopharmaceuticals, World patent, WO2008012782, 2008.
- 35 K. Shanmuganathan, J. H. Cho, P. Iyer, S. Baranowitz and C. J. Ellison, Thermooxidative stabilization of polymers using natural and synthetic melanins, *Macromolecules*, 2011, **44**, 9499–9507.
- 36 F. Bernsmann, V. Ball, F. Addiego, A. Ponche, M. Michel, J. J. de Almeida Gracio, V. Toniazzo and D. Ruch, Dopamine-melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution, *Langmuir*, 2011, **27**, 2819–2825.
- 37 P. Meredith, B. J. Powell, J. Riesz, S. P. Nighswander-Rempel, M. R. Pederson and E. G. Moore, *Soft Matter*, 2006, **2**, 37–44.
- 38 P. Meredith and J. Riesz, Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **79**(2), 211–216.
- 39 B. Liedberg, C. Nylander and I. Lundström, Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, **10**, i–ix.
- 40 S. Lin, A. S. Y. Lee, C. C. Lin and C. K. Lee, Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction with surface plasmon resonance, *Curr. Proteomics*, 2006, **3**, 271–282.
- 41 D. A. Edwards, Steric hindrance effects on surface reactions: applications to BIAcore, *J. Math. Biol.*, 2007, **55**, 517–539.
- 42 Y. Taguchi, E. Takano and T. Takeuchi, SPR sensing of bisphenol A using molecularly imprinted nanoparticles immobilized on a slab optical waveguide with consecutive parallel Au and Ag deposition bands coexistent with bisphenol 1 – immobilized Au nanoparticles, *Langmuir*, 2012, **28**, 7083–7088.
- 43 T. Ghosh, L. Williams and C. H. Mastrangelo, Label-free detection of protein binding with multisine SPR microchips, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4194–4199.
- 44 W. L. F. Armarego and D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, ed. Butterworth and Heinemann, Reed educational and professional Publishing Ltd, Oxford, 4th edn, 1996.
- 45 B. Johnsson, S. Löfås and G. Lindquist, Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors, *Anal. Biochem.*, 1991, **198**, 268–277.
- 46 K. Q. Ling and L. M. Sayre, Discovery of a sensitive, and tightly binding fluorogenic substrate of bovine plasma amine oxidase, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 339–350.
- 47 J. H. Jones, W. J. Holtz and E. J. Cragoe, 6-Substituted 5-chloro-1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-*b*]pyrazin-2-ones with hypotensive activity, *J. Med. Chem.*, 1973, **16**, 537–542.
- 48 D. Denoyer, P. Labarre, J. Papon, E. Miot-Noirault, M. J. Galmier, J. C. Madelmont, J. M. Chezal and N. Moins, Development of high-performance liquid chromatographic method for the determination of a new potent radioiodinated melanoma imaging and therapeutic agent, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **875**, 411–418.
- 49 M. Alterman, H. Sjöbom, P. Säfsten, P. O. Markgren, U. H. Danielson, M. Hämäläinen, S. Låfas, J. Hultén, B. Classon, B. Samuelsson and A. Hallberg, P1/P1' modified HIV protease inhibitors as tools in two new surface plasmon resonance biosensor screening assays, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, **13**, 203–212.
- 50 L. You, S. Feng, R. An, X. Wang and D. Bai, Silica gel accelerated aza-Michael addition of amines to α,β -unsaturated amides, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5147–5149.
- 51 N. Fatin-Rouge, E. Tóth, R. Meuli and J. C. G. Bünzli, Enhanced imaging properties of a Gd^{III} complex with unusually large relaxivity, *J. Alloys Compd.*, 2004, **374**, 298–302.
- 52 R. B. Lauffer, Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 901–927.
- 53 A. Ghosh, M. Haverick, K. Stump, X. Yang, M. F. Tweedle and J. E. Goldberger, Fine-tuning the pH trigger of self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 3647–3650.
- 54 S. R. Bull, M. O. Guler, R. E. Bras, T. J. Meade and S. I. Stupp, Self-assembled peptide amphiphile nanofibers conjugated to MRI contrast agents, *Nano Lett.*, 2004, **5**, 1.
- 55 A. G. Harrison, K. W. M. Siu and H. El Aribi, Amide bond cleavage in deprotonated tripeptides: a newly discovered pathway to 'b2 ions', *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 869–875.
- 56 C. A. Chang, L. C. Francesconi, M. F. Malley, K. Kumar, J. Z. Gougoutas and M. F. Tweedle, Synthesis, characterization and crystal structures of M(DO3A) (M = Fe, Gd) and Na[M(DOTA)] (M = Fe, Y, Gd), *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3501–3508.
- 57 F. M. Hwang, H. Y. Chen, P. S. Chen, C. S. Liu, Y. Chi, C. F. Shu, F. I. Wu, P. T. Chou, S. M. Peng and G. H. Lee,

- Iridium(III) complexes with orthometalated quinoxaline ligands: subtle tuning of emission to the saturated red color, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1344–1353.
- 58 M. Borel, D. Lafarge, M. F. Moreau, M. Bayle, L. Audin, N. Moins and J. C. Madelmont, High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy used to investigate the ability of drugs to bind to synthetic melanin, *Pigm. Cell Res.*, 2005, **18**, 49–54.
- 59 L. Gautam, K. S. Scott and M. D. Cole, Amphetamine binding to synthetic melanin and scatchard analysis of binding data, *J. Anal. Toxicol.*, 2005, **29**, 339–344.

IV.3. Résultats complémentaires

L'article ci-dessus décrit les stratégies mises en place pour le greffage de 3 molécules dérivées de la quinoxaline aux SRPs, la caractérisation du greffage et l'observation *in vitro* du ciblage des SRPs vectorisées sur la mélanine.

Comme détaillé dans l'article, les 3 molécules ciblantes sont greffées aux acides carboxyliques des molécules de DOTA vacantes, c'est-à-dire non engagées dans la complexation d'un ion Gd^{III} , par couplage peptidique avec activation carbodiimide standard des fonctions carboxylates (*cf.* Chapitre II). Ensuite, les SRPs sont « remontées en Gd^{III} » : des ions Gd^{III} sont ajoutés après l'étape de couplage peptidique afin de compléter un maximum de DOTA vacants dans le but d'obtenir une meilleure relaxivité longitudinale des SRPs (*cf.* Chapitre II). Enfin, les SRPs sont purifiées puis lyophilisées (*cf.* article).

Comme énoncé dans le Chapitre III, l'objectif de cette thèse consistant à greffer des molécules ciblantes en surface des SRPs, puis à valider le couplage et à quantifier le nombre de molécules greffées par SRPs, nous souhaitons détailler plus amplement les différentes méthodes ayant permis la caractérisation du couplage des molécules dérivées de la quinoxaline aux SRPs. Ainsi, nous reprenons ici les principales techniques de caractérisation physicochimiques utilisées pour valider et quantifier le greffage des molécules ciblantes aux SRPs.

Toutes les analyses sont réalisées sur les SRPs finales, donc « remontées en Gd^{III} », et les concentrations en ions Gd^{III} sont mesurées par ICP-OES.

IV.3.1. Validation du greffage des molécules ciblantes 1, 2 et 3, dérivées de la quinoxaline, aux SRPs

IV.3.1.1. Spectroscopie Infrarouge (IR)

Les spectres IR des 3 molécules ciblantes et des 4 SRPs (fonctionnalisées ou non) ont été collectés. Les 4 spectres de SRPs ont ensuite été corrigés par un facteur multiplicateur de façon à les ramener à la même concentration. Pour ce faire, nous avons sélectionné le pic à 1321 cm^{-1} , spécifique des SRPs, et non spécifique des molécules ciblantes 1, 2 et 3 : il correspond aux déformations O-H dans le plan des groupements acides carboxyliques issus des molécules de DOTA des SRPs. Les spectres IR ont alors été corrigés par un facteur multiplicateur de manière à ramener les SRPs fonctionnalisées et les SRPs non fonctionnalisées à la même valeur de transmittance au niveau du pic à 1321 cm^{-1} , afin de pouvoir comparer les SRPs entre elles à une même concentration. Le spectre IR corrigé des SRPs non fonctionnalisées a été soustrait à chacun des spectres IR corrigés

des SRPs fonctionnalisées avec les molécules ciblantes **1**, **2** et **3**, afin d'observer la présence de la molécule ciblante en question dans les différents échantillons.

Les courbes résultant de la soustraction de ces spectres IR ont été superposées aux spectres IR des molécules dérivées de la quinoxaline correspondantes. L'exemple donné en Figure IV.11 présente la courbe résultant de la soustraction du spectre IR corrigé des SRPs non fonctionnalisées à celui des SRP-**1**, ainsi que le spectre IR de la molécule ciblante **1**.

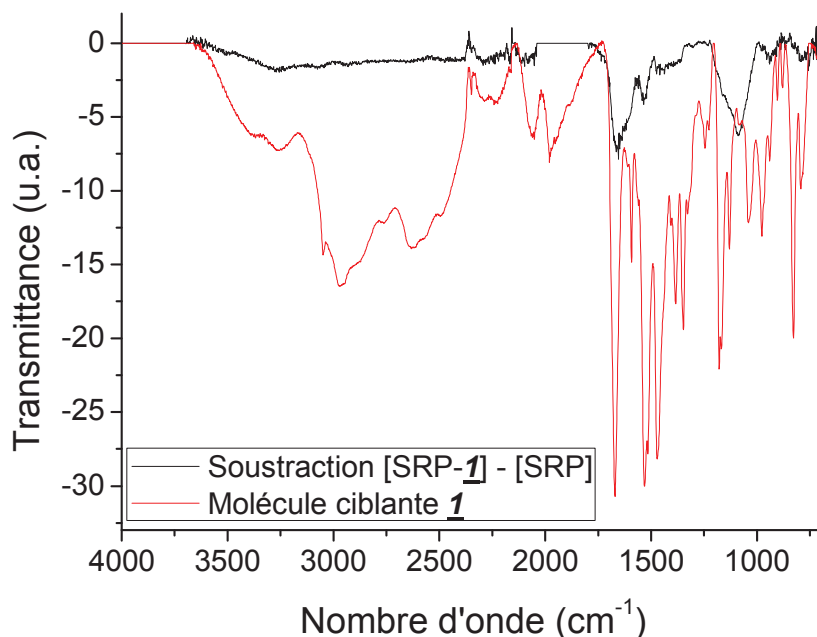


Figure IV.11. Spectres IR : Courbe résultant de la soustraction des spectres IR corrigés des SRPs aux SRP-**1** et Spectre IR de la molécule ciblante **1**, dérivée de la quinoxaline.

Les pics à 1534 et 1513 cm⁻¹ – attribués aux élongations C=C des cycles aromatiques de la quinoxaline – attestent de la présence de la molécule ciblante **1**. De plus, la série de pics compris entre 1000 et 1360 cm⁻¹ – attribués aux élongations C-N des cycles aromatiques de la quinoxaline et aux élongations C-N des amines – témoignent de la présence de la molécule ciblante **1**. Enfin, l'augmentation de la bande comprise entre 1580 et 1720 cm⁻¹ – comprenant les pics à 1671 cm⁻¹ attribué à l'élongation C=O des amides primaires et à 1592 cm⁻¹ attribué à la déformation N-H des amides primaires – confirme la présence de la molécule ciblante **1**.

Les pics caractéristiques des molécules ciblantes **1**, **2** et **3** et ceux des courbes résultant de la soustraction des spectres IR des SRPs non fonctionnalisées aux SRPs fonctionnalisées avec les molécules dérivées de la quinoxaline correspondantes sont regroupés dans le Tableau IV.1.

Chapitre IV – Fonctionnalisation des SRPs avec des molécules dérivées de la quinoxaline pour le ciblage de la mélanine

			Molécule Ciblante 1	Soustraction [SRP- 1] - [SRP]	Molécule Ciblante 2	Soustraction [SRP- 2] - [SRP]	Molécule Ciblante 3	Soustraction [SRP- 3] - [SRP]
Groupement	Liaison	Vibration	Nombres d'onde des pics caractéristiques des spectres IR (cm ⁻¹)					
Amides secondaires	C=O	élongation					1685	1682-1635
Amides primaires	C=O	élongation	1671	1666	1670	1665	1635	1682-1635
Amides primaires	N-H	déformation	1592	1603	1592	1602	1581	1589
Amides secondaires	N-H	déformation					1521	1525
Quinoxaline	C=C	élongation	1532, 1516	1534, 1513	1550-1580	1532	1500-1590	1525, 1538
CH ₂	C-H	déformation cisaillement	1472	1474	1474	1475	1489	1493
CH ₃	C-H	déformation symétrique	1385	(1384)	1388	(1389)	1386	(1387)
Quinoxaline	C-N	élongation	1347, 1328, 1245, 1228	(1304, 1238)	1202-1354	(1357, 1326)	1212-1251	(1216)
Amines	C-N	élongation	1180, 1168, 1130, 1040	1084	1030-1230	1165, 1088	1030-1212	1133, 1087, 1075, 1042
Ethers	C-O	élongation			1127	1122	1090-1134	1133, 1087, 1075
Quinoxaline	C-H	déformation dans le plan	904, 879, 828, 793	(870, 795, 752)	700-900	(830, 795, 782, 755)	700-900	(843, 794, 753, 713)
Amines primaires	N-H	déformation torsion	904, 879, 828, 793		700-900		700-900	

Tableau IV.1. Pics caractéristiques relevés sur les spectres IR des molécules ciblantes et sur les courbes résultant de la soustraction des spectres IR des SRPs non fonctionnalisées aux SRPs fonctionnalisés avec les molécules ciblantes correspondantes.

Les pics caractéristiques des molécules ciblantes **1**, **2** et **3** sont observés sur les courbes résultant des soustractions des spectres IR des SRPs non fonctionnalisés aux SRPs fonctionnalisés avec les molécules dérivées de la quinoxaline correspondantes, ce qui garantit leur présence dans les échantillons de SRPs.

IV.3.1.2. Spectrométrie de Masse (SM)

Les études de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'ILM, au sein de l'équipe Spectrométrie des Biomolécules et Agrégats sur les SRP-**1**, en collaboration avec les Directeurs de Recherche Philippe Dugourd et Rodolphe Antoine, afin de confirmer le couplage covalent de la molécule ciblante **1** aux SRPs.

Le protocole opératoire décrit dans le Chapitre III a été conservé. Plus précisément, une solution aqueuse de SRP-**1** a été soumise à une ionisation électrospray (ESI) pour générer des ions intacts en phase gazeuse, de manière à obtenir des informations sur le rapport masse sur charge (m/Z). Les SRPs comprennent de nombreux groupements ionisés (comme les complexes [Gd^{III}(DOTA)]⁻), responsables de la distribution d'états de charge observée sur chaque spectre de masse obtenu. Un algorithme de corrélation multiplicatif a permis d'estimer la masse moyenne des SRP-**1** à partir du spectre présentant le rapport m/Z , obtenu par ESI (Figure IV.12). La distribution des SRP-**1** est partagée en deux : l'une correspondant à une masse de $9,9 \pm 0,3$ kDa, et l'autre

correspondant à une masse de $8,7 \pm 0,4$ kDa ; une distribution similaire avait d'ailleurs été observée pour les SRPs non fonctionnalisées (Lux *et al.*, 2011).

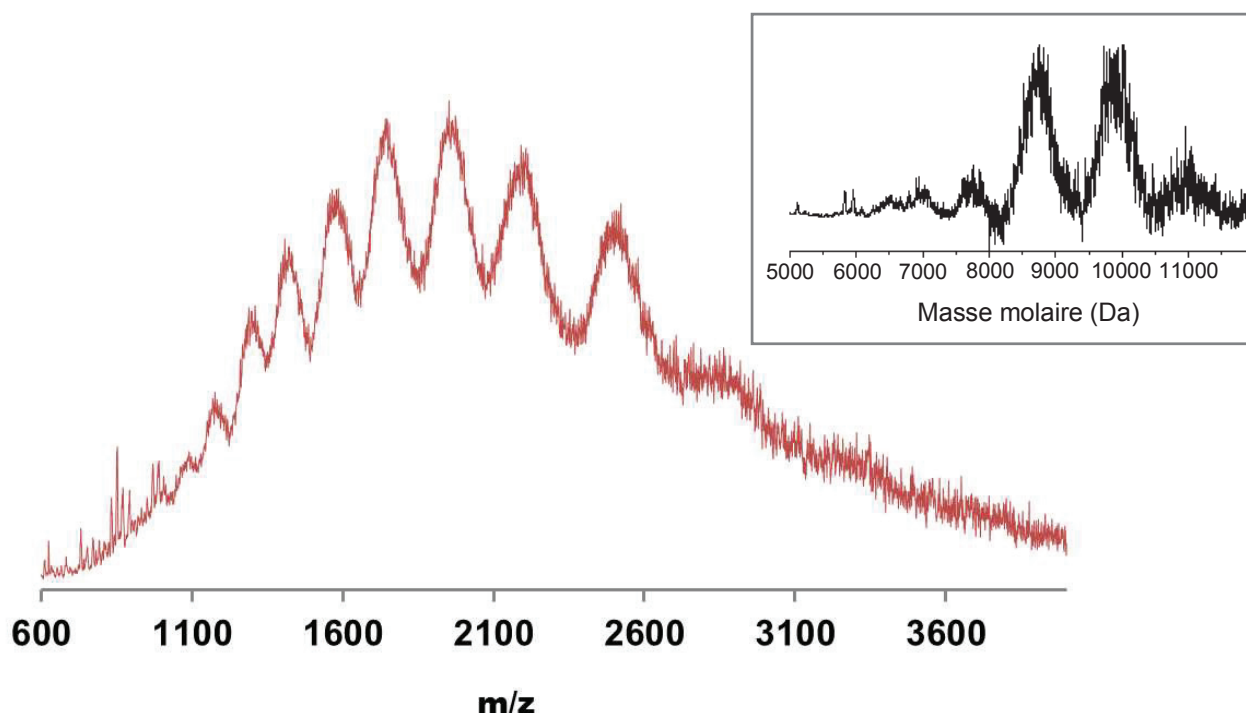


Figure IV.12. Spectre ESI des SRP-1 en mode positif. Dans l'insert : Algorithme de corrélation multiplicatif des SRP-1, déduit du spectre ESI.

Conformément aux observations faites dans le Chapitre III, plusieurs pics caractéristiques des SRPs non fonctionnalisées ont été retrouvés aux basses masses, en mode négatif (Lux *et al.*, 2011). Le pic à m/Z 749 est spécifique du fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA-Si}(\text{OH})_3)]^-$, à savoir, le complexe $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ porté par un silanetriol issu de la matrice de polysiloxane. Le pic à m/Z 630 est spécifique du fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$: il correspond au clivage de la liaison amide entre les molécules de DOTA et d'APTES du fragment précédent à m/Z 749, par la perte d'un fragment $[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OH})_3]^-$ (Harrison *et al.*, 2003). Cette rupture s'accompagne par la création d'une double liaison C=C. Aussi, le nombre de coordination de l'ion Gd^{III} variant entre 8 et 9, une molécule d'eau complète la sphère de coordination de l'ion métallique (*cf.* Chapitre III). Comme attendu, ces deux pics à m/Z 749 et m/Z 630 ont été observés à la fois pour les SRPs non fonctionnalisées et pour les SRPs fonctionnalisées avec la molécule ciblante 1.

En mode positif, la partie « basses masses » du spectre ESI est dominée par un pic à m/Z 852. Ce pic est également observé pour les deux types de nanoparticules : SRPs et SRP-1. Il est attribué au fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA-Si}(\text{OH})_2\text{-O-Si}(\text{OH})(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3)]^+$, à savoir le complexe $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ porté par deux molécules d'APTES issues de la matrice de polysiloxane (Figure IV.13). Enfin, un dernier pic à m/Z 991 a été observé uniquement sur le spectre ESI des SRP-1 en mode positif. Comme le démontre la distribution isotopique, ce pic est attribué au fragment [1-DOTA-

$\text{Si}(\text{OH})_3]^+$, à savoir la molécule ciblant **1** liée de manière covalente à une molécule de DOTA portée par un silanetriol (Figure IV.13). L'amine tertiaire de la molécule ciblant **1** est protonée et est responsable de la charge positive du fragment.

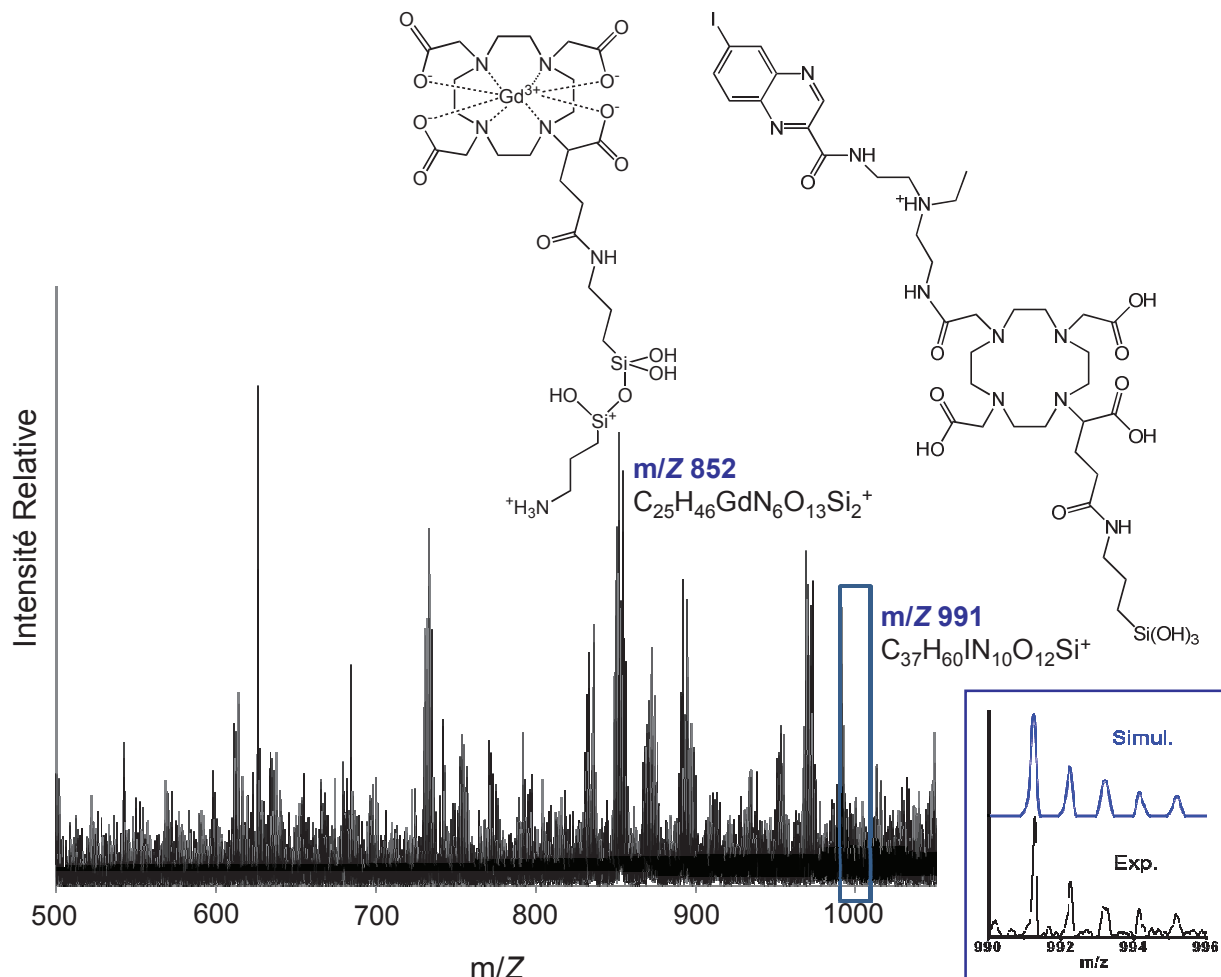


Figure IV.13. Spectre ESI des SRP-**1** aux basses masses, en mode positif. Le pic à m/Z 852 a été observé à la fois pour les SRPs et les SRP-**1**. Le pic à m/Z 991, lui, est caractéristique des SRP-**1**.

Ce fragment à m/Z 991 prouve la conjugaison covalente de la molécule ciblant **1** aux SRPs. De plus, l'absence d'ion Gd^{III} au sein du fragment démontre que le greffage des molécules a lieu en priorité sur les ligands DOTA vacants.

IV.3.2. Estimation du taux de greffage des molécules ciblant **1**, **2** et **3**, dérivées de la quinoxaline, aux SRPs

La spectroscopie infrarouge a démontré la présence des molécules ciblant **1**, **2** et **3** dans les échantillons de SRP-**1**, **2** et **3**, respectivement, tandis que la spectrométrie de masse a mis en évidence le couplage covalent de la molécule ciblant **1** aux SRPs. Cependant, ces deux techniques ne permettent pas de quantifier le nombre de molécules ciblant par SRP. Afin d'estimer le

rendement de greffage, 2 techniques quantitatives ont été utilisées : la spectrophotométrie d'absorption UV-visible et l'analyse élémentaire.

IV.3.2.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline en solution aqueuse présentent chacun 2 bandes intenses dans la région UV ($\lambda = 256$ et 342 nm pour les molécules ciblantes **1** et **2**, $\lambda = 272$ et 373 nm pour la molécule ciblante **3**), attribuées aux transitions de spin autorisées $\pi - \pi^*$ des cycles aromatiques de la quinoxaline (Hwang *et al.*, 2005) (pour la molécule ciblante **1** : $\epsilon_{256 \text{ nm}} \sim 30\,640 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{342 \text{ nm}} \sim 10\,900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Les spectres d'absorption UV-visible des SRPs non fonctionnalisés et des SRPs fonctionnalisés avec les molécules ciblantes **1**, **2** et **3** sont reportés en Figure IV.14.

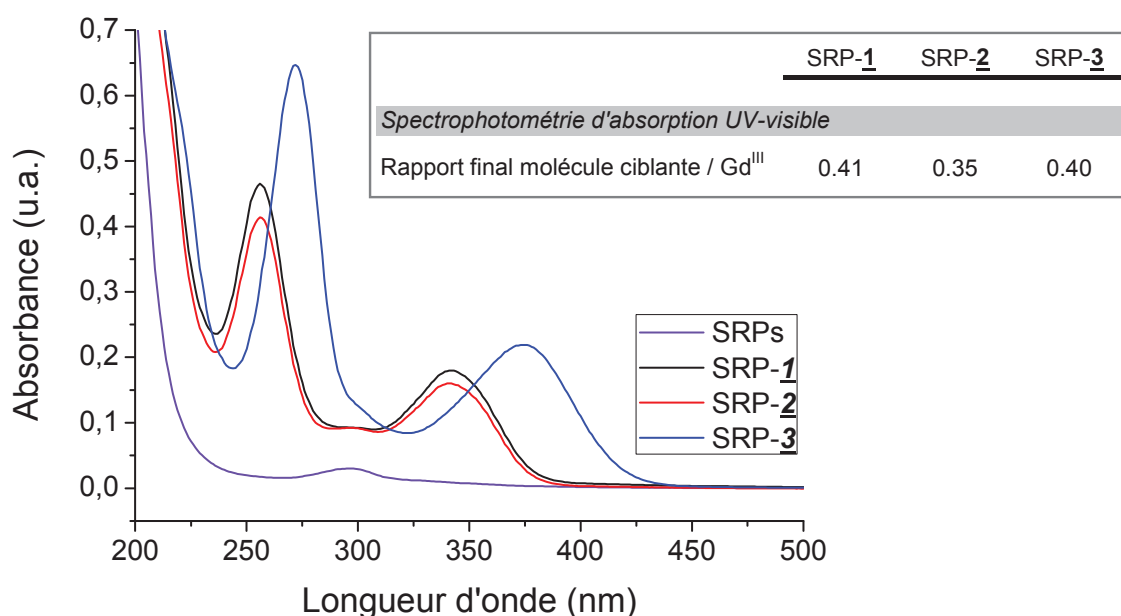


Figure IV.14. Spectres d'absorption UV-visible des SRPs, SRP-**1**, SRP-**2**, SRP-**3** ($[\text{Gd}^{\text{III}}] = 50 \mu\text{M}$, mesurée par relaxométrie et ICP-OES). Dans l'insert : Rapports du nombre de molécules ciblantes par ion Gd^{III} en fin de synthèse, déduits depuis les spectres d'absorption UV-visible avant et après purification des nanoparticules.

Les bandes intenses caractéristiques des molécules ciblantes ont été observées, ainsi que la légère contribution due aux SRPs, à 295 nm . Ces spectres d'absorption UV-visible ont été comparés avant et après purification pour le calcul des rendements de greffage et du nombre final de molécules ciblantes par ion Gd^{III} , en partant de l'hypothèse que le couplage peptidique de la molécule ciblante sur les SRPs n'a pas d'influence notable sur le coefficient d'extinction molaire des molécules ciblantes. Les SRP-**1** et **3** présentent $0,40$ - $0,41$ molécules ciblantes par ion Gd^{III} ; ce rapport est légèrement inférieur pour les SRP-**2** ($0,35$) ; ces chiffres correspondent à une moyenne effectuée sur les résultats obtenus à partir des 2 bandes d'absorption UV.

IV.3.2.2. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont également permis d'évaluer le taux de greffage des molécules ciblantes aux SRPs. Les pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire sont regroupés dans le Tableau IV.2. Les rapports molaires déduits de ces pourcentages massiques sont rapportés dans le Tableau IV.3.

Comme énoncé au Chapitre III, deux hypothèses ont été faites pour estimer la composition chimique de chacun des échantillons contenant les SRPs :

- chaque SRP possède 10 ± 1 molécules de DOTA ;
- le rapport molaire APTES/TEOS de la matrice de polysiloxane reste constant pendant les différentes étapes de synthèse et de purification (0,6 APTES / 0,4 TEOS).

En considérant ces hypothèses et les rapports molaires – à savoir Si/Gd, C/Gd, N/Gd et I/Gd – une formule brute approximative est déduite par une méthode empirique. Comme seuls les pourcentages massiques des atomes de Gd, Si, C, N et I ont été mesurés, il convenait de prendre en compte dans nos calculs les atomes différents de ceux-ci, susceptibles d'être contenus dans les échantillons. Par exemple, les molécules d'eau ont dû être prises en compte, tout comme les molécules de solvant. En effet, les SRPs initiales ayant été synthétisées dans du diéthylène glycol (DEG), une présence résiduelle de solvant au sein de la matrice de polysiloxane est envisagée.

Les formules brutes indiquées dans le Tableau IV.4 sont approximatives. Le nombre de molécules d'eau a été estimé à titre indicatif et ces molécules d'eau pourraient d'ailleurs être remplacées par des contre-ions, comme Na^+ , OH^- , etc., par exemple. Ces formules brutes ont été déduites avec une erreur absolue inférieure à 0,6% par rapport aux pourcentages massiques fournis dans le Tableau IV.2.

	SRPs			SRP- <u>1</u>			SRP- <u>2</u>			SRP- <u>3</u>		
<i>Analyses Élémentaires - (Pourcentages massiques)</i>												
	Exp.	Theo.	Err.	Exp.	Theo.	Err.	Exp.	Theo.	Err.	Exp.	Theo.	Err.
%Gd	9.96	9.96	0	8.23	8.20	0.03	8.37	8.29	0.08	8.67	8.13	0.54
%Si	9.18	9.18	0	8.42	8.39	0.03	8.53	8.45	0.08	9.78	9.17	0.61
%N	8.55	8.66	0.11	8.76	9.08	0.32	9.31	9.38	0.07	8.05	8.68	0.63
%C	31.65	31.16	0.49	32.06	31.62	0.44	32.97	32.78	0.19	29.85	29.76	0.09
%I	/	/	/	2.96	2.92	0.04	2.58	2.65	0.07	/	/	/

Tableau IV.2. Analyses élémentaires (en pourcentages massiques). Pour chaque échantillon, les données expérimentales (1^{ère} colonne) sont fournies par le Service Central d'Analyses (SCA) de Solaize, du CNRS. Les pourcentages massiques théoriques (2^{ème} colonne) correspondent aux pourcentages massiques déduits des formules brutes estimées présentées dans le Tableau IV.4. Les écarts absolus entre les données expérimentales et théoriques sont indiqués dans la 3^{ème} colonne.

	SRPs	SRP- <u>1</u>	SRP- <u>2</u>	SRP- <u>3</u>
Analyses Élémentaires - Rapports molaires				
Si/Gd	5.16	5.51	5.71	6.32
N/Gd	9.64	11.96	12.49	10.43
C/Gd	41.64	51.05	51.62	45.12
I/Gd	/	0.45	0.38	/

Tableau IV.3. Rapports molaires déduits des pourcentages massiques fournis par le SCA de Solaize.

	SRPs	SRP- <u>1</u>	SRP- <u>2</u>	SRP- <u>3</u>
Analyses Élémentaires - Formules brutes				
<i>Nombre d'atomes/molécules de par SRP</i>				
Gd	6	5.9	5.8	6.1
DOTA	10	10	10	9
APTES / TEOS	18.6 / 12.4	20.3 / 13.5	19.9 / 13.2	23.1 / 15.4
Molécules ciblantes	/	2.6	2.3	2
H ₂ O (ou contre-ions)	65	85	70	120
DEG	0	2	0	2

Tableau IV.4. Formules brutes estimées pour chacun des échantillons et déduites des pourcentages massiques fournis par le SCA de Solaize.

Par analyse élémentaire, le nombre de molécules ciblantes par SRP est estimé à 2,6 pour les SRP-1, à 2,3 pour les SRP-2 et à 2 pour les SRP-3.

IV.3.2.3. Récapitulatif des 2 techniques ayant permis l'estimation de la quantité de molécules ciblantes par SRP

En multipliant les rapports molaires molécule ciblante/Gd^{III} obtenus par spectrophotométrie d'absorption UV-visible par le nombre d'ions Gd^{III} estimés par analyse élémentaire, nous obtenons un nombre de molécules ciblantes par SRP. Les résultats sont regroupés dans le Tableau IV.5.

	SRP- <u>1</u>	SRP- <u>2</u>	SRP- <u>3</u>
Analyse élémentaire			
Nombre d'ions Gd ^{III} par SRP	5,9	5,8	6,1
Nombre de molécules ciblantes par SRP	2,6	2,3	2
Spectrophotométrie d'absorption UV-visible			
Nombre de molécules ciblantes par SRP	2,4	2	2,4
Moyenne	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2

Tableau IV.5. Quantités de molécules ciblantes par SRP obtenues par analyse élémentaire et spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

Les quantités de molécules ciblantes par SRP calculées à partir des données obtenues par analyse élémentaire et spectrophotométrie d'absorption UV-visible sont concordantes. Les SRP-1

présentent environ 2,5 molécules ciblantes par SRP tandis que les SRP-2 et 3 en présentent autour de 2,2.

IV.4. Conclusion

Le mélanome malin est un cancer agressif répandu : il est l'un des plus difficiles à traiter. Ce constat justifie de nombreuses recherches afin d'améliorer le diagnostic et la thérapie des patients atteints de mélanome métastatique. Dans cette optique, 3 molécules dérivées de la quinoxaline ont été synthétisées puis greffées de manière covalente aux SRPs, conférant ainsi aux SRPs des propriétés de ciblage actif de la mélanine et par conséquent, du mélanome.

Dans un premier temps, le greffage covalent des molécules ciblantes aux SRPs a été validé par des techniques de caractérisation telles que la relaxométrie, la PCS (Photon Correlation Spectroscopy), la mesure du potentiel ζ , la spectroscopie infrarouge et la spectrométrie de masse. Une deuxième série de méthodes de caractérisation – à savoir : la spectrophotométrie d'absorption UV-visible et les analyses élémentaires – a ensuite permis d'estimer la quantité de molécules ciblantes par nanoparticule. Les SRPs fonctionnalisées présentent plus de 2 molécules ciblantes dérivées de la quinoxaline par nanoparticule et sont des candidates prometteuses pour le ciblage de la mélanine.

Le ciblage des SRPs fonctionnalisées avec ces molécules ciblantes sur la mélanine a d'ailleurs été mis en évidence par la technologie BIAcore®, un système conventionnel utilisant le phénomène de résonance plasmonique de surface. Les SRP-1, 2 et 3 ont démontré une forte affinité pour la mélanine synthétique, par comparaison aux SRPs non fonctionnalisées. Le ciblage de la mélanine est dû à une forte interaction ionique, renforcée par une interaction hydrophobe plus faible, mais plus stable. Comparées aux SRP-2 et 3, dont les molécules ciblantes sont équipées d'un bras pegylé, les SRP-1 ont montré les meilleurs résultats pour le ciblage de la mélanine. Ce ciblage actif, combiné à la capacité des SRPs à être détectées par 4 techniques d'imagerie médicale complémentaires (IRM, TEMP, tomographie par émission de positrons et imagerie de fluorescence) et à présenter des propriétés radiosensibilisantes, est prometteur pour de futures études visant à rendre le diagnostic plus précoce et plus précis et à améliorer les effets du traitement de mélanomes exprimant la mélanine de manière extracellulaire par radiothérapie.

Chapitre V

*Fonctionnalisation des SRPs avec un
aminopropylpyridinium pour le ciblage
des protéoglycanes*

V. Fonctionnalisation des SRPs avec un aminopropylpyridinium pour le ciblage des protéoglycanes

V.1. INTRODUCTION	232
V.1.1. CARTILAGE : STRUCTURE ET COMPOSITION	232
V.1.2. EXPLOITATION DE L’AFFINITE AMMONIUMS QUATERNAIRES / PROTEOGLYCANES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DU CHONDROSARCOME	234
V.2. ARTICLE	235
V.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	239
V.3.1. VALIDATION DU GREFFAGE DU 1-(3-AMINOPROPYL)PYRIDINIUM AUX SRPs	239
V.3.1.1. PCS (PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY) ET POTENTIEL Z	239
V.3.1.2. SPECTROMETRIE DE MASSE (SM)	240
V.3.1.3. RELAXOMETRIE	242
V.3.2. ESTIMATION DU TAUX DE GREFFAGE DU 1-(3-AMINOPROPYL)PYRIDINIUM AUX SRPs	243
V.3.2.1. SPECTROPHOTOMETRIE D’ABSORPTION UV-VISIBLE	244
V.3.2.2. ANALYSE ELEMENTAIRE	244
V.3.2.3. RECAPITULATIF DES 2 TECHNIQUES AYANT PERMIS L’ESTIMATION DE LA QUANTITE DE VECTEURS PAR SRP	245
V.3.3. ETUDES IN VIVO MENEES DANS LE CADRE DU PROJET LANTHARAD (RESULTATS CONFIDENTIELS)	246
V.3.3.1. ETUDES DE BIODISTRIBUTION DES SRP@QA PAR IMAGERIE TEMP	247
V.3.3.2. ETUDES DE RADIOSENSIBILISATION DU CHONDROSARCOME PAR LES SRP@QA	249
V.4. CONCLUSION	252
CONCLUSION	257
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	263

V.1. Introduction

Les chondrosarcomes comptent parmi les trois cancers des os les plus courants (Gelderblom *et al.*, 2008) ; ils représentent 25% des cas de cancers des os (Peyrode *et al.*, 2012 ; Peyrode *et al.*, 2011). Ces tumeurs chondrogénétiques croissent lentement (faible portion de cellules en division) et métastasent rarement. Elles sont relativement résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie, rendant la chirurgie le meilleur traitement à chaque fois qu'elle est possible. Avec un diagnostic optimal et un traitement chirurgical adéquat, les chondrosarcomes obtiennent de bons pronostics. Cependant, lorsque le cancer persiste, le chondrosarcome atteint un stade histologique supérieur et augmente les risques de métastases et de décès. Par conséquent, il existe un réel besoin d'éviter ces récurrences et de proposer de meilleures options de traitement afin de guérir les tumeurs non opérables et les cancers métastatiques (Gelderblom *et al.*, 2008).

V.1.1. Cartilage : structure et composition

Les chondrosarcomes sont caractérisés par la production d'une matrice extracellulaire proche de celle du cartilage (Miot-Noirault *et al.*, 2009). Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire dépourvu de fibres nerveuses, associant rigidité et souplesse. Il est composé de chondrocytes et de matrice extracellulaire, sécrétée par les chondrocytes (Chen *et al.*, 2006). Cette matrice extracellulaire, qui représente 95 % du cartilage, est formée de fibres de collagène (collagène de type II) et d'une substance fondamentale sous forme de gelée amorphe permettant la diffusion de l'oxygène et des molécules dissoutes dans l'eau. Cette substance contient des protéoglycanes (PGs) libres, des glycoprotéines libres, des macromolécules géantes et des protéines de liaison (Mackie *et al.*, 2011) (Figure V.1).

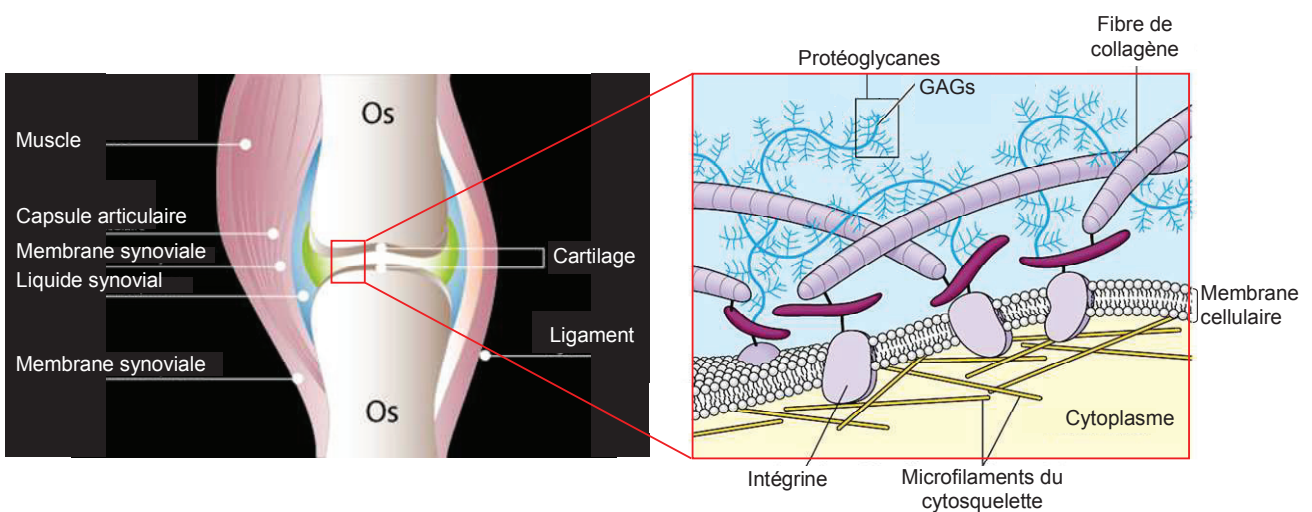


Figure V.1. Représentation de la matrice extracellulaire du cartilage artériel. Adaptée de Inserm

Le mot « protéoglycane » (PG) est la contraction des mots « protéine » et « glycosaminoglycane » (GAG). Les GAGs sont des polysaccharides à longue chaîne linéaire (non ramifiée) constitués d'unités disaccharides répétées. Le motif disaccharide est toujours composé d'une hexosamine, à savoir la glucosamine (GlcN) ou la galactosamine (GalN), et d'un autre ose, comme l'acide glucuronique (GlcA), l'acide iduronique (IdoA) ou le galactose (Gal). Les GAGs comprennent : la chondroïtine-sulfate, la dermatane-sulfate, la kératane-sulfate, l'héparine (ou héparane-sulfate) et l'acide hyaluronique. C'est d'ailleurs l'acide hyaluronique, seul GAG non O-sulfaté, qui est à l'origine de l'élasticité du cartilage, lui permettant alors d'amortir les forces mécaniques. C'est aussi le seul qui n'est pas fixé à une protéine centrale.

Lorsque ces chaînes GAGs sont liées de manière covalente à une protéine, elles forment des protéoglycane. Les PGs se caractérisent par leur forme de « brosse à cheveux » : ils sont constitués d'une protéine centrale (partie centrale de la brosse) et de plusieurs GAGs attachés à cette protéine (représentés par les poils de la brosse). Les GAGs des PGs sont composés d'une centaine d'unités disaccharide répétées et sont principalement la chondroïtine-sulfate et la kératane-sulfate (Figure V.2).

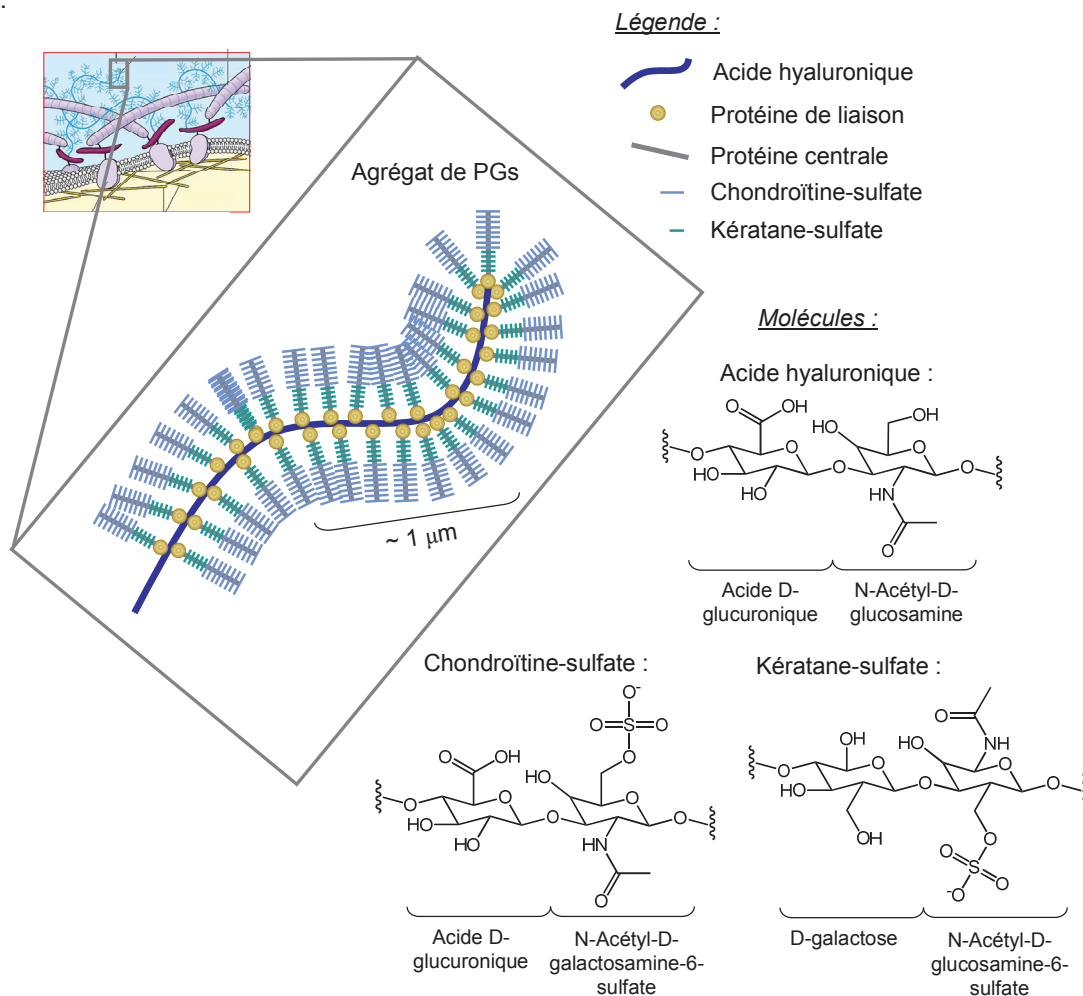


Figure V.2. Représentation d'un agrégat de protéoglycane et des GAGs entrant dans la composition de la matrice extracellulaire du cartilage.

Ce sont les GAGs disposés de part et d'autre de la protéine centrale qui permettent aux PGs d'absorber l'eau comme une éponge. Cette propriété spécifique confère au cartilage un aspect mou et glissant.

V.1.2. Exploitation de l'affinité ammoniums quaternaires / protéoglycanes pour le diagnostic et le traitement du chondrosarcome

La matrice extracellulaire des chondrosarcomes étant proche de celle du cartilage, les PGs apparaissent comme une cible de choix pour la détection et le traitement d'affections dégénératives, inflammatoires ou malignes du cartilage (Miot-Noirault *et al.*, 2012 ; Cachin *et al.*, 2011 ; Peyrode *et al.*, 2011). Les charges négatives abondantes dues à la forte concentration de groupements sulfates et carboxylates contenues par les GAGs des PGs sont susceptibles d'interagir avec des fonctions chargées positivement, comme les ammoniums quaternaires (QAs) (Miot-Noirault *et al.*, 2012 ; Peyrode *et al.*, 2012).

Des études antérieures ont d'ailleurs démontré l'existence d'une forte affinité de deux QAs pour les PGs : le pyridinium et le triéthylammonium (Figure V.3) (Giraud *et al.*, 2000 ; Maurizis *et al.*, 2000).

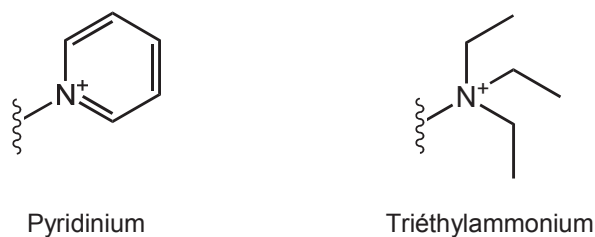


Figure V.3. Représentation des QAs ciblant les PGs.

Il a également été prouvé que la nature du QA n'influçait pas le ciblage des PGs : aucune différence significative d'affinité pour les tissus cartilagineux n'a été notée entre l'ammonium aromatique et l'ammonium aliphatique (Giraud *et al.*, 2000 ; Maurizis *et al.*, 2000). Nous avons alors opté pour le pyridinium, plus facile et plus rapide à caractériser que son analogue aliphatique.

Le greffage aux SRPs est réalisé avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium (Figure V.4), qui présente une fonction amine primaire, disponible pour le couplage peptidique avec les groupements carboxylates des molécules de DOTA des SRPs.

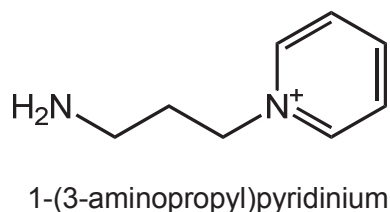


Figure V.4. Représentation du pyridinium équipé d'une fonction amine primaire facilitant le couplage peptidique aux groupements carboxylates des molécules de DOTA des SRPs.

Le 1-(3-aminopropyl)pyridinium a été synthétisé par le Pr. J.M. Chezal, au sein de l'unité « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée » de l'INSERM de Clermont-Ferrand. Les SRPs vectorisées par le 1-(3-aminopropyl)pyridinium sont abrégées SRP@QA.

V.2. Article

Nos travaux sur la fonctionnalisation des SRPs avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium font l'objet de l'article ci-après, accepté par la revue *Chemical Communications*.

In vivo evidence of the targeting of cartilaginous tissue by pyridinium functionalized nanoparticles†

Cite this: DOI: 10.1039/c3cc39106j

Received 20th December 2012,
Accepted 19th February 2013

DOI: 10.1039/c3cc39106j

www.rsc.org/chemcomm

Jessica Morlieras,^a Jean-Michel Chezal,^{bcd} Elizabeth Miot-Noirault,^{bcd} Aurélien Vidal,^{bcd} Sophie Besse,^{bcd} David Kryza,^{ae} Charles Truillet,^a Anna Mignot,^{afg} Rodolphe Antoine,^h Philippe Dugourd,^h Françoise Redini,ⁱ Lucie Sancey,^a François Lux,^{*a} Pascal Perriat,^a Marc Janier^{ae} and Olivier Tillement^a

Ultrasmall gadolinium based particles have been functionalized with positively charged pyridinium quaternary ammonium and labelled with ¹¹¹In. Evidence of their active targeting properties towards proteoglycans has been demonstrated *in vivo* after intravenous injection into rats opening thus a route to cancer imaging and therapy.

The growing development of multimodal devices for biomedical applications has led to the concept of theranostic objects. Nanoparticles, which are able to gather in a single object imaging and therapeutic functionalities,^{1,2} are particularly adapted for theranostic applications because of their advantages in comparison with molecular strategies: (i) multifunctionality, (ii) enhancement of imaging properties (by the increase of the number of active sites per object and/or in the case of gadolinium for MRI by an augmentation of the relaxivity per site due to the diminution of the rotational correlation time),^{3,4} and (iii) emergence of new properties at the “nano-scale”.⁵

We have recently developed a new type of Small Rigid Platform (SRP) for multimodal imaging⁶ and radiosensitization.⁷ These ultrasmall nanoparticles (size inferior to 5 nm for renal elimination) are composed of a polysiloxane network surrounded by DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) derivatives chelating gadolinium for magnetic resonance imaging and/or radioactive isotopes for scintigraphy. The DOTA derivatives

are produced from the grafting of DOTAGA anhydride (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid) on the surface thanks to a peptide bond. DOTAGA has been chosen over classical DOTA because it possesses still eight “free” coordination sites after the grafting on the surface for the safe chelation of gadolinium. Due to their small size, the SRPs are eliminated by the kidneys after intravenous injection into rodents. Despite their small size, the nanoparticles present also an effective passive accumulation in tumours due to the well-known enhanced permeability and retention (EPR) effect.⁷

In this communication, we will now focus on the active targeting of these particles on proteoglycans (PG). PGs are macromolecules composed of a specific core protein substituted by covalently linked glycosaminoglycan (GAG) chains.⁸ They exhibit numerous biological functions and act as structural components in tissue organization. They also affect several parameters such as cell proliferation, adhesion, migration and differentiation.⁹ Indeed, all cellular processes that involve molecular interactions at the cell surface, such as cell-matrix, cell-cell and ligand-receptor interactions, likely involve PGs, which are then essential for most normal and aberrant cellular and tissular functions.

Recently PG expression was demonstrated to be markedly increased in the tumour microenvironment.¹⁰ PGs are then one of the key players in tumoural progression, suggesting their significance as potential targets for cancer imaging and treatment.¹¹ Positively charged quaternary ammonium (QA) functions have been demonstrated by authors to interact with the strong negative charge borne by the high content of sulphate and carboxylate groups in the GAG moieties of PG.¹¹ As a consequence, we hypothesized that quaternary ammonium functions could act as PG-targeting agents when grafted to SRPs in order to elaborate functionalized nanoparticles for theranostic purposes. In this communication, we will evaluate the targeting efficiency of such particles towards PGs using cartilage as the target in *in vivo* experiments. Indeed PGs have been particularly well studied in the context of cartilage where the extracellular matrix constitutes more than 90% of the dry weight of the tissue.

The aromatic QAs were covalently linked to the carboxylic acid functions stemming from the DOTA molecules using standard

^a Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France. E-mail: francois.lux@univ-lyon1.fr; Tel: +33 472431200

^b INSERM UMR 990 – BP 184, Clermont-Ferrand, 63005 Cedex, France

^c Clermont Université, UMR 990 – Université d'Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^d Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France

^e Hôpitaux de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire et Service de médecine nucléaire, 69437 Lyon, France

^f Matériaux, Ingénierie et Sciences, INSA Lyon, UMR 5510 CNRS – Université de Lyon, 69621 Villeurbanne Cedex, France

^g Nano-H SAS, 38070 Saint-Quentin Fallavier, France

^h Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, UMR 5579 CNRS – Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France

ⁱ UMR S 957 INSERM/Nantes, Atlantique Université, 44000 Nantes cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3cc39106j

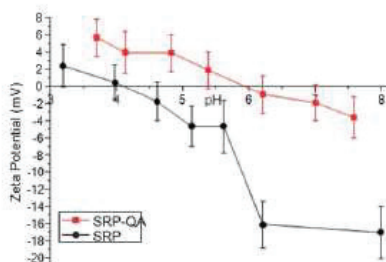


Fig. 1 ζ -Potentials of SRPs and SRPs@QA.

carbodiimide chemistry (see ESI[†]). Complementary characterizations have evidenced the efficiency of the grafting on DOTA molecules that are not chelating gadolinium ions. First, after purification by tangential filtration on 5 kDa membranes, an increase in hydrodynamic diameter was measured using Photon Correlation Spectroscopy (from 2.2 nm (mean standard deviation 1.1 nm) for SRPs to 5.7 nm (m.s.d. 1.6 nm) for functionalized SRPs: SRPs@QA). Second, ζ -potentials of SRPs and SRPs@QA were compared at different pH values. As expected, SRPs@QA displayed a higher surface charge compared to SRPs, due to the addition of positively charged QA (see Fig. 1). Third, a small increase in longitudinal relaxivity (r_1) is observed after coupling in agreement with a mass augmentation of the particles⁴ (from 11.2 mM⁻¹ s⁻¹ for SRPs to 12.2 mM⁻¹ s⁻¹ for SRPs@QA).

The covalent conjugation of the QAs to SRPs was also confirmed by mass spectrometry (MS). In a first step, the particles were subjected to Electrospray Ionization (ESI) to generate intact ions and obtain charge and mass information. The ESI spectrum of SRPs@QA (see ESI[†]) was treated according to a multiplicative correlation algorithm (MCA)¹² to estimate the mass of the SRPs. The mass distribution of SRPs@QA was divided into two parts: one at 8.6 kDa \pm 0.2 kDa and another one at 9.7 kDa \pm 0.2 kDa in good agreement with that of initial SRPs⁶ (8.5 \pm 0.3 kDa and 9.7 \pm 0.5 kDa).

At low masses, in the negative mode, the three m/z 749, m/z 594 and m/z 630 peaks already observed in earlier ESI-MS studies⁶ are, respectively, assigned to [Gd(DOTA-Si(OH)₃)]⁻, (DOTA-Si(OH)₃)⁻ and [Gd(DOTA)(H₂O)]⁻ fragments (see ESI[†]). In the positive mode, two peaks are observed at m/z 596 and m/z 714. The m/z 596 peak that is the positive analogue of the m/z 594 peak in the negative mode is attributed to the (DOTA-Si(OH)₃)⁺ fragment. In contrast, the major peak at m/z 714 is specific to functionalized SRPs. As evidenced by the isotopic distribution, this peak must be attributed to the [QA-DOTA-Si(OH)₃]⁺ fragment, *i.e.* the QA conjugated to the DOTA ligand borne by a silanetriol (of the polysiloxane network). The positive charge of the whole fragment came from the pyridinium moiety. This m/z 714 fragment evidences the covalent conjugation of the QA to SRPs. Moreover, the absence of Gd(III) ions within the QA-DOTA conjugate shows that the conjugation of the NH₂-ended pyridinium can be performed *via* one of the carboxylic acids arising from a "free" DOTA only.

The number of QAs at the surface of the nanoparticles was determined using two different methods: UV-Vis absorption and elemental analysis. The QA amount is reported as a ratio to the number of Gd ions (and finally to that of SRPs) quantified,

Table 1 Elemental analysis: estimated molecular formulas of SRPs and SRPs@QA, considering the mentioned hypotheses (10 \pm 1 DOTA per SRP and the APTES-TEOS molar ratio remains equal to 0.6 during any synthesis step or purification step). UV-visible absorption: QA-Gd molar ratio deduced from UV-visible absorption spectra and QA-SRP ratio deduced from QA-Gd molar ratio and considering the number of gadolinium atoms per SRP provided by elemental analysis

	SRPs	SRPs@QA
Elemental analysis		
Number of atoms (/molecules) per SRP		
Gd	7	7.5
DOTA	10	10
APTES/TEOS	15.3/10.2	20.0/13.3
QA	/	2
H ₂ O (or counterions)	60	32
UV-visible absorption		
Final QA-Gd ratio	/	0.32
Final QA-SRP ratio	/	2.4

in both methods, by elemental analysis only. The UV-visible absorption spectrum of the QA showed one specific peak in the UV region at 259 nm (see ESI[†]) assigned to the π - π^* transitions of the pyridinium moiety¹³ whereas particles are characterized by a specific peak at 295 nm. The observation of both peaks for a purified solution of SRPs@QA shows again the efficiency of QA grafting (see ESI[†]) and permits us to obtain the quantity of QAs by simply subtracting the spectrum of SRPs from that of SRPs@QA. The molar QA-Gd ratio is equal to 0.32 which corresponds to 2 QAs per SRP (Table 1).

When using elemental analyses to determine the amount of QAs per particle two major hypotheses were made on the SRP chemical compositions: (i) each functionalized SRP displays 10 \pm 1 DOTA molecules (as the initial SRPs) and (ii) the APTES-TEOS molar ratio of the polysiloxane network (0.6/0.4) remains constant during synthesis and purification steps.⁶ The number of QAs determined by this technique is in good agreement with the values provided by UV-Visible absorption and leads to an average number of 2.2 QAs per SRP (see Table 1).

Then the SRPs@QA as well as the SRPs for control were radiolabelled with ¹¹¹In (see ESI[†]) and intravenously injected into healthy rats. Euthanasia was performed 1 hour and 3 hours after injection (4 animals per group) and SPECT of the whole dissected posterior leg was performed.

After scintigraphic acquisition, posterior paws were dissected, the tibial plateau and leg muscle removed, and their radioactivity counted. All measured activities were corrected for radioactive decay, normalized to sample weight and tibial plateau to muscle ratios determined: as presented in Fig. 2, as early as 1 h after injection, tibial plateau to muscle ratios were significantly increased ($p = 0.041$; Student's *t* test) in SRPs@QA administered animals relative to those of SRP injected animals, with values of 2.4 \pm 0.4 and 1.6 \pm 0.5 respectively.

At 3 h after injection, the ratios reached mean values of 3.6 \pm 1.5 and 2.10 \pm 1.3 for SRPs@QA and SRPs respectively: although the difference was not statistically significant at 3 h pi ($p = 0.17$), the tendency of increased tibial plateau to muscle ratios was still maintained for SRP@QA relative to SRPs.

As illustrated in Fig. 3 for representative animals, such a difference in joint accumulation between SRPs@QA and SRPs

ChemComm

Communication

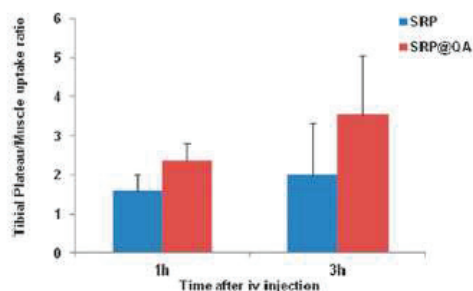


Fig. 2 Tibial plateau-muscle uptake ratios determined from radioactivity counting of samples at 1 hour and 3 hours after iv injection of SRPs and SRPs@QA ($n = 4$ animals for each group; 10 MBq per animal).

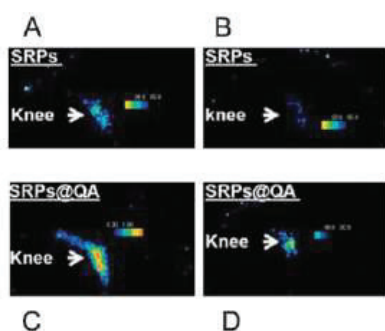


Fig. 3 *Ex vivo* scintigraphic imaging of the posterior paw of rats at 1 hour (left side) and 3 hours (right side) after injection of SRPs (A, B) and SRPs@QA (C, D), with images being normalized to the maximum uptake pixel value, using the same color scaling.

could be visualized in *ex vivo* scintigraphic images of the paw. In order to precisely localize the site of radioactivity uptake within the femorotibial joint after iv administration of SRPs@QA, scintigraphic acquisition of the dissected joint was performed: As illustrated in Fig. 4, radioactivity uptake could be clearly localized within the femoral condyle and tibial plateau of the knee, which are the cartilaginous tissues in the joint.

In addition, it is also noticeable that some of the fundamental *in vivo* properties of SRPs are preserved upon labelling; SRPs@QA are almost exclusively eliminated by the kidneys and present only a very limited uptake in all the other organs (data not shown here).

The purpose of this experimental study was to assess the ability of SRPs@QA to selectively bind to proteoglycans which are present in cartilage. This hypothesis was based on previous studies^{14,15} demonstrating that a pyridinium moiety was likely to target PGs *via* an electrostatic interaction between the positively charged QA functions and the negatively charged sulphate and carboxyl groups contained in PGs. The 1-(3-aminopropyl)pyridinium salt was successfully synthesized and its covalent conjugation to SRPs was evidenced and quantified by complementary techniques. The specificity of SRPs@QA towards PGs was first highlighted by their ability to successfully image cartilaginous tissue. It was also demonstrated using SPECT and gamma counting owing to their comparatively strong accumulation in PG-rich tissues. The affinity of these

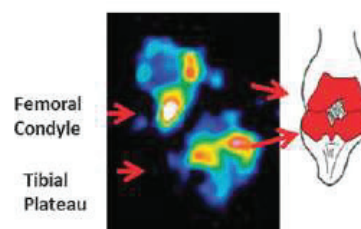


Fig. 4 Localization of radioactivity accumulation within the knee after iv administration of SRPs@QA (delay: 1 h post injection). Imaging of joint presented in Fig. 3C after dissection: radioactivity could be clearly localized within the femoral condyle and tibial plateau of the knee.

particles for PGs is really encouraging because chondrosarcomas (among the three most common malignancies of bone) are known to produce a cartilage like extracellular matrix containing collagen and PGs.

All animal procedures were approved by the CEMEA Auvergne. Protocols were performed under the authorization of the French Directorate of Veterinary Services (authorization C63-113-10) and were conducted under the supervision of authorized investigators in accordance with the institution's recommendations for the use of laboratory animals. The animals were maintained under standard environmental conditions (temperature, humidity, 12 h/12 h light-dark cycle, with water and food *ad libitum*).

This work was supported by the Cancerpole Lyon Auvergne Rhône-Alpes for the proof of concept project LANTHARAD. We thank also the Clermont Co. and the General Council of Puy-de-Dôme for their financial support.

Notes and references

- 1 K. Y. Choi, G. Liu, S. Lee and X. Chen, *Nanoscale*, 2012, **4**, 330.
- 2 S. S. Kelkar and T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1879.
- 3 P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 512.
- 4 J. S. Ananta, B. Godin, R. Sehti, L. Moriggi, X. Liu, R. E. Serda, R. Krishnamurthy, R. Muthupillai, R. D. Bolskar, L. Helm, M. Ferrari, L. J. Wilson and P. Decuzzi, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 815.
- 5 J. Xie, S. Lee and X. Chen, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, **62**, 1064.
- 6 F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Josserand, J.-L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 12299.
- 7 A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter, O. Stephan, R. Antoine, P. Dugourd, D. Luneau, G. Novitchi, L. C. Figueiredo, P. C. de Morais, L. Bonneviot, B. Albela, F. Ribot, L. Van Lokeren, I. Dechamps-Olivier, F. Chuburu, G. Lemerrier, C. Villiers, P. N. Marche, G. le Duc, S. Roux, O. Tillement, P. Perriat, *under review*.
- 8 D. Heinegard, *Int. J. Exp. Pathol.*, 2009, **19**, 575.
- 9 L. Schaefer and R. M. Schaefer, *Cell Tissue Res.*, 2010.
- 10 A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, G. N. Tzanakakis and N. K. Karamanos, *FEBS J.*, 2010, **277**, 3904.
- 11 E. Mior-Noirault, A. Vidal, P. Auzeloux, C. Peyrode, J. C. Madelmont and J.-M. Chezal, *Methods Mol. Biol.*, 2012, **836**, 183.
- 12 J. J. Hagen and C. A. Monning, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1877.
- 13 C. Lincheneau, J. P. Leonard, T. MvCabe and T. Gunnlaugsson, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7119.
- 14 I. Giraud, M. Rapp, J. C. Maurizis and J. C. Madelmont, *Bioconjugate Chem.*, 2000, **11**, 212.
- 15 J. C. Maurizis, M. Rapp, C. Nicolas, M. Ollier, M. Verny and J. C. Madelmont, *Drug Metab. Dispos.*, 2000, **28**, 418.

V.3. Résultats complémentaires

L'article ci-dessus décrit les stratégies mises en place pour le greffage du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs, la caractérisation du greffage et l'observation *in vivo* du ciblage des SRPs vectorisées sur les protéoglycanes sur animaux sains.

Comme détaillé dans l'article, l'ammonium quaternaire est greffé aux acides carboxyliques des molécules de DOTA vacantes, c'est-à-dire non engagées dans la complexation d'un ion Gd^{III} , par couplage peptidique avec activation carbodiimide standard des fonctions carboxylates (*cf.* Chapitre II). Ensuite, les SRPs sont « remontées en Gd^{III} » : des ions Gd^{III} sont ajoutés après l'étape de couplage peptidique afin de compléter un maximum de DOTA vacants dans le but d'obtenir une meilleure relaxivité longitudinale des SRPs (*cf.* Chapitre II). Enfin, les SRPs sont purifiées puis lyophilisées (*cf.* article).

Comme cela a déjà été fait dans les Chapitres III et IV, cette partie apporte plus de précisions sur les différentes méthodes ayant permis la caractérisation et la quantification du couplage de l'aminopropylpyridinium aux SRPs.

Toutes les analyses sont réalisées sur les SRPs finales, donc « remontées en Gd^{III} », et les concentrations en ions Gd^{III} sont mesurées par ICP-OES.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet Lantharad, portant sur les nanosondes hybrides radiosensibilisantes pour le traitement des tumeurs radiorésistantes. Les résultats prometteurs annoncés dans l'article ci-dessus démontrant l'affinité des nanoparticules vectorisées pour les protéoglycanes contenus dans le cartilage d'animaux sains ont été confirmés par des études *in vivo* supplémentaires sur des rats porteurs de chondrosarcome. Ces études font actuellement l'objet du brevet FR1159856, déposé le 28/10/2011, ayant pour titre « Nanoparticules fonctionnalisées pour le ciblage des protéoglycanes et leurs applications ». Ainsi, nous présenterons dans cette partie les résultats de ciblage *in vivo* des nanoparticules vectorisées sur les rats porteurs de chondrosarcome. Enfin, dans la continuité de ce projet, des études préliminaires de radiothérapie visant à démontrer le potentiel des SRPs vectorisées par le 1-(3-aminopropyl)pyridinium en tant qu'agents radiosensibilisants pour le traitement du chondrosarcome ont été mises en place et ont permis d'obtenir des résultats encourageants, que nous présenterons également en fin de chapitre.

V.3.1. Validation du greffage du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs

V.3.1.1. PCS (Photon Correlation Spectroscopy) et Potentiel ζ

Les diamètres hydrodynamiques (DH) moyens des SRPs non fonctionnalisées et des SRPs fonctionnalisées avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium ont été mesurés par PCS et leurs valeurs sont

reportées dans la Figure V.5. (A). Le couplage covalent d'une ou plusieurs molécules ciblantes sur les SRPs est mis en évidence par l'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen ($2,2 \pm 1,1$ nm pour les SRPs non fonctionnalisées et $5,7 \pm 1,6$ nm pour les SRPs fonctionnalisées).

Ce premier résultat est en adéquation avec les mesures de potentiel ζ des SRPs vectorisées et des SRPs non fonctionnalisées, à différentes valeurs de pH Figure V.5. (B). Le 1-(3-aminopropyl)pyridinium apporte une charge positive par molécule greffée aux SRPs, quelque soit le pH. Comme attendu, les SRP@QA présentent une charge de surface supérieure aux SRPs non fonctionnalisées, démontrant ainsi le greffage d'un ou plusieurs ammonium(s) quaternaire(s) aux SRPs.

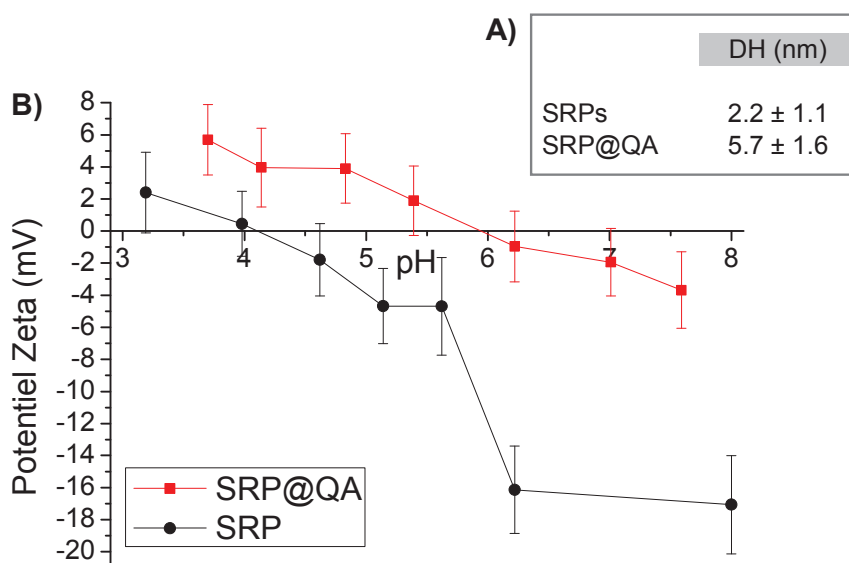


Figure V.5. (A) Diamètres hydrodynamiques (DH) moyens des SRPs non fonctionnalisées et fonctionnalisées. (B) Potentiels ζ des SRPs non fonctionnalisées et fonctionnalisées en fonction du pH de la solution.

V.3.1.2. Spectrométrie de Masse (SM)

Les études de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'ILM, au sein de l'équipe Spectrométrie des Biomolécules et Agrégats sur les SRP@QA, en collaboration avec les Directeurs de Recherche Philippe Dugourd et Rodolphe Antoine, afin de confirmer le couplage covalent de l'ammonium quaternaire aux SRPs.

Le protocole opératoire décrit dans le Chapitre III a été conservé. Plus précisément, une solution aqueuse de SRP@QA a été soumise à une ionisation électrospray (ESI) pour générer des ions intacts en phase gazeuse, de manière à obtenir des informations sur le rapport masse sur charge (m/Z). Les SRPs comprennent de nombreux groupements ionisés (comme les complexes $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$), responsables de la distribution d'états de charge observée sur chaque spectre de masse obtenu. Un algorithme de corrélation multiplicatif a permis d'estimer la masse moyenne des SRP@QA à partir du spectre présentant le rapport m/Z , obtenu par ESI (Figure V.6). La distribution

des SRP@QA est partagée en deux : l'une correspondant à une masse de $9,7 \pm 0,2$ kDa, et l'autre correspondant à une masse de $8,6 \pm 0,2$ kDa.

Conformément aux observations faites dans le Chapitre III, plusieurs pics caractéristiques des SRPs non fonctionnalisées ont été retrouvés aux basses masses, en mode négatif (Lux *et al.*, 2011). Le pic à m/Z 749 est spécifique du fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA}-\text{Si}(\text{OH})_3)]^-$, à savoir, le complexe $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ porté par un groupement silanetriol issu de la matrice de polysiloxane. Le pic à m/Z 630 est caractéristique du fragment $[\text{Gd}^{\text{III}}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$: il correspond au résultat du clivage de la liaison amide entre les molécules de DOTA et d'APTES du fragment précédent à m/Z 749, par la perte d'un fragment $[\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OH})_3]^-$ (Harrison *et al.*, 2003). Cette rupture s'accompagne par la création d'une double liaison C=C. Aussi, le nombre de coordination de l'ion Gd^{III} variant entre 8 et 9, une molécule d'eau complète la sphère de coordination de l'ion métallique (*cf.* Chapitre III). Enfin, le pic à m/Z 594 est spécifique du fragment $(\text{DOTA}-\text{Si}(\text{OH})_3)^-$, à savoir, la molécule de DOTA portée par un silanetriol issu de la matrice de polysiloxane. Comme attendu, ces trois pics à m/Z 749, m/Z 630 et m/Z 594 ont été observés aussi bien pour les SRPs non fonctionnalisées que pour les SRPs fonctionnalisées avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium.

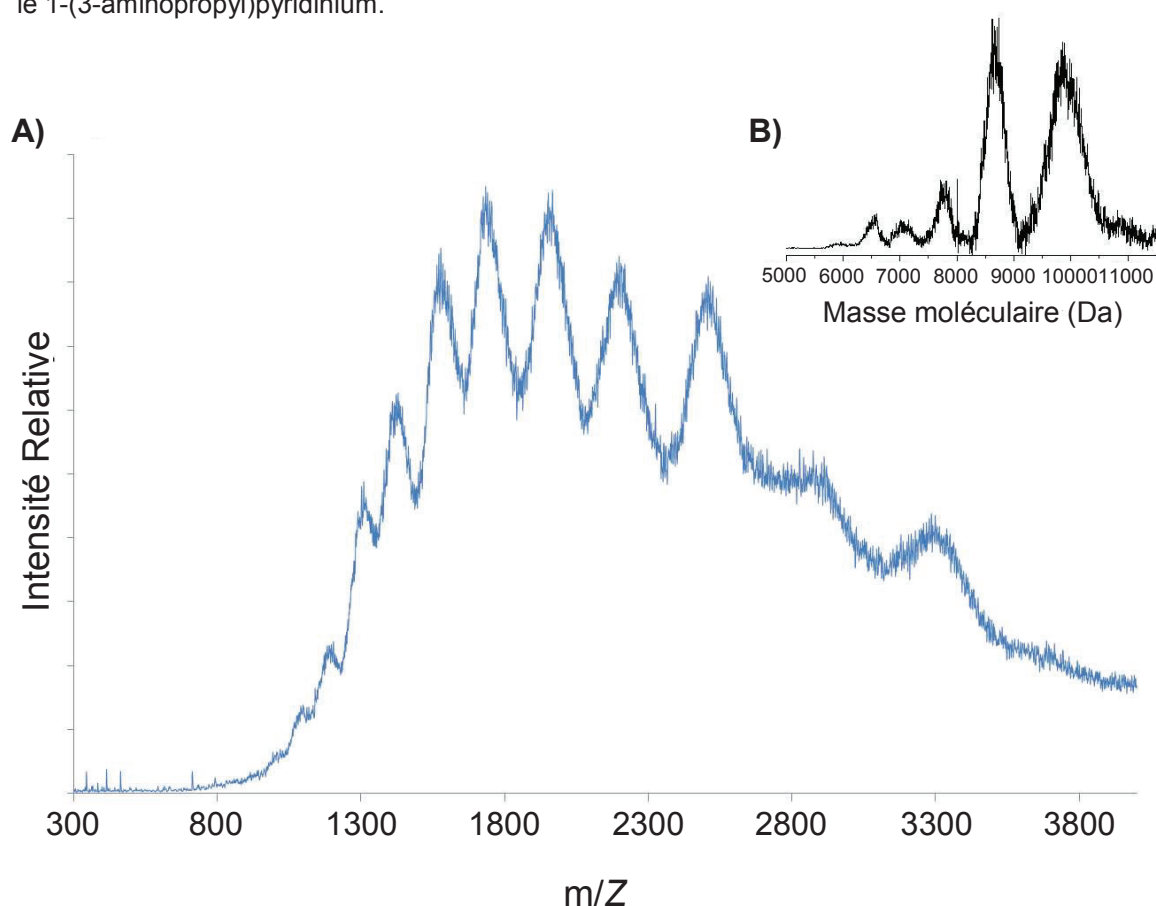


Figure V.6. (A) Spectre ESI des SRP@QA en mode positif. (B) Algorithme de corrélation multiplicatif des SRP@QA, déduit du spectre ESI.

En mode positif, la partie « basses masses » du spectre ESI est dominée par un pic à m/Z 714, caractéristique des SRP@QA. Ce pic est attribué au fragment $(\text{QA}-\text{DOTA}-\text{Si}(\text{OH})_3)^+$, au sein

duquel l'ammonium quaternaire serait lié de manière covalente à une molécule de DOTA portée par un groupement silanetriol (Figure V.7). Le noyau pyridinium est responsable de la charge positive du fragment. Le pic à m/Z 596 est observé pour les deux types de SRPs (fonctionnalisés et non fonctionnalisés) : il correspond au pic à m/Z 594 en mode négatif, à savoir le fragment $(\text{DOTA-Si}(\text{OH})_3)^+$.

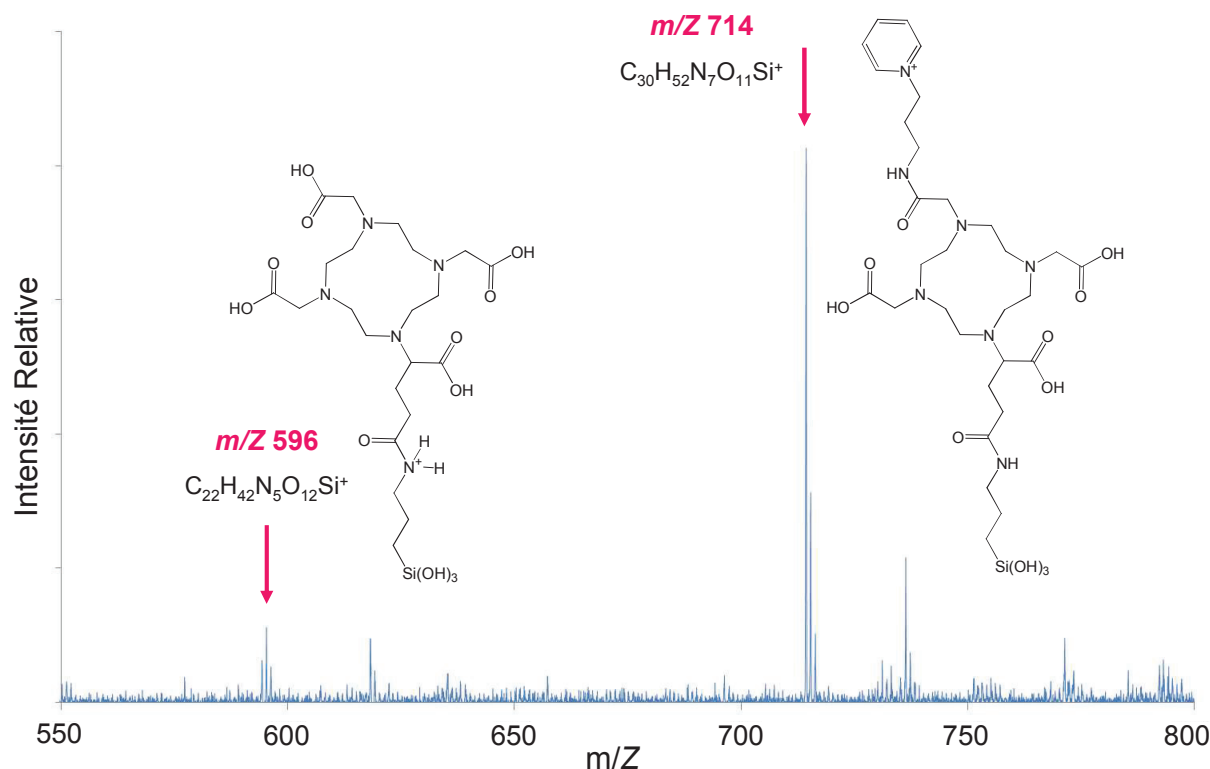


Figure V.7. Spectre ESI des SRP@QA aux basses masses, en mode positif. Le pic à m/Z 596 a été observé à la fois pour les SRPs et les SRP@QA. Le pic à m/Z 714, lui, est caractéristique des SRP@QA.

Le fragment à m/Z 714 prouve la conjugaison covalente du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs tandis que l'absence d'ion Gd^{III} au sein du fragment démontre que le greffage des molécules a lieu en priorité sur les ligands DOTA vacants.

V.3.1.3. Relaxométrie

Les relaxivités longitudinales r_1 des SRPs non fonctionnalisées et des SRPs fonctionnalisées avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium ont été calculées selon l'équation 1 (Li Y. *et al.*, 2012) :

$$r_1 = \frac{1}{[\text{Gd}^{3+}]} \left(\frac{1}{T_{1,\text{obs}}} - \frac{1}{T_{1,\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad (1)$$

où r_1 est la relaxivité longitudinale exprimée en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $[\text{Gd}^{3+}]$ est la concentration réelle en gadolinium (mM) et, $T_{1,\text{obs}}$ et $T_{1,\text{H}_2\text{O}}$ sont les temps de relaxation longitudinale (ms) en présence et en l'absence de SRPs, respectivement.

Comme expliqué dans le Chapitre II, la relaxivité dépend de nombreux facteurs tels que le champ externe, le nombre d'hydratation de la sphère de coordination de l'ion Gd^{III} , le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la sphère de coordination de l'ion Gd^{III} , le temps de corrélation rotationnel et le temps de relaxation électronique. La nouvelle génération d'agents de contraste pour l'IRM joue sur les différents facteurs susceptibles d'augmenter la relaxivité (Botta *et al.*, 2012).

Les valeurs des relaxivités longitudinales calculées pour les SRPs non fonctionnalisées et pour les SRP@QA à 60 MHz sont reportées dans le Tableau V.1.

	$r_{1, 60 \text{ MHz}} \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
SRPs	11.2
SRP@QA	12.2

Tableau V.1. Relaxivités longitudinales des SRPs non fonctionnalisées et fonctionnalisées à 60 MHz, calculées selon l'équation (1).

Les relaxivités longitudinales des deux types de SRPs (fonctionnalisées ou non, $r_1 > 11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 MHz) sont supérieures à celles des agents de contraste commerciaux couramment utilisés (Dotarem® ou Magnevist®), de valeur inférieure à $4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 MHz (Lux *et al.*, 2011). Ainsi, la relaxivité par élément (nanoparticule ou molécule) est supérieure dans le cas des SRPs, comparée à celle des petites molécules organiques. La rigidité du support macromoléculaire (la matrice de polysiloxane dans notre cas) et l'augmentation du poids moléculaire global sont également à l'origine de l'augmentation de la relaxivité : ils jouent sur le temps de corrélation rotationnel τ_R . Les SRPs présentent un fort contraste pour un faible volume, ce qui induit un meilleur contraste en IRM (Li Y. *et al.*, 2012).

La relaxivité longitudinale des SRPs vectorisées est légèrement supérieure à celle des SRPs non fonctionnalisées (12,2 et 11,2 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement). Le couplage covalent d'une ou plusieurs molécules ciblantes sur les SRPs augmente la masse globale des nanoparticules : cette variation de poids moléculaire est susceptible d'influer à nouveau sur le temps de corrélation rotationnel τ_R et par conséquent, d'augmenter légèrement la relaxivité longitudinale des SRPs vectorisées, comparée à celle des SRPs non fonctionnalisées.

V.3.2. Estimation du taux de greffage du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs

Les mesures de diffusion dynamique de lumière (PCS) et de potentiel ζ , ainsi que la spectrométrie de masse et la relaxométrie ont mis en évidence le couplage covalent du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs. Cependant, ces techniques ne permettent pas de quantifier le nombre de molécules greffées par SRP. Afin d'estimer le rendement de couplage, 2 techniques quantitatives ont été utilisées : la spectrophotométrie d'absorption UV-visible et l'analyse élémentaire.

V.3.2.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Le spectre d'absorption UV-visible du 1-(3-aminopropyl)pyridinium en solution aqueuse présente une bande intense dans la région UV ($\epsilon_{259 \text{ nm}} \sim 5900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Figure V.8. (A)), attribuée aux transitions de spin autorisées $\pi-\pi^*$ du noyau pyridinium (Hwang *et al.*, 2005). Les spectres d'absorption UV-visible des SRPs non fonctionnalisées et des SRPs fonctionnalisées avec l'ammonium quaternaire sont reportés en Figure V.8. (B).

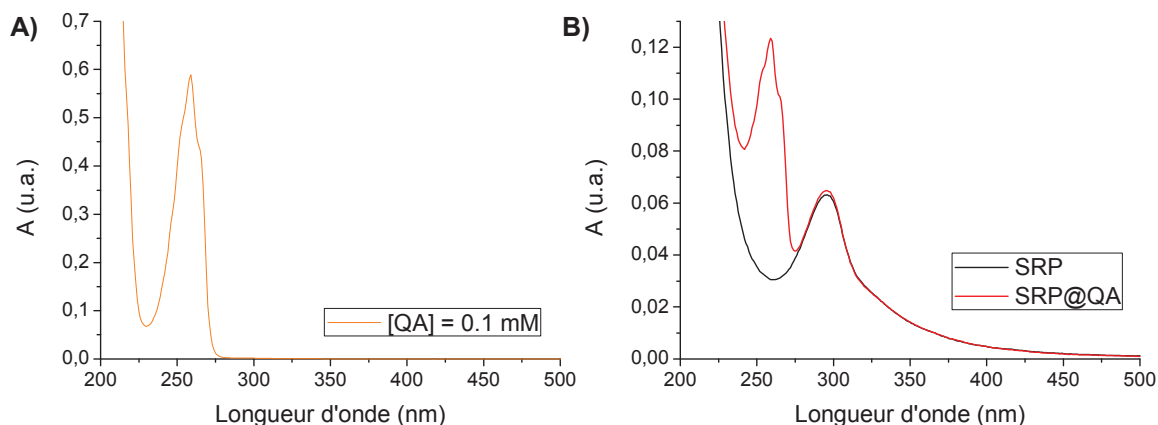


Figure V.8. Spectres d'absorption UV-visible du 1-(3-aminopropyl)pyridinium (A), des SRPs et des SRP@QA (B).

La bande intense caractéristique du noyau pyridinium (259 nm) a été observée, ainsi que la légère contribution due aux SRPs, à 295 nm. Ces spectres d'absorption UV-visible ont été comparés avant et après purification pour le calcul des rendements de greffage et du nombre final d'ammoniums quaternaires par ion Gd^{III} , en partant de l'hypothèse que le couplage peptidique du vecteur sur les SRPs n'a pas d'influence notable sur le coefficient d'extinction molaire du 1-(3-aminopropyl)pyridinium. Les SRP@QA présentent 0,32 vecteurs par ion Gd^{III} .

V.3.2.2. Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont également permis d'évaluer le taux de greffage du 1-(3-aminopropyl)pyridinium aux SRPs. Les pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire sont regroupés dans le Tableau V.2.

Comme énoncé aux Chapitre III et IV, deux hypothèses ont été faites pour estimer la composition chimique de chacun des échantillons contenant les SRPs :

- chaque SRP possède 10 ± 1 molécules de DOTA ;
- le rapport molaire APTES/TEOS de la matrice de polysiloxane reste constant pendant les différentes étapes de synthèse et de purification (0,6 APTES / 0,4 TEOS).

En considérant ces hypothèses, une formule brute approximative est déduite par méthode empirique. Comme seuls les pourcentages massiques des atomes de Gd, Si, C et N ont été mesurés,

il convenait de prendre en compte dans nos calculs les atomes différents de ceux-ci, susceptibles d'être contenus dans les échantillons. Les molécules d'eau ont été prises en compte dans nos calculs.

Les formules brutes indiquées dans le Tableau V.3 sont approximatives. Le nombre de molécules d'eau a été estimé à titre indicatif et ces molécules d'eau pourraient d'ailleurs être remplacées par des contre-ions, par exemple. Ces formules brutes ont été déduites avec une erreur absolue inférieure à 0,4% par rapport aux pourcentages massiques fournis dans le Tableau V.2.

	SRPs			SRP@QA		
<i>Analyses Élémentaires - (Pourcentages massiques)</i>						
	Exp.	Theo.	Err.	Exp.	Theo.	Err.
%Gd	12.09	12.16	0.07	12.04	11.66	0.38
%Si	7.89	7.94	0.05	9.57	9.27	0.30
%N	8.6	8.57	0.03	8.54	8.87	0.33
%C	31.37	31.32	0.05	31.21	31.59	0.38

Tableau V.2. Analyses élémentaires (en pourcentages massiques). Pour chaque échantillon, les données expérimentales (1^{ère} colonne) sont fournies par le Service Central d'Analyses (SCA) de Solaize, du CNRS. Les pourcentages massiques théoriques (2^{ème} colonne) correspondent aux pourcentages massiques déduits des formules brutes estimées présentées dans le Tableau V.3. Les écarts absolus entre les données expérimentales et théoriques sont indiqués dans la 3^{ème} colonne.

	SRPs	SRP@QA
<i>Analyses Élémentaires - Formules brutes</i>		
Nombre d'atomes/molécules de par SRP		
Gd	7	7.5
DOTA	10	10
APTES/TEOS	15.3 / 10.2	20.0 / 13.3
QA	/	2
H ₂ O (ou contre-ions)	60	32

Tableau V.3. Formules brutes estimées pour chacun des échantillons et déduites des pourcentages massiques fournis par le SCA de Solaize.

Par analyse élémentaire, le nombre de vecteurs par SRP est estimé à 2 pour les SRP@QA.

V.3.2.3. Récapitulatif des 2 techniques ayant permis l'estimation de la quantité de vecteurs par SRP

En multipliant les rapports molaires vecteur/Gd^{III} obtenus par spectrophotométrie d'absorption UV-visible par le nombre d'ions Gd^{III} estimés par analyse élémentaire, le nombre d'ammoniums quaternaires par SRP peut être calculé. Les résultats sont regroupés dans le Tableau V.4.

	SRPs	SRP@QA
Analyse Élémentaire		
Nombre d'ions Gd ^{III} par SRP	7	7.5
Nombre de vecteurs par SRP	1	2
Spectrophotométrie d'absorption UV-visible		
Nombre de vecteurs par SRP	1	2.4
Moyenne	1	2.2 ± 0.2

Tableau V.4. Estimation de la quantité de vecteurs par SRP, obtenue par analyse élémentaire et par spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

Les quantités de vecteurs par SRP calculées à partir des données obtenues par analyse élémentaire et spectrophotométrie d'absorption UV-visible sont concordantes. Les SRP@QA présentent environ 2,2 ammoniums quaternaires par SRP.

V.3.3. Etudes *in vivo* menées dans le cadre du projet Lantharad (résultats confidentiels)

Les études *in vivo* de biodistribution et de radiosensibilisation avec les SRPs fonctionnalisées avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium ont été réalisées dans le cadre du projet Lantharad, portant sur les nanosondes hybrides radiosensibilisantes pour le traitement des tumeurs radio-résistantes.

Les études *in vivo* et *ex vivo* de biodistribution des SRP@QA par imagerie TEMP ont été réalisées à l'INSERM de Clermont-Ferrand, au sein de l'unité « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée », par les équipes du Pr. J.M. Chezal et du Dr. E. Miot-Noirault. Ces études font actuellement l'objet d'un brevet, dont nous résumons ici les principaux résultats : elles démontrent le ciblage des SRP@QA sur les protéoglycanes contenus dans le chondrosarcome SRC par imagerie TEMP. Ces recherches constituent une première approche pour la détermination du temps après injection des SRP@QA pour lequel le rapport tumeur/muscle est le plus élevé : ce temps permet d'indiquer la durée à attendre après injection des SRP@QA pour réaliser les acquisitions TEMP les plus précises dans le cadre d'un diagnostic.

Suite à ces observations, des études de radiosensibilisation du chondrosarcome par les SRP@QA ont été menées au Centre Hospitalier Lyon Sud, par les équipes du Dr. E. Miot-Noirault de l'unité « Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée » de l'INSERM de Clermont-Ferrand, du Pr. M. Janier du service de médecine nucléaire de l'Hôpital Edouard Herriot et du Pr. C. Rodriguez-Lafrasse du laboratoire de radiobiologie cellulaire et moléculaire du Centre Hospitalier Lyon Sud. Ces travaux de recherche préliminaire visent à mettre en évidence le potentiel des SRP@QA en tant qu'agent radiosensibilisant pour le traitement du chondrosarcome par radiothérapie.

V.3.3.1. Etudes de biodistribution des SRP@QA par imagerie TEMP

Les études de biodistribution ont été réalisées sur des rats porteurs de chondrosarcome SRC (Swarm Rat Chondrosarcoma), greffé en orthotopique, en position paratibiale.

- Présentation du chondrosarcome SRC :

Le SRC est une lignée de tissu tumoral dérivée d'une tumeur survenant spontanément chez les rats Sprague-Dawley ; il représente l'un des systèmes de culture cellulaire les plus utiles pour les études de métabolisme du cartilage. Les cellules croissent de manière fiable et reproductible et produisent de grandes quantités de matrice extracellulaire. De plus, qu'elles soient injectées dans les tissus sous-cutanés ou dans l'os, ces cellules ont un comportement assez proche de celles du chondrosarcome humain (Stevens *et al.*, 2005). Le SRC obtenu après 35 jours d'implantation de la greffe paratibiale correspond à un chondrosarcome bien différencié de grade II.

- Dispositif d'acquisition des images TEMP :

Afin de détecter les nanoparticules par imagerie TEMP, les SRPs non fonctionnalisées et les SRP@QA ont été radiomarquées à l'Indium 111. La gamma-caméra utilisée pour les acquisitions *in vivo* puis *ex vivo* permet la réalisation d'images planaires tomoscintigraphiques à l'aide de ses deux têtes d'acquisition. Grâce à des collimateurs adaptés, elle autorise la détection de ^{111}In (acquisition réalisées sur deux fenêtres (15%) centrées sur les pics à 171 et 245 keV). Cette γ -caméra est dédiée au petit animal : son champ de vue de 10 cm de diamètre autorise les acquisitions corps entier chez la souris, mais seulement partielle chez le rat (Figure V.9).

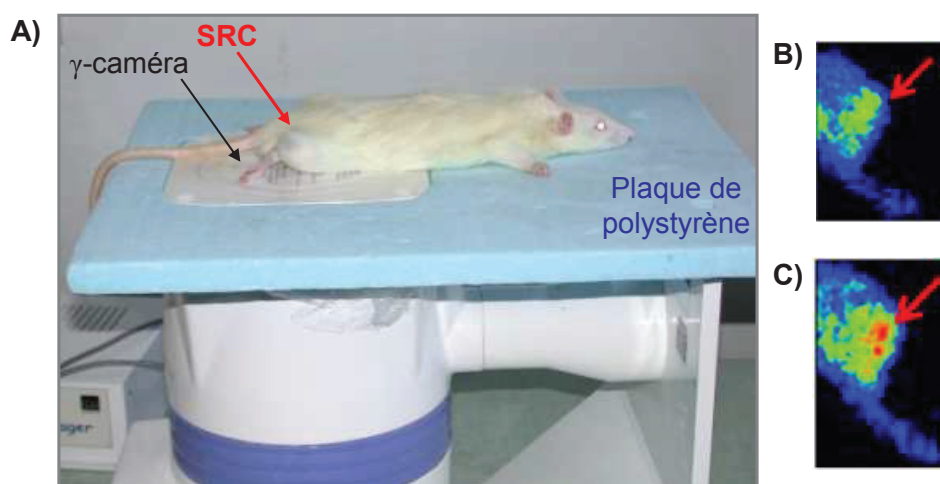


Figure V.9. (A) Dispositif mis en place pour l'acquisition d'images TEMP *in vivo* sur rats porteurs de chondrosarcome SRC, greffé en orthotopique, en position paratibiale. (B) et (C) Images obtenues au niveau de la patte porteuse de la tumeur, 25 min après injection des SRPs. (B) SRPs non fonctionnalisées radiomarquées à ^{111}In . (C) SRP@QA radiomarquées à ^{111}In . Ces images démontrent la fixation spécifique des SRP@QA aux protéoglycanes contenus dans le SRC.

- Etudes de biodistribution in vivo et ex vivo :

Les seringues contenant les deux types de SRPs radiomarquées à l'¹¹¹In (fonctionnalisées ou non) ont été calibrées de façon à injecter la même activité dans chaque rat, à savoir 5-10 MBq par rat, dans un volume inférieur à 500 µL. Les résultats sont exprimés par rapport à l'activité mesurée dans le muscle proche : il s'agit du rapport de l'activité moyenne mesurée dans la tumeur sur l'activité moyenne mesurée dans le muscle proche. Toutes les activités ont été corrigées de la décroissance radioactive et les résultats sont exprimés en coups par minute par gramme d'organe (cpm/g).

Les ratios des activités mesurées dans la tumeur et dans le muscle lors de l'étude de biodistribution des SRPs et des SRP@QA in vivo sont reportés dans la Figure V.10.

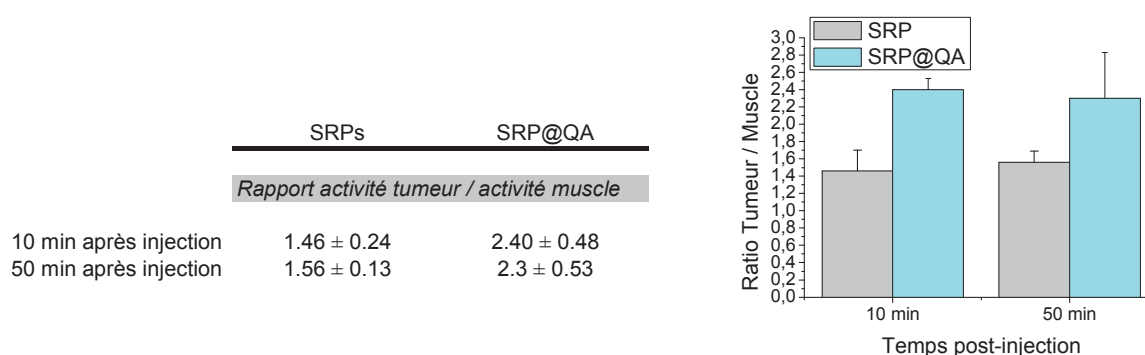


Figure V.10. Etude de biodistribution in vivo sur rats porteurs de chondrosarcome SRC, greffé en orthotopique, en position paratibiale. Rapports tumeur/muscle obtenus par imagerie TEMP à 10 min et 50 min post-injection.

Les rapports d'activités tumeur/muscle des deux types de SRPs (fonctionnalisés ou non) démontrent un ciblage passif des SRPs, dû à leurs propriétés physicochimiques. Le rapport d'activités tumeur/muscle des SRPs fonctionnalisées avec le 1-(3-aminopropyl)pyridinium est supérieur à celui des SRPs non fonctionnalisées, démontrant alors un ciblage actif des SRPs fonctionnalisées, dû au vecteur. Cette étude de biodistribution in vivo a été complétée par une étude ex vivo.

Les animaux ont été sacrifiés à différents temps. Les organes ont ensuite été isolés, pesés et comptés afin d'en déterminer la concentration radioactive. Les ratios des activités mesurées dans la tumeur et dans le muscle lors de l'étude de biodistribution des SRPs et des SRP@QA ex vivo sont reportés dans la Figure V.11.

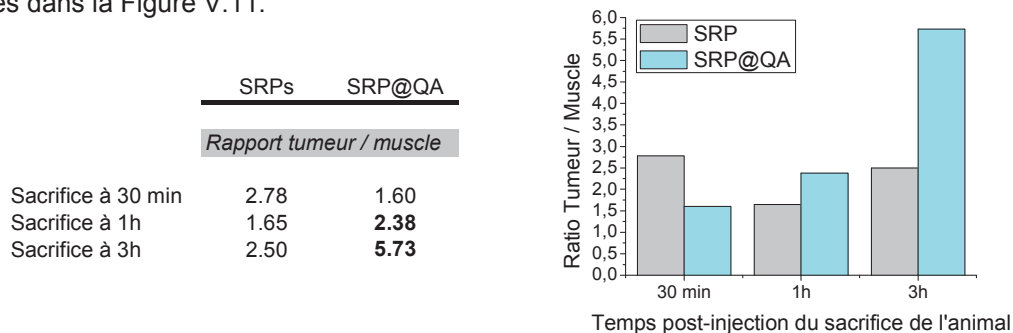


Figure V.11. Etude de biodistribution ex vivo menée sur 6 rats porteurs de chondrosarcome SRC, greffé en orthotopique, en position paratibiale (1 animal par temps et par type de SRP). Rapports tumeur/muscle obtenus par imagerie TEMP après sacrifice des animaux à 30 min, 1 h et 3 h post-injection.

A partir de la première heure, le rapport tumeur/muscle est plus élevé dans le cas des SRPs fonctionnalisés avec l'ammonium quaternaire que dans le cas des SRPs non fonctionnalisés. A 3 h post-injection, le ratio élevé des SRP@QA démontre une accumulation intra-tumorale spécifique alors qu'il existe une clairance musculaire dans le même temps.

- Etudes complémentaires sur l'expression des protéoglycanes au sein des modèles de chondrosarcome (i) murin : SRC et (ii) humain : HEMCSS :

Sur 3 souris SCID porteuses de xéno greffe du chondrosarcome issu de la lignée humaine HEMCSS et 3 rats porteurs de chondrosarcome SRC, greffé en orthotopique, en position paratibiale, la tumeur a été prélevée après sacrifice de l'animal pour un dosage biochimique des protéoglycanes. Il a été démontré que la lignée murine SRC exprimait plus de 30 fois plus de protéoglycanes que la lignée humaine HEMCSS (Figure V.12. (A)). D'ailleurs, lors de l'injection des SRP@QA, les études de biodistribution *in vivo* sur les souris SCID porteuses de xéno greffe HEMCSS ont démontré qu'aucune fixation des SRP@QA n'avait eu lieu au sein de la tumeur (Figure V.12. (B)). En revanche, lors de l'injection des SRP@QA chez les rats porteurs de SRC, une fixation abondante de SRP@QA a été observée au sein de la tumeur (Figures V.9, 10 et 11).

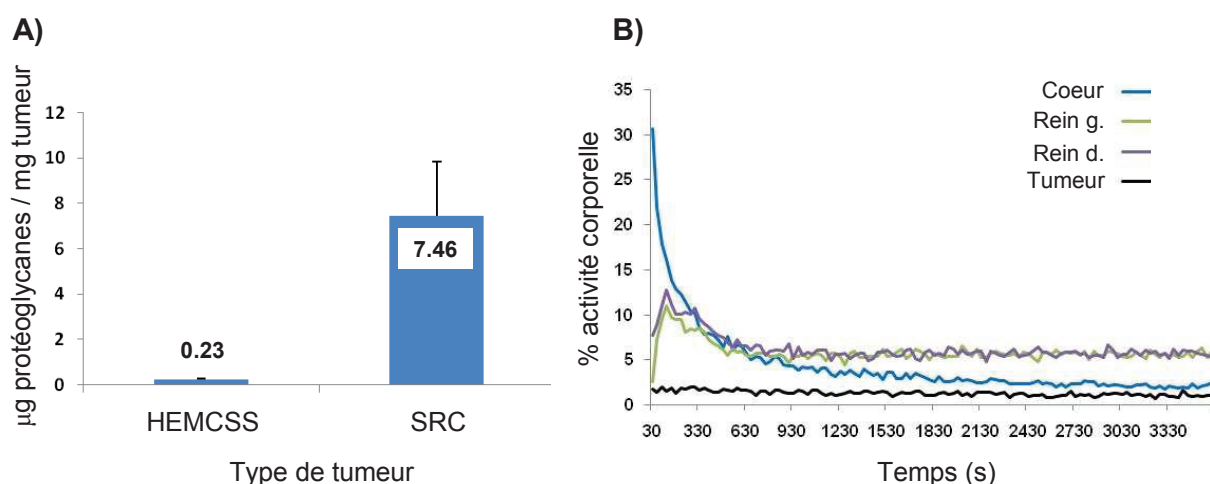


Figure V.12. (A) Comparaison de la teneur en protéoglycanes des tumeurs HEMCSS (lignée humaine) et SRC (lignée murine). (B) Etude de biodistribution *in vivo* des SRP@QA sur souris SCID porteuses xéno greffe sous-cutanée de chondrosarcome HEMCSS, n'exprimant pas de protéoglycane.

L'évaluation intra-tumorale des protéoglycanes a permis de vérifier que la fixation spécifique au sein de la tumeur SRC était corrélée à une densité élevée de protéoglycanes observée au sein du chondrosarcome SRC, contrairement à la tumeur HEMCSS.

V.3.3.2. Etudes de radiosensibilisation du chondrosarcome par les SRP@QA

Les études de biodistribution précédentes ayant démontré la pertinence de l'utilisation du modèle SRC pour son expression abondante de protéoglycanes, les expériences de radiosensibilisation sont à nouveau réalisées sur des rats porteurs de chondrosarcome SRC.

Cependant, afin d'éviter d'éventuels dommages au niveau des tissus sains, l'irradiation d'une tumeur en présence d'agents radiosensibilisants doit observer deux paramètres primordiaux : (i) la concentration en agent radiosensibilisant doit être maximale dans la zone tumorale et (ii) nulle dans les zones saines.

Une première étude de radiosensibilisation est menée sur un groupe de 25 rats porteurs de SRC greffé en ectopique, répartis en 3 groupes : le premier groupe de rats ne reçoit pas d'agent radiosensibilisant et subit une irradiation classique, le second reçoit des SRP@QA (par injection intratumorale) mais pas d'irradiation, et le dernier reçoit également des SRP@QA (par injection intratumorale) puis est traité par irradiation (Figure V.13). Les deux groupes de rats traités par irradiation reçoivent une monodose de 10 Gy, 5 min après injection du sérum physiologique dans le cas du premier groupe ou 5 min après injection des SRP@QA dans le cas du troisième groupe.

Les différents paramètres d'irradiation ont été choisis selon les expériences habituellement réalisées au laboratoire de radiobiologie cellulaire et moléculaire du Centre Hospitalier Lyon Sud sur d'autres modèles de cancers radiorésistants, notamment le carcinome tête et cou (lignée cellulaire SQ20B). L'injection des SRP@QA par voie intratumorale est préférée à l'injection par voie intraveineuse pour cette première expérience de radiosensibilisation, dans le but d'optimiser la concentration de l'agent radiosensibilisant au sein de la tumeur et de minimiser sa concentration dans les tissus environnants. Enfin, la greffe ectopique du SRC est privilégiée par rapport à la greffe orthotopique car elle présente plus de facilités de manipulation : l'injection par voie intratumorale était quasiment impossible sur la tumeur greffée en orthotopique car elle était multilobée ; de plus, le volume tumoral des tumeurs greffées en ectopique est facilement mesurable.

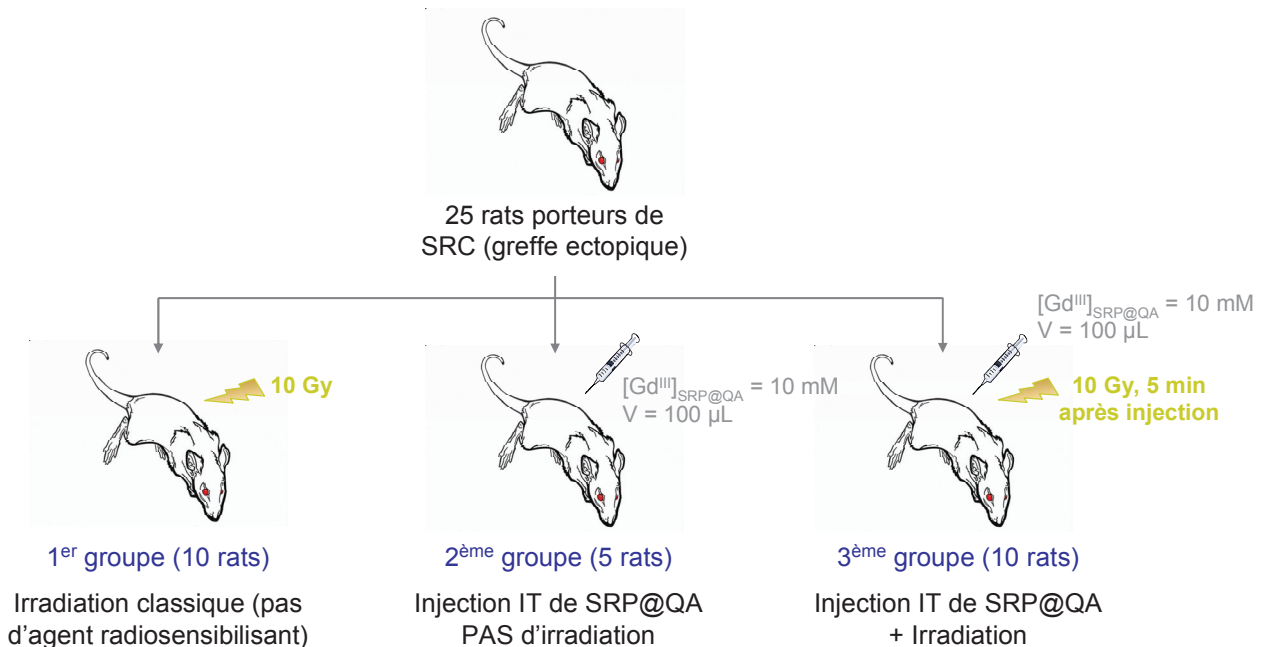


Figure V.13. Répartition des différents groupes de rats pour la 1^{ère} étude de radiosensibilisation du SRC par les SRP@QA.

Le volume de la tumeur est relevé le jour de l'irradiation puis au fil du temps, et la croissance tumorale est calculée (Figure V.14).

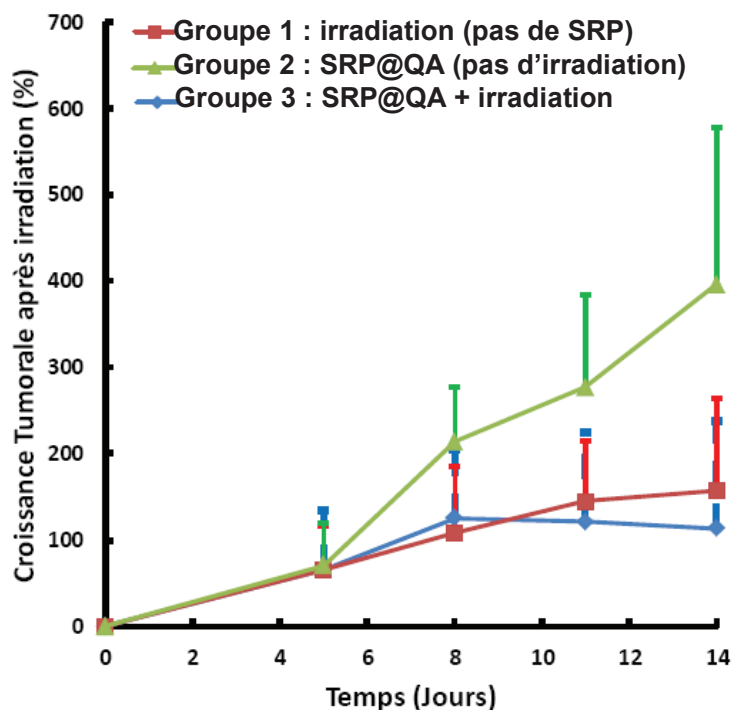


Figure V.14. Courbe représentant la croissance tumorale en fonction du temps après irradiation des rats par une monodose de 10 Gy (groupes 1 et 3 ; le groupe 2 n'est pas irradié). Groupe 1 : irradiation classique (pas d'injection d'agent radiosensibilisant). Groupe 2 : injection IT de SRP@QA (100 μ L, $[\text{Gd}^{3+}] = 10$ mM), pas d'irradiation. Groupe 3 : injection IT de SRP@QA (100 μ L, $[\text{Gd}^{3+}] = 10$ mM) puis irradiation 5 min après injection.

Pour le deuxième groupe de rats (rats ayant reçu une injection IT de SRP@QA mais non traités par irradiation), la tumeur ne cesse de croître, ce qui indique que les SRP@QA seules n'ont aucun effet thérapeutique. En ce qui concerne le premier groupe (rats ayant subi une irradiation classique), la tumeur croît plus lentement, démontrant une certaine efficacité de la radiothérapie à ralentir la croissance tumorale mais son incapacité à réduire le volume tumoral car le chondrosarcome est une tumeur radiorésistante. Enfin, pour le troisième groupe (rats ayant reçu une injection IT de SRP@QA puis traités par irradiation), la croissance tumorale est dans un premier temps ralentie puis la tumeur semble diminuer. Cependant, compte-tenu des barres d'erreurs, il serait prématuré de conclure à un effet radiosensibilisant des SRP@QA. L'expérience a été prolongée sur 15 jours supplémentaires mais aucun effet synergique des SRP@QA et de l'irradiation n'a pu être constaté.

Des études supplémentaires doivent alors être réalisées, notamment sur le choix (i) du modèle d'implantation de la tumeur (greffe orthotopique ou ectopique), (ii) de la voie d'injection (IT ou IV), (iii) de la dose d'irradiation et (iv) du temps séparant l'injection de l'irradiation, de façon à démontrer l'effet radiosensibilisant des SRP@QA.

V.4. Conclusion

L'objectif de ces recherches était de démontrer la capacité des SRP@QA à se lier aux tissus cartilagineux. Sur la base d'études précédentes (Miot-Noirault *et al.*, 2012 ; Peyrode *et al.*, 2012 ; Cachin *et al.*, 2011 ; Peyrode *et al.*, 2011 ; Miot-Noirault *et al.*, 2009 ; Giraud *et al.*, 2000 ; Maurizis *et al.*, 2000), un pyridinium a été greffé aux SRPs pour les études de ciblage des protéoglycanes *via* une interaction électrostatique entre le QA chargé positivement et les groupements sulfate et carboxylate négativement chargés des PGs.

Le greffage covalent du vecteur aux SRPs a été validé par des techniques de caractérisation telles que la relaxométrie, la PCS, la mesure du potentiel ζ et la spectrométrie de masse. Une deuxième série de méthodes de caractérisation – à savoir : la spectrophotométrie d'absorption UV-visible et les analyses élémentaires – a ensuite permis d'estimer une moyenne de 2,2 vecteurs 1-(3-aminopropyl)pyridinium par SRP.

L'aptitude des SRP@QA à cibler les tissus cartilagineux a été démontrée avec succès par imagerie TEMP. Au-delà du ciblage du cartilage articulaire, des études de ciblage du chondrosarcome murin (SRC) ont été réalisées et positionnent les SRP@QA comme agents d'imagerie potentiels du chondrosarcome humain. De plus, des études visant à démontrer le potentiel des SRP@QA en tant qu'agents radiosensibilisants du chondrosarcome ont été menées en amont et, après optimisation des différents paramètres d'irradiation, pourraient permettre un jour de proposer les SRP@QA comme agents théranostiques du chondrosarcome.

Conclusion générale

Conclusion

Dans un contexte où la lutte contre le cancer est un problème majeur de santé publique, l'amélioration de la compréhension de la maladie, la prévention des risques qui y sont liés, la recherche d'un diagnostic plus précoce et plus précis, et l'augmentation de l'efficacité des traitements actuels sont autant de sujets qui motivent la recherche sur le cancer. Aujourd'hui, un patient sur deux guérit, contre un sur trois il y a 15 ans ; chez l'enfant, les chiffres de la Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) annoncent 70 à 80 % de guérison, soit trois fois plus qu'il y a 30 ans (ARC). Ces progrès notables incitent les chercheurs à persévérer afin de freiner l'une des premières causes de mortalité dans le monde.

Une des problématiques de l'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux) de l'Institut Lumière Matière consiste à développer des nanoparticules multifonctionnelles dont les trois principaux objectifs sont : (i) affiner le diagnostic, (ii) améliorer le traitement et (iii) rendre ces agents théranostiques spécifiques du cancer en question.

Les SRPs développées s'inscrivent, dans un premier temps, dans une optique de détection du cancer à un stade plus précoce. En effet, les SRPs ont déjà démontré leur potentiel en tant qu'agent d'imagerie multimodale : elles sont détectables par quatre modalités d'imagerie différentes, à savoir : l'IRM, la TEMP, la TDM et l'imagerie optique (Lux *et al.*, 2011). Ces SRPs offrent ainsi une palette d'outils complète et efficace pour le diagnostic du cancer. D'autre part, il a également été prouvé qu'en IRM, les SRPs produisaient un meilleur contraste que les agents de contraste actuels (Lux *et al.*, 2011), aboutissant alors à un diagnostic par IRM plus précis.

Parallèlement, les nanoparticules à base de gadolinium ont aussi démontré leur potentiel en tant qu'agent radiosensibilisant (Le Duc *et al.*, 2011 ; Mowat *et al.*, 2011), laissant présager un avenir prometteur aux SRPs pour l'amélioration des traitements par radiothérapie. Ces nanoplateformes multifonctionnelles regroupent au sein d'un seul et même objet des agents permettant d'améliorer le diagnostic du cancer et l'efficacité du traitement par radiothérapie, mais aussi de suivre l'évolution du traitement.

Enfin, grâce à leur petite taille (< 5 nm), les SRPs synthétisées ont la capacité de s'accumuler de manière sélective dans les tumeurs solides, en raison de l'hyperperméabilité vasculaire et du dysfonctionnement du système lymphatique (effet EPR). Ce ciblage passif peut être renforcé par la vectorisation de ces nanoplateformes multifonctionnelles, afin de les rendre spécifiques du cancer à traiter. Le présent travail de thèse s'inscrit dans cette optique de fonctionnalisation des SRPs en vue de l'obtention d'un ciblage actif des tumeurs. En effet, la fonctionnalisation des SRPs par des vecteurs permet d'optimiser leur accumulation et leur rétention au sein des tumeurs, pour une meilleure efficacité de ces nanoparticules en tant qu'agents théranostiques.

Des stratégies de greffage sur la base de formation de liaisons amides ont alors été mises en place pour le couplage covalent de différentes entités ciblantes aux SRPs. Plus précisément, cinq molécules ciblantes ont retenu notre attention : (i) un pentapeptide cyclique contenant le motif RGD – ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de cellule endothéliale pour les protéines de la matrice extracellulaire, (ii) trois molécules dérivées de la quinoxaline – ciblant la mélanine, sur-exprimée par le mélanome

(cancer de la peau), et (iii) un ammonium quaternaire – ciblant les protéoglycanes, sur-exprimés par le chondrosarcome (cancer du cartilage).

Le greffage de chacune de ces molécules ciblantes a été exhaustivement mis en évidence par différentes méthodes de caractérisation qualitatives et/ou quantitatives au sein du laboratoire et dans le cadre de plusieurs collaborations : PCS, potentiel ζ , relaxométrie, profils NMRD, ICP-OES, FCS, spectroscopie IR, spectrométrie de masse, spectrophotométrie d'absorption UV-visible, spectroscopie de fluorescence, HPLC et analyse élémentaire. Pour chaque molécule ciblante, plus de 2 molécules ont été greffées par SRP, afin de maximiser les affinités avec la cible correspondante. Le ciblage de chacune des SRPs vectorisées a alors été démontré *in vitro* et/ou *in vivo*, par le biais de diverses collaborations.

L'affinité des SRPs fonctionnalisées avec le pentapeptide cyclique contenant le motif RGD pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été mis en évidence par des tests *in vitro* (tests IC_{50} , FCS, microscopie de fluorescence et cytométrie de flux) sur l'intégrine ou sur des cellules sur-exprimant l'intégrine. D'autre part, des tests *in vivo* sur souris porteuses de tumeur sur-exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont permis de confirmer le ciblage des SRPs fonctionnalisées avec le c(RGDfK) par imagerie de fluorescence : une captation significative de SRP vectorisées a été constatée au niveau de la tumeur.

Le ciblage de la mélanine par les SRPs fonctionnalisées avec des molécules dérivées de la quinoxaline a, quant à lui, été observé *in vitro* par la technologie BIAcore®, un biocapteur conventionnel utilisant le principe de la résonance plasmonique de surface. Les SRPs fonctionnalisées avec les 3 différentes molécules ciblantes ont chacune démontré une forte affinité pour la mélanine, ouvrant la porte à de futures études *in vivo* sur des mélanomes exprimant de la mélanine de manière extracellulaire.

Enfin, les SRPs fonctionnalisées avec un pyridinium ont manifesté leur aptitude à se lier aux tissus cartilagineux lors de tests *in vivo* sur animaux sains imagés par TEMP. Des études *in vivo* sur rats porteurs de chondrosarcome ont ensuite été réalisées afin de confirmer la pertinence de l'utilisation des SRP@QA en tant qu'agents d'imagerie. D'autre part, des études préliminaires d'irradiation de rats porteurs de chondrosarcome après injection de SRP@QA justifient l'utilisation de ces nanoplateformes multifonctionnelles vectorisées comme agents radiosensibilisants potentiels du chondrosarcome.

Le ciblage de chacune des nanoparticules fonctionnalisées avec les molécules ciblantes sélectionnées a été mis en évidence par des tests *in vitro* et/ou *in vivo* permettant de proposer les SRPs vectorisées comme agents théranostiques prometteurs des tumeurs radiorésistantes, et plus particulièrement du glioblastome, du mélanome et du chondrosarcome.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abeylath S.C., Ganta S., Iyer A.K., Amiji M., Combinatorial-designed multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted therapeutic delivery, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 1009-1017

Abraxane® : <http://www.abraxane.com/hcp/>

Aït-Slimane T., Principe physique de la fluorescence, CHU Saint Antoine : http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Master/ue/MV426/flu089.pdf

Al Jammaz I., Al-Otaibi B., Okarvi S., Amartey J., Rapid and efficient synthesis of [¹⁸F]fluoronicotamides, [¹⁸F]fluoroisonicotamides and [¹⁸F]fluorobenzamides as potential pet radiopharmaceuticals for melanoma imaging, *J. Label. Compds. Radiopharm.*, **2011**, 54, 312-317

Alexis F., Pridgen E.M., Langer R., Farokhzad O.C., Nanoparticle technologies for cancer therapy, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2010**, 197, 55-86

Alric C., Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie, Thèse : Chimie : Lyon : **2012**

Aly H.A.A., Cancer therapy and vaccination, *J. Immunol. Methods*, **2012**, 382, 1-23

ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) : <http://www.arc-cancer.net/>

Ashjari M., Khoee S., Mahdavian A.R., Rahmatolahzadeh R., Self-assembled nanomicelles using PLGA-PEG amphiphilic block copolymer for insulin delivery: a physicochemical investigation and determination of CMC values, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2012**, 23, 943-953

Azhdarinia A., Ghosh P., Ghosh S., Wilganowski N., Sevic-Muraca E.M., Dual-labeling strategies for nuclear and fluorescence molecular imaging: a review and analysis, *Mol. Imaging Biol.*, **2012**, 14, 261-276

B

Bae Y.H., Park K., Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility, *J. Control. Release*, **2011**, 153, 198-205

Baker M., The whole picture, *Nature*, **2010**, 463, 977-980

Baldea I., Filip A.G., Photodynamic therapy in melanoma – An update, *J. Physiol. Pharmacol.*, **2012**, 63(2), 109-118

Ballard B., Jiang Z., Soll C.E., Revskaya E., Cutler C.S., Dadachova E., Francesconi L.C., *In vitro* and *in vivo* evaluation of melanin-binding decapeptide 4B4 radiolabeled with ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho and ¹⁵³Sm radiolanthanides for the purpose of targeted radionuclide therapy of melanoma, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2011**, 26(5), 547-556

Bardhan R., Lal S., Joshi A., Halas N.J., Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 936-946

Baskar R., Lee K.A., Yeo R., Yeoh K.W., Cancer and radiation therapy: current advances and future directions, *Int. J. Med. Sci.*, **2012**, 9(3), 193-199

Bazzi R., Nanoparticules luminescentes d'oxydes de terres rares : synthèse et caractérisation de colloïdes ultrafins de sesquioxydes d'yttrium et de gadolinium dopés (Eu, Tb, Nd), Thèse : Chimie : Lyon : **2004**

Beer A.J., Schwaiger M., Imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression, *Cancer Metastasis Rev.*, **2008**, 27, 631-644

Begg A.C., Stewart F.A., Vens C., Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs, *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, 11, 239-253

Berland Y., Deray G., Laville M., Launay-Vacher V., Brunet P., Fauvel J.P., Karie S., Fibrose systémique néphrogénique : un nouvel effet indésirable chez les patients insuffisants rénaux recevant des produits de contraste à base de Gadolinium, *La Lettre d'ICAR en Néphrologie*, **2007**

Bernsmann F., Ball V., Addiego F., Ponche A., Michel M., de Almeida Gracio J.J., Toniazzo V., Ruch D., Dopamine-

melanin film deposition depends on the used oxidant and buffer solution, *Langmuir*, **2011**, 27, 2819-2825

Bianchi A., Calabi L., Corana F., Fontana S., Losi P., Maiocchi A., Paleari L., Valtancoli B., Thermodynamic and structural properties of Gd(III) complexes with polyamino-polycarboxylic ligands: basic compounds for the development of MRI contrast agents, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 204, 309-393

Blanco E., Hsiao A., Mann A.P., Landry M.G., Meric-Bernstam F., Ferrari M., Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects, *Cancer Sci.*, **2011**, 102(7), 1247-1252

BIND Biosciences : <http://www.bindbio.com/>

Biotek®, Using the Synergy™HT to measure time-resolved fluorescent compounds, Application Note. www.biotek.com

Briat A., Wenk C.H.F., Ahmadi M., Claron M., Boturyn D., Josserand V., Dumy P., Fagret D., Coll J.L., Ghezzi C., Sancey L., Vuillez J.P., Reduction of renal uptake of ¹¹¹In-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin $\alpha_v\beta_3$ targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging, *Cancer Sci.*, **2012**, 103(6), 1105-1110

Bridot J.L., Nanohybrides à cœur d'oxyde de gadolinium pour le développement de sondes IRM multimodales, Thèse : Chimie : Lyon : **2007**

Brinker C.J., Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure, *J. Non-Cryst. Solids*, **1988**, 100, 31-50

Bonnet-Duquennoy M., Papon J., Mishellany F., Labarre P., Guerquin-Kern J.L., Wu T.D., Gardette M., Maublant J., Penault-Llorca F., Miot-Noirault E., Cayre A., Madelmont J.C., Chezal J.M., Moins N., Targeted radionuclide therapy of melanoma: Anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent, *Int. J. Cancer*, **2009**, 125, 708-716

Borden M.A., Zhang H., Gillies R.J., Dayton P.A., Ferrara K.W., A stimulus-responsive contrast agent for ultrasound molecular imaging, *Biomaterials*, **2008**, 29(5), 597-606

Borgman M.P., Aras O., Geysler-Stoops S., Sausville E.A., Ghandehari H., Biodistribution of HPMA copolymer-aminohexylgeldanalycin-RGDfK conjugates for prostate cancer drug delivery, *Mol. Pharm.*, **2009**, 6(6), 1836-1847

Botta M., Tei L., Relaxivity enhancement in macromolecular and nanosized Gd^{III}-based MRI Contrast agents, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1945-1960

Boturyn D., Coll J.L., Garanger E., Favrot M.C., Dumy P., Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 5730-5739

Braiman M.S., Briercheck D.M., Kriger K.M., Modeling vibrational spectra of amino acid side chains in proteins: effects of protonation state, couterion, and solvent on Arginine C-N stretch frequencies, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 4744-4750

Bunschoten A., Buckle T., Visser N.L., Kuil J., Yuan H., Josephson L., Vahrmeijer A.L., van Leeuwen F.W.B., Multimodal interventional molecular imaging of tumor margins and distant metastases by targeting $\alpha_v\beta_3$ integrin, *Chembiochem.*, **2012**, 13, 1039-1045

Bünzli J.C.G., Piguet C., Taking advantage of luminescent lanthanide ions, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 1048-1077

C

Cabral H., Nishiyama N., Kataoka K., Supramolecular nanodevices: from design calibration to theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 999-1008

Cachin F., Boisgard S., Vidal A., Filaire M., Auzeloux P., Culot D., Askienazy S., Madelmont J.C., Chezal J.M., Miot-Noirault E., First *ex-vivo* study demonstrating that ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer binds to human articular cartilage, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2011**, 38, 2077-2082

Cai W., Wu Y., Chen K., Cao Q., Tice D.A., Chen X., *In vitro* and *in vivo* characterization of ⁶⁴Cu-labeled Abegrin™, a humanized monoclonal antibody against integrin $\alpha_v\beta_3$, *Cancer Res.*, **2006**, 66(19), 9673-9681

Caraglia M., Marra M., Misso G., Lamberti M., Salzano G., De Rosa G., Abbruzzese A., Tumour-specific uptake of anti-cancer drugs : the future is here, *Curr. Drug Metab.*, **2012**, 13, 4-21

Caravan P., Ellison J.J., McMurry T.J., Lauffer R.B., Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics and applications, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293-2352

- Carter J.D., Cheng N.N., Qu Y., Suarez G.D., Guo T., Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111(40), 11622-11625
- Chang C.A., Francesconi L.C., Malley M.F., Kumar K., Gougoutas J.Z., Tweedle M.F., Synthesis, characterization and crystal structures of M(DO3A) (M = Fe, Gd) and Na[M(DOTA)] (M = Fe, Y, Gd), *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3501-3508
- Chang H.I., Yeh M.K., Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy, *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, 7, 49-60
- Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S., Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering, *Nat. Clin. Pract. Rheum.*, **2006**, 2(7), 373-382
- Cheng Y., Zhao L., Li Y., Xu T., Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2673-2703
- Cheon J., Lee J.H., Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41(12), 1630-1640
- Cherry S.R., Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble ?, *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **2006**, 8, 35-62
- Chezal J.M., Papon J., Labarre P., Lartigue C., Galmier M.J., Decombat C., Chavignon O., Maublant J., Teulade J.C., Madelmont J.C., Moins N., Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3133-3144
- Chien C.C., Cheng C.C., Chen H.H., Hwu Y., Chu Y.S., Petibois C., Chen A., Ching Y.T., Margaritondo G., X-ray microscopy and tomography detect the accumulation of bare and PEG-coated gold nanoparticles in normal and tumor mouse tissues, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 404, 1287-1296
- Choi H.S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J.P., Ipe B.I., Bawendi M.G., Frangioni J.V., Renal clearance of quantum dots, *Nat. Biotechnol.*, **2007**, 25(10), 1165-1170
- Colombo M., Bianchi A., Click chemistry for the synthesis of RGD-containing integrin ligands, *Molecules*, **2010**, 15, 178-197
- Connell P.P., Hellman S., Advances in radiotherapy and implications for the next century: a historical perspective, *Cancer Res.*, **2009**, 69(2), 383-392
- Corcoran T.E., Thomas K.M., Myerburg M.M., Muthukrishnan A., Weber L., Frizzell R., Pilewski J.M., Absorptive clearance of DTPA as an aerosol-based biomarker in the cystic fibrosis airway, *Eur. Respir. J.*, **2010**, 35, 781-786
- Corti A., Pastorino F., Curnis F., Arap W., Ponzoni M., Pasqualini R., Targeted drug delivery and penetration into solid tumors, *Med. Res. Rev.*, **2012**, 32(5), 1078-1091
- Crielaard B.J., Lammers T., Schiffelers R.M., Storm, G. Drug targeting systems for inflammatory disease: one for all, all for one, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 225-234
- Culver J., Akers W., Achilefu S., Multimodality molecular imaging with combined optical and SPECT/PET modalities, *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49(2), 169-172
- D**
- Dadachova E., Nosanchuk J.D., Shi L., Schweitzer A.D., Frenkel A., Nosanchuk J.S., Casadevall A., Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin, *PNAS*, **2004**, 101(41), 14865-14870
- Danhier F., Feron O., Pr at V., To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J. Control. Release*, **2010**, 148, 135-146
- Danhier F., Pourcelle V., Marchand-Brynaert J., J r me C., Feron O., Pr at V., Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles, *Methods Enzymol.*, **2012**, 508, 157-175
- Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H.J., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A., Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles, *Nature*, **2010**, 464, 1067-1071

Debergh I., Vanhove C., Ceelen W., Innovation in cancer imaging, *Eur. Surg. Res.*, **2012**, 48, 121-130

Desbois N., Gardette M., Papon J., Labarre P., Maisonia A., Auzeloux P., Lartigue C., Bouchon B., Debiton E., Blache Y., Chavignon O., Teulade J.C., Maublant J., Madelmont J.C., Moins N., Chezal J.M., Design, synthesis and preliminary biological evaluation of acridine compounds as potential agents for a combined targeted chemo-radionuclide therapy approach to melanoma, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 7671-7690

Dijkgraaf I., Rijnders A.Y., Soede A., Dechesne A.C., van Esse G.W., Brouwer A.J., Corstens F.H.M., Boerman O.C., Rijkers D.T.S., Liskamp R.M.J., Synthesis of DOTA-conjugated multivalent cyclic-RGD peptide dendrimers via 1,3-dipolar cycloaddition and their biological evaluation: implications for tumor targeting and tumor imaging purposes, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 935-944

Doane T.L., Burda C., The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2885-2911

Dobrucki L.W., de Muinck E.D., Lindner J.R., Sinusas A.J., Approaches to multimodality imaging of angiogenesis, *J. Nucl. Med.*, **2010**, 51, 66S-79S

Drahoš B., Lukeš I., Tóth É., Manganese(II) complexes as potential contrast agents for MRI, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1975-1986

Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D., Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacol. Rev.*, **1999**, 51(4), 691-743

Duncan B., Kim C., Rotello V.M., Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems, *J. Control. Release*, **2010**, 148, 122-127

E

e-cancer : <http://www.e-cancer.fr>

Edwards D.A., Steric hindrance effects on surface reactions: applications to BIAcore, *J. Math. Biol.*, **2007**, 55, 517-539

Eisenhut M., Hull W.E., Mohammed A., Mier W., Lay D., Just W., Gorgas K., Lehmann W.D., Haberkorn U.,

Radioiodinated N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivatives with high melanoma uptake: Structure-affinity relationships, metabolic fate, and intracellular localization, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 3913-3922

F

Fani M., Psimadas D., Zikos C., Xanthopoulos S., Loudos G.K., Bouziotis P., Varvarigou A.D., Comparative evaluation of linear and cyclic ^{99m}Tc-RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis, *Anticancer Res.*, **2006**, 26, 431-434

Farouk N., Radioiodination of (N-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide (IBZA) as a new potent melanoma imaging and therapeutic agent via isotopic exchange reaction, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2011**, 289, 7-11

Fass L., Imaging and Cancer: a review, *Mol. Oncol.*, **2008**, 2, 115-152

Faure A.C., Fonctionnalisation de nanoparticules multifonctionnelles en vue d'un ciblage biologique, Thèse : Chimie : Lyon : **2008**

Faure A.C., Dufort S., Josserand V., Perriat P., Coll J.L., Roux S., Tillement O., Control of the *in vivo* biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings, *Small*, **2009**, 5(22), 2565-2575

Ferrand A.C., Complexes luminescents de lanthanides avec des dérivés du cyclène comme briques pour l'ingénierie de sondes analytiques biomédicales, Thèse : Chimie et Génie chimique : Lausanne : **2004**

Ferrara N., Kerbel R.S., Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature*, **2005**, 438, 967-974

Fluorescence Imaging – Principles and Methods, Handbook, *Amersham Biosciences*, **2002**, 63-0035-28

Fomina I.G., Dobrokhotova Z.V., Kazak V.O., Aleksandrov G.G., Lysenko K.A., Puntus L.N., Gerasimova V.I., Bogomyakov A.S., Novotortsev V.M., Eremenko I.L., Synthesis, structure, thermal stability and magnetic luminescence properties of dinuclear lanthanide(III) pivalates with chelating N-donor ligands, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 3595-3610

Fox M.E., Szoka F.C., Fréchet J.M., Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: the importance of molecular architecture, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42(8), 1141-1151

Frangioni J.V., New technologies for human cancer imaging, *J. Clin. Oncol.*, **2008**, vol. 26, n°24, 4012-4021

G

Gaertner F.C., Kessler H., Wester H.J., Schwaiger M., Beer A.J., Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, 39, S126-S138

GE Healthcare®, Amersham CyDye™ monoreactive NHS esters, Reagents for the labelling of biological compounds with Cy™ monofunctional dyes, Product Booklet

Gelderblom H., Hogendoorn P.C.W., Dijkstra S.D., van Rijswijk C.S., Krol A.D., Taminiau A.H.M., Bovée J.V.M.G., The clinical approach towards chondrosarcoma, *The Oncologist*, **2008**, 13, 320-329

Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N.Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C.R., Nohadani M., Eklund A.C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P.A., Swanton C., Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing, *N. Engl. J. Med.*, **2012**, 366;10, 883-892

Ghosh T., Williams L., Mastrangelo C.H., Label-free detection of protein binding with multisine SPR microchips, *Lab. Chip*, **2011**, 11, 4194-4199

Giraud I., Rapp M., Maurizis J.C., Madelmont J.C., Application to a cartilage targeting strategy: synthesis and *in vivo* biodistribution of ¹⁴C-labeled quaternary ammonium–glucosamine conjugates, *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11, 212-218

GLOBOCAN 2008 : <http://globocan.iarc.fr/>

Goutayer M., Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques : étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*,

Thèse : Chimie Physique et Chimie Analytique : Paris : **2008**

Goutayer M., Dufort S., Josserand V., Royère A., Heinrich E., Vinet F., Bibette J., Coll J.L., Texier I., Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles : assessment by *in vivo* fluorescence imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2010**, 75, 137-147

Guo X., Huang L., Recent advances in nonviral vectors for gene delivery, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 45(7), 971-979

H

Hagan A.K., Zuchner T., Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 400, 2847-2864

Hahn M.A., Singh A.K., Sharma P., Brown S.C., Moudgil B.M., Nanoparticles as contrast agents for *in-vivo* bioimaging: current status and future perspectives, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 3-27

Hainfeld J.F., Dilmanian F.A., Zhong Z., Slatkin D.N., Kalef-Ezra J.A., Smilowitz H.M., Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma, *Phys. Med. Biol.*, **2010**, 55, 3045-3059

Hamblin M.R., Demidova T.N., Mechanisms of low level light therapy, *Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*, **2006**, vol. 6140, 12 pages

Han H.D., Mangala L.S., Lee J.W., Shahzad M.M.K., Kim H.S., Shen D., Nam E.J., Mora E.M., Stone R.L., Lu C., Lee S.J., Roh J.W., Nick A.M., Lopez-Berestein G., Sood A.K., Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles, *Clin. Cancer Res.*, **2010**, 16(15), 3910-3922

Harrison A.G., Siu K.W.M., El Aribi H., Amide bond cleavage in deprotonated tripeptides: a newly discovered pathway to "b2 ions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17, 869-875

Haubner R., Gratias R., Diefenbach B., Goodman S.L., Jonczyk A., Kessler H., Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 7461-7472

Haubner R., Wester H.J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stöcklin G.,

- Schwaiger M., Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists : A new class of tracers for tumor targeting, *J. Nucl. Med.*, **1999**, 40, 1061-1071
- Heidel J.D., Schluep T., Cyclodextrin-containing polymers: versatile platforms of drug delivery materials, *J. Drug Deliv.*, **2012**, 17 pages
- Hellebust A., Richards-Kortum R., Advances in molecular imaging: targeted optical contrast agents for cancer diagnostics, *Nanomedicine*, **2012**, 7(3), 429-445
- Hemmer E., Venkatachalam N., Hyodo H., Soga K., The role of pH in PEG-b-PAAC modification of gadolinium oxide nanostructures for biomedical applications, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, **2012**, 15 pages
- Hermann P., Kotek J., Kubiček V., Lukeš I., Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes, *Dalton Trans.*, **2008**, 3027-3047
- Hermanson G.T., *Bioconjugate Techniques*; 2nd Edition; Academic Press: London, **2008**
- Hillman B.J., Introduction to the special issue on medical imaging in oncology, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, vol. 24, n°20, 3223-3224
- Hooke R., Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon, publié par J. Martyn et J. Allestry, imprimeurs de la "Royal Society", Londres, **1665**
- Hu S., Zhang Y., Endostar-loaded PEG-PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Nanomedicine*, **2010**, 5, 1039-1048
- Hutteman M., van der Vorst J.R., Mieog J.S.D., Bonsing B.A., Hartgrink H.H., Kuppen P.J.K., Löwik C.W.G.M., Frangioni J.V., van de Velde C.J.H., Vahrmeijer A.L., Near-infrared fluorescence imaging in patients undergoing pancreaticoduodenectomy, *Eur. Surg. Res.*, **2011**, 47, 90-97
- Hwang F.M., Chen H.Y., Chen P.S., Liu C.S., Chi Y., Shu C.F., Wu F.I., Chou P.T., Peng S.M., Lee G.H., Iridium(III) complexes with orthometalated quinoxaline ligands: subtle tuning of emission to the saturated red color, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 1344-1353
- /
- Idée J.M., Port M., Raynal I., Schaefer M., Le Greneur S., Corot C., Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging : a review, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2006**, 20, 563-576
- Imai K., Takaoka A., Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6(9), 714-727
- INCa (Institut National du Cancer), Comprendre la radiothérapie, oct. **2009**
- Ings R.M., The melanin binding of drugs and its implications, *Drug Metab. Rev.*, **1984**, 15, 1183-1212
- Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) : <http://www.inserm.fr/thematiques/circulation-metabolisme-nutrition/dossiers-d-information/arthrose> et http://wiki.pingry.org/u/ap-biology/index.php/Extracellular_matrix
- ℥
- Jackson S.P., Bartek J., The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, **2009**, 461(22), 1071-1078
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, 61, 69-90
- Jennings L.E., Long N.J., 'Two is better than one' – probes for dual-modality molecular imaging, *Chem. Commun.*, **2009**, 3511-3524
- Jimbow K., Miyake Y., Homma K., Yasuda K., Izumi Y., Tsutsumi A., Ito S., Characterization of melanogenesis and morphogenesis of melanosomes by physicochemical properties of melanin and melanosomes in malignant melanoma, *Cancer Res.*, **1984**, 44, 1128-1134
- Johnson L.L., Schofield L., Donahay T., Bouchard M., Poppas A., Haubner R., Radiolabeled RGD peptides to image angiogenesis in swine model of hibernating myocardium, *JACC Cardiovasc. Imaging*, **2008**, 1, 500-510

Jokanović V., Draminčanin M.D., Andrić Ž., Nanodesigning of SiO₂: Eu³⁺ particles obtained by spray pyrolysis method and their luminescence properties, *Acta Chim. Slov.*, **2006**, 53, 23-28

Joshi M.D., Unger W.J., Storm G., van Kooyk Y., Mastrobattista E., Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 25-37

K

Kafka A.P., Rades T., McDowell A., Rapid and specific high-performance liquid chromatography for the *in vitro* quantification of D-Lys⁶-GnRH in a microemulsion-type formulation in the presence of peptide oxidation products, *Biomed. Chromatogr.*, **2010**, 24, 132-139

Kamaly N., Xiao Z., Valencia P.M., Radovic-Moreno A.F., Farokhzad O.C., Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2971-3010

Kaminskas L.M., McLeod V.M., Porter C.J.H., Boyd B.J., Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation, *Mol. Pharm.*, **2012**, 9, 355-373

Kämmerer P.W., Heller M., Brieger J., Klein M.O., Al-Nawas B., Gabriel M., Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation, *Eur. Cell Mater.*, **2011**, 21, 364-372

Keefe A.D., Pai S., Ellington A., Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9(7), 537-550

Kelkar S.S., Reineke T.M., Theranostics: combining imaging and therapy, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 1879-1903

Kennesaw State University – Exceeding expectations / Cisplatin 19. Cancer : <http://chemcases.com/cisplat/cisplat19.htm>

Kim J., Hong S.Y., Park H.S., Kim D.S., Lee W., Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins, *Moll. Cells*, **2004**, Vol.19, No. 2, 205-211

Kluza E., van der Schaft D.W.J., Hautvast P.A.I., Mulder W.J.M., Mayo K.H., Griffioen A.W., Strijkers G.J., Nicolay K., Synergistic targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin and Galectin-1 with heteromultivalent paramagnetic liposomes for combined MR Imaging and treatment of angiogenesis, *Nano Lett.*, **2010**, 10, 52-58

Kok R.J., Schraa A.J., Bos E.J., Moorlag H.E., Ásgeirsdóttir S.A., Everts M., Meijer D.K.F., Molema G., Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha_v\beta_3$ integrin directed therapeutics, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 128-135

Koo H., Huh M.S., Sun I.C., Yuk S.H., Choi K., Kim K., Kwon I.C., *In vivo* targeted delivery of nanoparticles for theranosis, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 1018-1028

Kwon I.K., Lee S.C., Han B., Park K., Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors, *J. Control. Release*, **2012**, 164(2), 108-114

L

Lammers T., Aime S., Hennink W.E., Storm G., Kiessling F., Theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 1029-1038

Lammers T., Kiessling F., Hennink W.E., Storm G., Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 175-187

Langereis S., de Lussanet Q.G., van Genderen M.H.P., Meijer E.W., Beets-Tan R.G.H., Griffioen A.W., van Engelshoven J.M.A., Backes W.H., Evaluation of Gd(III)DTPA-terminated poly(propylene imine) dendrimers as contrast agents for MR imaging, *NMR Biomed.*, **2006**, 19, 133-141

Laraillet V., Vorobyev A., Brunet C., Lemoine J., Tsybin Y.O., Antoine R., Dugourd P., Comparative dissociation of peptide polyanions by electron impact and photo-induced electron detachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2010**, 21, 670-680

Lawaetz A.J., Stedmon C.A., Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water, *Applied Spectrosc.*, **2009**, 63, 936-940

Le Duc G., Miladi I., Alric C., Mowat P., Bräuer-Krisch E., Bouchet A., Khalil E., Billotey C., Janier M., Lux F., Epicier T., Perriat P., Roux S., Tillement O., Toward an image-

- guided microbeam radiation therapy using gadolinium based nanoparticles, *ACS Nano*, **2011**, vol. 5, n°12, 9566-9574
- Lechtman E., Chattopadhyay N., Cai Z., Mashouf S., Reilly R., Pignol J.P., Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location, *Phys. Med. Biol.*, **2011**, 56, 3631-4647
- Lee G.H., Chang Y., Kim T.J., Blood-pool and targeting MRI contrast agents: from Gd-chelates to Gd-nanoparticles, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 1924-1933
- Lee M.H., Kim J.Y., Han J.H., Bhuniya S., Sessler J.L., Kang C., Kim J.S., Direct fluorescence monitoring of the delivery and cellular uptake of a cancer-targeted RGD peptide-appended naphthalimide theragnostic prodrug, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 12668-12674
- Lee B.W., Schubert R., Cheung Y.K., Zannier F., Wei Q., Sacchi D., Sia S.K., Strongly binding cell-adhesive polypeptides of programmable valencies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1971-1975
- Lee Y.S., Radiopharmaceuticals for molecular imaging, *Open. Nucl. Med. J.*, **2010**, 2, 178-185
- Les RX dans l'imagerie médicale : <http://tpe-rayonsx-imagerie-medicale.e-monsite.com/pages/ii-les-consequences-de-l-utilisation-des-rayons-x-sur-le-patient.html>
- Li Y., Beija M., Laurent S., vander Elst L., Muller R.N., Duong H.T.T., Lowe A.B., Davis T.P., Boyer C., Macromolecular ligands for gadolinium MRI contrast agents, *Macromolecules*, **2012**, 45, 4196-4204
- Li Z.H., Cho C.H., Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery, *J. Transl. Med.*, **2012**, 10(Suppl. 1), 9 pages
- Liedberg B., Nylander C., Lundström I., Biosensing with surface plasmon resonance – How it all started, *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, 10(8), i-ix
- Ligue contre le cancer : <http://www.ligue-cancer.net/>
- Lim W.T., Tan E.H., Toh C.K., Hee S.W., Leong S.S., Ang P.C.S., Wong N.S., Chowbay B., Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol®-PM) in patients with solid tumors, *Ann. Oncol.*, **2010**, 21, 382-388
- Lin R.Y., Dayananda K., Chen T.J., Chen C.Y., Liu G.C., Lin K.L., Wang Y.M., Targeted RGD nanoparticles for highly sensitive in vivo integrin receptor imaging, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2012**, 7, 7-18
- Lin S., Lee A.S.Y., Lin C.C., Lee C.K., Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction with Surface Plasmon Resonance, *Curr. Proteomics*, **2006**, 3, 271-282
- Liu S., Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20(12), 2199-2213
- Liu W., Shen S.M., Zhao X.Y., Chen G.Q., Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, **2012**, 3(2), 165-178
- Liu Z., Kiessling F., Gätjens J., Advanced nanomaterials in multimodal imaging: design, functionalization and biomedical applications, *J. Nanomater.*, **2010**, 1-16
- Llevot A., Astruc D., Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 242-257
- Longo D.L., Tumor heterogeneity and personalized medicine, *N. Engl. J. Med.*, **2012**, 366;10, 956-957
- Louie A., Multimodality imaging probes: design and challenges, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 3146-3195
- Louis C., Bazzi R., Marquette C.A., Bridot J.L., Roux S., Ledoux G., Mercier B., Blum L., Perriat P., Tillement O., Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling, *Chem. Mater.*, **2005**, 17, 1673-1682
- Louis C., Synthèse et caractérisation de nanoparticules hybrides à cœur d'oxyde de gadolinium, Thèse : Chimie : Lyon : **2004**
- Lu Z.R., Wang X., Parker D.L., Goodrich K.C., Buswell H.R., Poly-(L-glutamic acid) Gd(III)-DOTA conjugate with a degradable spacer for magnetic resonance imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 715-719
- Lux F., Mignot A., Mowat P., Louis C., Dufort S., Bernhard C., Denat F., Boschetti F., Brunet C., Antoine R., Dugourd

P., Laurent S., Vander Elst L., Muller R., Sancey L., Josserand V., Coll J.L., Stupard V., Barbier E., Rémy C., Broisat A., Ghezzi C., Le Duc G., Roux S., Perriat P., Tillement O., Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 12299-12303

M

Ma X., Zhao Y., Liang X.J., Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceuticals, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(10), 1114-1122

Mackie E.J., Tatarczuch L., Mirams M., The skeleton : a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification, *J. Endocrinol.*, **2011**, 211, 109-121

Madelmont J.C., Chezal J.M., Chavignon O., Teulade J.C., Moins N., Labelled analogues of halobenzamides as radiopharmaceuticals. World patent, WO2008012782, **2008**

Mahmood M., Casciano D., Xu Y., Biris A.S., Engineered nanostructural materials for application in cancer biology and medicine, *J. Appl. Toxicol.*, **2012**, 32, 10-19

Mammen M., Choi S.K., Whitesides G.M., Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794

Manish G., Vimukta S., Targeted drug delivery system: a review, *Res. J. Chem. Sci.*, **2011**, 1(2), 135-138

Mas-Moruno C., Rechenmacher F., Kessler H., Cilengitide : the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. Design, synthesis and clinical evaluation, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2010**, 10, 753-768

Matsumoto K., Time-resolved luminescence microscopy and microarray using Europium chelate labels, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Méndez-Vilas A. and Díaz J. (Eds.), Formatex **2010**

Matsuo M., Kanematsu M., Itoh K., Ito K., Maetani Y., Kondo H., Kako N., Matsunaga N., Hoshi H., Shiraishi J., Detection of malignant hepatic tumors: comparison of gadolinium- and Ferumoxide-enhanced MR imaging, *AJR Am. J. Roentgenol.*, **2001**, 177, 637-643

Maurizis J.C., Rapp M., Nicolas C., Ollier M., VERNY M., Madelmont J.C., Disposition in rats of N-pyridinium-propyl-cyclam, N-triethylammonium-propyl-cyclam, and N-[triethylammonium]-3-propyl-15[ane]-N5, potential cartilage imaging agents, *Drug Metab. Dispos.*, **2000**, 28(4), 418-422

McClain S.E., Mayo K.B., Shada A.L., Smolkin M.E., Patterson J.W., Slingluff C.L. Jr., Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences. *Int. J. Dermatol.* **2012**, 51, 420-426

Merdith P., Powell B.J., Riesz J., Nighswander-Rempel S.P., Pederson M.R., Moore E.G., Towards structure-property-function relationships for eumelanin, *Soft Matter*, **2006**, 2, 37-44

Microscopy Resource Center – Fluorescence excitation and emission fundamentals : <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/fluoroexciteemit.html>

Mignot A., A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications, Thèse : Chimie : Lyon : **2012**

Miot-Noirault E., Gouin F., Vidal A., Rapp M., Maublant J., Askienazy S., Chezal J.M., Heymann D., Redini F., Moins N., First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc-NTP 15-5 radiotracer, *J. Nucl. Med.*, **2009**, vol. 50, n°9, 1541-1547

Miot-Noirault E., Vidal A., Auzeloux P., Peyrode C., Madelmont J.C., Chezal J.M., *In vivo* scintigraphic imaging of proteoglycans, Book title: Proteoglycans: Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, **2012**, vol. 836, 183-198, DOI: 10.1007/978-1-61779-498-8_13

Moins N., D'Incan M., Bonafous J., Bacin F., Labarre P., Moreau M.F., Mestas D., Noirault E., Chossat F., Berthommier E., Papon J., Bayle M., Souteyrand P., Madelmont J.C., Veyre A., ¹²³I-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide: a potential imaging agent for cutaneous melanoma staging, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2002**, 29, 1478-1484

Montet X., Montet-Abou K., Reynolds F., Weissleder R., Josephson L., Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells, *Neoplasia*, **2006**, 8, 214-222

Moore E.G., Samuel A.P.S., Raymond K.N., From antenna to assay: lessons learned in lanthanide luminescence, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42(4), 542-552

Morales-Avila E., Ferro-Flores G., Ocampo-García B.E., De León-Rodríguez L.M., Santos-Cuevas C.L., García-Becerra R., Medina L.A., Gómez-Oliván L., Multimeric system of ^{99m}Tc -labeled gold nanoparticles conjugated to c[RGDFK(C)] for molecular imaging of tumor $\alpha_v\beta_3$ expression, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 913-922

Moura C., Esteves T., Gano L., Raposinho P.D., Paulo A., Santos I., Synthesis, characterization and biological evaluation of tricarbonyl M(I) (M = Re, ^{99m}Tc) complexes functionalized with melanin-binding pharmacophores, *New. J. Chem.*, **2010**, 34, 2564-2578

Mowat P., Mignot A., Rima W., Lux F., Tillement O., Roulin C., Dutreix M., Bechet D., Huger S., Humbert L., Barberi-Heyob M., Aloy M.T., Armandy E., Rodriguez-Lafrasse C., Le Duc G., Roux S., Perriat P., *In vitro* radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2011**, 11, 1-7

My Cancer Genome, Overview on targeted therapies for cancer : <http://www.mycancergenome.org/content/other/molecular-pathology/overview-on-targeted-therapies-for-cancer>

N

Nakajima N., Ikada Y., Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, 6, 123-130

NNI : <http://www.nano.gov/>

NCI : National Cancer Institute (USA) : <http://www.cancer.gov/>

NEMA – US Oncology : Medical imaging in cancer care: Charting the progress, **2006** : www.medicalimaging.org

Nguyen L.V., Vanner R., Dirks P., Eaves C.J., Cancer stem cells : an evolving concept, *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, 12, 133-143

Nonat A., Complexes de Lanthanides(III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes, Thèse : Chimie : Grenoble : **2007**

Nussenbaum F., Herman I.M., Tumor angiogenesis: Insights and innovations, *J. Oncol.*, **2010**, 24 pages

O

Olafsen T., Wu A.M., Antibody vectors for imaging, *Semin. Nucl. Med.*, **2010**, 40(3), 167-181

OMS : <http://www.who.int/fr/>

Orive G., Ali O.A., Anitua E., Pedraz J.L., Emerich D.F., Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, 1806(1), 96-107

Othman M., Desmaële D., Couvreur P., Vander Elst L., Laurent S., Muller R.N., Bourgaux C., Morvan E., Pouget T., Lepêtre-Mouelhi S., Durand P., Gref R., Synthesis and physicochemical characterization of new squalenoyl amphiphilic gadolinium complexes as nanoparticle contrast agents, *Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 4367-4386

P

Paganin-Gioanni A., Bellard E., Paquereau L., Ecochard V., Golzio M., Tessié J., Fluorescence imaging agents in cancerology, *Radiol. Oncol.*, **2010**, 44(3), 142-148

Paizs B., Suhai S., Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom. Rev.*, **2005**, 24, 508-548

Park K., Lee S., Kang E., Kim K., Choi K., Kwon I.C., New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy, *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, 19, 1553-1566

Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2, 751-760

Pericleous P., Gazouli M., Lyberopoulou A., Rizos S., Nikiteas N., Efsthopoulos E.P., Quantum dots hold promise for early cancer imaging and detection, *Int. J. Cancer*, **2012**, 131, 519-528

Perlin L., MacNeil S., Rimmer S., Production and performance of biomaterials containing RGD peptides, *Soft Matter*, **2008**, 4, 2331-2349

Perrault S.D., Walkey C., Jennings T., Fischer H.C., Chan W.C.W., Mediating tumor targeting efficiency of

nanoparticles through design, *Nano Lett.*, **2009**, 9(5), 1909-1915

Peyrode C., Gouin F., Vidal A., Auzeloux P., Besse S., Dauplat M.M., Askienazy S., Heymann D., Chezal J.M., Redini F., Miot-Noirault E., A « proteoglycan targeting strategy » for the scintigraphic imaging and monitoring of the swarm rat chondrosarcoma orthotopic model, *Sarcoma*, **2011**, 8 pages

Peyrode C., Weber V., David E., Vidal A., Auzeloux P., Communal Y., Dauplat M.M., Besse S., Gouin F., Heymann D., Chezal J.M., Redini F., Miot-Noirault E., Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: *in vitro* and *in vivo* preclinical studies, *Invest. New Drugs*, **2012**, vol. 30, n°4, 1782-1790

Pham T.Q., Greguric I., Liu X., Berghofer P., Ballantyne P., Chapman J., Mattner F., Dikic B., Jackson T., Loc'h C., Katsifis A., Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3561-3572

Pharmacology – Cancer radiotherapy : <http://cology4u.blogspot.fr/2011/06/cancer-radiotherapy.html>

Pimlott S.L., Sutherland A., Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 149-162

Pittet L., Altreuter D., Ilyinskii P., Fraser C., Gao Y., Baldwin S., Keegan M., Johnston L., Kishimoto T., Development and preclinical evaluation of SEL-068, a novel targeted Synthetic Vaccine Particle (tSVP™) for smoking cessation and relapse prevention that generates high titers of antibodies against nicotine, *J. Immunol.*, **2012**, 188, 75.11

Podgorsak E.B., Radiation oncology physics: A handbook for teachers and students, *International Atomic Energy Agency*, **2005**

Pradhan A.K., Nahar S.N., Montenegro M., Yu Y., Zhang H.L., Sur C., Mroziak M., Pitzer R.M., Resonant X-ray enhancement of the Auger effect in high-Z atoms, molecules and nanoparticles: potential biomedical applications, *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, 12356-12363

Prager G.W., Poettler M., Angiogenesis in cancer – Basic mechanisms and therapeutic advances, *Hämostaseologie*, **2012**, 2, 105-114

Premkumar A., Marincola F., Taubenberger J., Chow C., Venzon D., Schwartzentruber D., Metastatic melanoma: correlation of MRI characteristics and histopathology. *J. Magn. Reson. Imaging* **1996**, 6, 190-194

Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire : http://www.dossier-irm.fr/le_principe_de_la_resonance_magnetique_nucleaire.html

Q

Quantum diaries, The hidden face of CERN : <http://www.quantumdiaries.org/2012/02/15/the-hidden-face-of-cern/>

R

Rahman W.N., Bishara N., Ackerly T., He C.F., Jackson P., Wong C., Davidson R., Geso M., Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy, *Nanomedicine*, 2009, 5(2), 136-142

Revskaya E., Jongco A.M., Sellers R.S., Howell R.C., Koba W., Guimaraes A.J., Nosanchuk J.D., Casadevall A., Dadachova E., Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine, *Clin. Cancer Res.*, **2009**, 15(7), 2373-2379

Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E., Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1996**, 47, 555-606

Roux S., Tillement O., Billotey C., Coll J.L., Le Duc G., Marquette C., Perriat P., Multifunctional nanoparticles: from the detection of biomolecules to the therapy, *Int. J. Nanotechnology*, **2010**, 7(4-8), 781-801

Ruoslahti E., Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles, *Adv. Mater.*, **2012**, 24, 3747-3756

Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J., Targeting of drugs and nanoparticles to tumors, *J. Cell Biol.*, **2010**, 188(6), 759-768

S

Sancey L., Garanger E., Foillard S., Schoehn G., Hurbin A., Albiges-Rizo C., Boturyn D., Souchier C., Grichine A., Dumy P., Coll J.L., Clustering and internalization of integrin

$\alpha_v\beta_3$ with a tetrameric RGD-synthetic peptide, *Molecular Therapy*, **2009**, 17(5), 837-43

Sanfinna : <http://www.sanfinna.com/?tag=sel-068>

Sanofi-Aventis : <http://www.sanofi.fr/fr/fr/index.jsp>

Schaafsma B.E., Mieog J.S.D., Hutteman M., van der Vorst J.R., Kuppen P.J.K., Löwik C.W.G.M., Frangioni J.V., van de Velde C.J.H., Vahrmeijer A.L., The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery, *J. Surg. Oncol.*, **2011**, 104, 323-332

Schäferling M., The art of fluorescence imaging with chemical sensors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 3532-3554

Schottelius M., Laufer B., Kessler H., Wester H.J., Ligands for mapping $\alpha_v\beta_3$ -integrin expression in vivo, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42(7), 969-980

Shah N.B., Vercellotti G.M., White J.G., Fegan A., Wagner C.R., Bischof J.C., Blood-nanoparticle interactions and in vivo biodistribution: impact of surface PEG and ligand properties, *Mol. Pharmaceutics*, **2012**, 9, 2146-2155

Shanmuganathan K., Cho J.H., Iyer P., Baranowitz S., Ellison C.J., Thermooxidative stabilization of polymers using natural and synthetic melanins, *Macromolecules*, **2011**, 44, 9499-9507

Sheng Y., Yuan Y., Liu C., Tao X., Shan X., Xu F., In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with haemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2009**, 20, 1881-1891

Smith L., Kuncic Z., Ostrikov K.K., Kumar S., Nanoparticles in cancer imaging and therapy, *J. Nanomat.*, **2012**, 7 pages

Snoeks T.J.A., Löwik C.W.G.M., Kaijzel E.L., 'In vivo' optical approaches to angiogenesis imaging, *Angiogenesis*, **2010**, 13, 135-147

Solis A., Lara M.E., Rendon L.E., Photoelectrochemical properties of melanin, *Nature Precedings*, **2007**, 9 pages

Soloway A.H., Tjarks W., Bamum B.A., Rong F.G., Barth R.F., Codogni I.M., Wilson J.G., The chemistry of neutron capture therapy, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1515-1562

Song G., Wu H., Yoshino K., Zamboni W.C., Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs, *J. Liposome Res.*, **2012**, 22(3), 177-192

Sono K., Lye D., Moore C.A., Boyd W.C., Gorlin T.A., Belitsky J.M., Melanin-based coatings as lead-binding agents, *Bioinorg. Chem. Appl.*, **2012**, 10 pages

Soria J.C., Blay J.Y., Spano J.P., Pivot X., Coscas Y., Khayat D., Added value of molecular targeted agents in oncology, *Ann. Oncol.*, **2011**, 22, 1703-1716

Spencer S.L., Sorger P.K., Measuring and modelling apoptosis in single cells, *Cell*, **2011**, 144, 926-939

Stasinopoulos I., Penet M.F., Chen Z., Kakkad S., Glunde K., Bhujwalla Z.M., Exploiting the tumor microenvironment for theranostic imaging, *NMR Biomed*, **2011**, 24, 636-647

Stevens J.W., Patil S.R., Jordan D.K., Kimura J.H., Morcuende J.A., Cytogenetics of Swarm Rat Chondrosarcoma, *Iowa Orthop. J.*, **2005**, 25, 135-140

Strijkers G.J., Kluza E., Van Tilborg G.A.F., Mulder D.W.J., Nicolay K., Paramagnetic and fluorescent liposomes for target-specific imaging and therapy of tumor angiogenesis, *Angiogenesis*, **2010**, 13, 161-173

Summerfield S.G., Dale V.C.M., Despeyroux D.D., Jennings K.R., Charge remote losses of small neutrals from protonated and group 1 metal-peptide complexes of peptides, *Eur. Mass Spectrom.*, **1995**, 1, 183-194

Sun E.Y., Josephson L., Kelly K.A., Weissleder R., Development of nanoparticle libraries for biosensing, *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 109-113

Sutcliffe-Goulden J.L., O'Doherty M.J., Marsden P.K., Hart I.R., Marshall J.F., Bansal S.S., Rapid solid phase synthesis and biodistribution of ^{18}F -labelled linear peptides, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2002**, 29, 754-759

T

Taguchi Y., Takano E., Takeuchi T., SPR sensing of bisphenol A using molecularly imprinted nanoparticles

immobilized on a slab optical waveguide with consecutive parallel Au and Ag deposition bands coexistent with bisphenol 1 – immobilized Au nanoparticles, *Langmuir*, **2012**, 28, 7083-7088

Terasawa T., Dvorak T., Ip S., Raman G., Lau J., Trikalinos T.A., Systematic review: charged-particle radiation therapy for cancer, *Ann. Intern. Med.*, **2009**, 151, 556-565

Terwisscha van Scheltinga A.G.T., van Dam G.M., Nagengast W.B., Ntziachristos V., Hollema H., Herek J.L., Schröder C.P., Kosterink J.G.W., Lub-de Hoog M.N., de Vries E.G.E., Intraoperative near-infrared fluorescence tumor imaging with vascular endothelial growth factor and human epidermal growth factor receptor 2 targeting antibodies, *J. Nucl. Med.*, **2011**, 52(11), 1778-1785

Thermo Scientific – Fluorescent probes : <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4DD9D52E-5056-8A76-4E6E-E217FAD0D86B>

Thomas N., Photodynamic therapy targeting neuropilin-1 : interest of pseudopeptides with improved stability properties, *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 80(2), 226-235

Tomasi G., Turkheimer F., Aboagye E., Importance of quantification for the analysis of PET data in oncology : a review of current methods and trends for the future, *Mol. Imaging Biol.*, **2012**, 14, 131-146

Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D.E., Melanoma: from mutations to medicine, *Genes Dev.*, **2012**, 26, 1131-1155

U

Understanding the basic principles of Nuclear Magnetic Resonance Imaging : <http://physiology-physics.blogspot.fr/2010/06/understanding-basic-principles-of.html>

University of Virginia – Health System : <http://uvahealth.com/services/cancer-center/conditions-treatments/11731>

University of Wisconsin-Madison – School of pharmacy : Fluorescent polymeric micelles for image-guided surgical oncology : <http://www.pharmacy.wisc.edu/kwon-lab/fluorescent-polymeric-micelles-image-guided-surgical-oncology>

Uhrich K., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M., Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 3181-3198

V

Valeur B., Molecular Fluorescence: Principles and Applications, *Wiley-VCH Verlag GmbH*, **2001**, ISBNs : 3-527-29919-X (version papier), 3-527-60024-8 (version électronique)

Ventre M., Causa F., Netti P.A., Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials, *J. R. Soc. Interface*, **2012**, 9, 2017-2032

Villano J.L., Mehta D., Radhakrishnan L., Abraxane® induced life-threatening toxicities with metastatic breast cancer and hepatic insufficiency, *Invest. New Drugs*, **2006**, 24, 455-456

Visvader J.E., Cells of origin in cancer, *Nature*, **2011**, 469, 314-322

Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Benoit J.P., Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials*, **2006**, 27, 4356-4373

W

Wadas T.J., Deng H., Sprague J.E., Zheleznyak A., Weilbaecher K.N., Anderson C.J., Targeting of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for small-animal PET/CT of osteolytic bone metastases, *J. Nucl. Med.*, **2009**, 50, 1873-1880

Wadas T.J., Wong E.H., Weisman G.R., Anderson C.J., Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium and zirconium for PET and SPECT imaging disease, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2858-2902

Wagh A., Qian S.Y., Law B., Development of biocompatible polymeric nanoparticles for in vivo NIR and FRET imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 981-992

Wakamatsu K., Ito S., Advanced chemical methods in melanin determination, *Pigment Cell Res.*, **2002**, 15, 174-183

Wang A.Z., Gu F., Zhang L., Chan J.M., Radovic-Moreno A., Shaikh M.R., Langer R.S., Farokhzad O.C., *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2008**, 8(8), 1063-1070

Wang J., Byrne J.D., Napier M.E., DeSimone J.M., More effective nanomedicines through particle design, *Small*, **2011**, 7(14), 1919-1931

Wängler C., Maschauer S., Prante O., Schäfer M., Schirmacher R., Bartenstein P., Eisenhut M., Wängler B., Multimerization of cRGD peptides by click chemistry: synthetic strategies, chemical limitations, and influence on biological properties, *Chembiochem*, **2010**, 11, 2168-2181

Watt A.A.R., Bothma J.P., Meredith P., The supramolecular structure of melanin, *Soft Matter*, **2009**, 5, 3754-3760

Weis S.M., Cheresch D., Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets, *Nat. Med.*, **2011**, 17, 1359-1370

Weissleder R., Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, vol. 2

Weissleder R., Pittet M.J., Imaging in the era of molecular oncology, *Nature*, **2008**, 452, 580-589

Werner E.J., Datta A., Jocher C.J., Raymond K.N., High relaxivity MRI contrast agents: where coordination chemistry meets medical imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8568-8580

Wernick M.N., Aarsvold J.N., Emission Tomography: The fundamentals of PET and SPECT, *Elsevier Academic Press*, **2004**, 576 pages

Wester H.J., Kessler H., Molecular targeting with peptides or peptide-polymer conjugates: just a question of size ?, *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46(12), 1940-1945

Wood J.M., Jimbow K., Boissy R.E., Slominski A., Plonka P.M., Slawinski J., Wortsman J., Tosk J., What's the use of generating melanin ?, *Exp. Dermatol.*, **1999**, 8, 153-164

X

Xie J., Lee S., Chen X., Nanoparticle-based theranostic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2010**, 62(11), 1064-1079

Xu W., Luo T., Pang B., Li P., Zhou C., Huang P., Zhang C., Ren Q., Hu W., Fu S., The radiosensitization of melanoma cells by gold nanorods irradiated with MV X-ray, *Nano Biomed. Eng.*, **2012**, 4(1), 6-11

Y

Ye M., Wang Y., Qian M., Chen X., Hu X., Preparation and properties of the melanin from *Lachnum*, *Int. J. Basic Appl. Sci.*, **2011**, 11(3), 51-58

Yu M.K., Park J., Jon S., Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy, *Theranostics*, **2012**, 2(1), 3-44

Yuan L., Lin W., Yang Y., Chen H., A unique class of near-infrared functional fluorescent dyes with carboxylic-acid-modulated fluorescence ON/OFF switching: rational design, synthesis, optical properties, theoretical calculations, and applications for fluorescence imaging in living animals, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 1200-1211

Z

Zhang N., Yi R., Zhou L., Gao G., Shi R., Qiu G., Liu X., Lanthanide hydroxide nanorods and their thermal decomposition to lanthanide oxide nanorods, *Mater. Chem. Phys.*, **2009**, 114, 160-167

Zhang X.D., Wu D., Shen X., Chen J., Sun Y.M., Liu P.X., Liang X.J., Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy, *Biomaterials*, **2012**, 33(27), 6408-6419

Zhang X.X., Eden H.S., Chen X., Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates, *J. Control. Release*, **2012**, 159, 2-13

Zhang Y., Yang Y., Cai W., Multimodality imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression, *Theranostics*, **2011**, 1, 135-148

Zhu X., Wong W.K., Wong W.Y., Yang X., Design and synthesis of near-infrared emissive lanthanide complexes based on macrocyclic ligands, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 4651-4674

Zonios G., Dimou A., Bassukas I., Galaris D., Tsolakidis A., Kaxiras E., Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection, *J. Biomed. Opt.*, **2008**, 13(1), 8 pages

Résumé

Les SRPs (Small Rigid Platforms) sont des nanoparticules de taille inférieure à 5 nm, constituées d'une matrice de polysiloxane, à la surface de laquelle sont greffés de manière covalente des complexes de gadolinium. Les SRPs ont été développées pour des applications en imagerie multimodale, notamment en imagerie par résonance magnétique, en scintigraphie et en imagerie par fluorescence, ainsi que pour des applications en théranostic, et plus particulièrement, en radiosensibilisation.

L'objectif de la thèse consiste à fonctionnaliser les SRPs par des entités de ciblage, capables d'identifier et de se lier à des récepteurs surexprimés par les tumeurs ou par l'endothélium qui leur est associé. Plus précisément, trois molécules ciblantes ont été retenues : (i) le c(RGDfK) – un pentapeptide cyclique contenant le motif Arg-Gly-Asp ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de cellule endothéliale pour les protéines de la matrice extracellulaire et surexprimée par de nombreuses cellules cancéreuses, (ii) une molécule dérivée de la quinoxaline – ciblant la mélanine, sur-exprimée par de nombreux types de mélanomes (cancers de la peau), et (iii) un pyridinium – ciblant les protéoglycanes, sur-exprimés par le chondrosarcome (cancer du cartilage).

Les différentes molécules ciblantes ont alors été greffées en surface des SRPs afin d'optimiser leur accumulation et leur rétention au sein des tumeurs, et par conséquent, d'augmenter le potentiel de ces SRPs en tant qu'agents théranostiques. Le couplage covalent des différents vecteurs aux SRPs et leur quantification ont été mis en évidence par diverses techniques de caractérisation physicochimiques et complémentaires. Enfin, le ciblage des nanoparticules vectorisées a été démontré par plusieurs tests *in vitro* et/ou *in vivo* lors de nombreuses collaborations pour les trois différents vecteurs.

Abstract

SRPs (Small Rigid Platforms) are sub-5 nanometre nanoparticles, composed of a polysiloxane network surrounded by gadolinium chelates. SRPs have previously demonstrated their efficiency for multimodal imaging and theranostic applications, especially magnetic resonance imaging, scintigraphy, fluorescence imaging, and radiosensitization.

The purpose of this thesis deals with the functionalization of these SRPs by targeting entities able to recognize and to bind to receptors that are over-expressed by tumours or by the matching endothelium. More specifically, three targeting molecules drew our attention: (i) c(RGDfK) – a cyclic pentapeptide containing the Arg-Gly-Asp motif, able to target the $\alpha_v\beta_3$ integrin, an endothelial cell receptor for the proteins of the extracellular matrix and frequently expressed by tumour cells, (ii) a quinoxaline derivative – targeting melanin, which is over-expressed by melanomas (skin cancers) and (iii) a pyridinium moiety – targeting proteoglycans, which are over-expressed in chondrosarcoma (cartilage cancer).

The different targeting molecules were then grafted to the SRPs in order to maximize their accumulation and retention in tumours with the aim to enhance the SRP efficiency as theranostic agents. The covalent coupling of the different targeting molecules to the SRPs and their quantification were performed by various physicochemical characterization techniques. Finally, the targeting of the functionalized SRPs was highlighted by several *in vitro* and/or *in vivo* assays thanks to numerous successful collaborations.