



HAL
open science

Développement et caractérisation de nouveaux agents de contraste lipidiques ultrasensibles pour l'imagerie par résonance magnétique destinés à l'imagerie moléculaire

Bochra Chahid

► To cite this version:

Bochra Chahid. Développement et caractérisation de nouveaux agents de contraste lipidiques ultrasensibles pour l'imagerie par résonance magnétique destinés à l'imagerie moléculaire. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114867 . tel-01124083

HAL Id: tel-01124083

<https://theses.hal.science/tel-01124083>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : Pharmacotechnie et Biopharmacie

ANNÉE 2012 – 2013

SÉRIE DOCTORAT N°1218

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 20/12/2012

par

Bochra CHAHID

DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX
AGENTS DE CONTRASTE
LIPIDIQUES ULTRASENSIBLES POUR L'IMAGERIE PAR
RESONANCE MAGNETIQUE
DESTINES A L'IMAGERIE MOLECULAIRE

Directeur de thèse :
Malabry)

Sylviane LESIEUR

Directeur de recherche CNRS (Châtenay-

Composition du jury :

Rapporteurs :

Christine MENAGER
Laurent LEMAIRE

Professeur Université Pierre et Marie Curie
Ingénieur de Recherche Université d'Angers
Professeur Université Paris Sud (Paris 11)

Examineurs :

Catherine DUBERNET
Marc PORT
Célia BONNET

Directeur scientifique (GUERBET-Aulnay/Bois)
Chargée de Recherche CNRS (CBM-Orléans)

"Les sciences sont des serrures dont la clé est l'étude."

Proverbe arabe

A ma mère qui s'est toujours sacrifiée pour nous permettre d'étudier,
A mon père qui a cultivé en nous l'amour des sciences et de l'étude,
A mes sœurs qui m'ont toujours soutenue,
A toute ma famille.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612, dirigé par Monsieur Elias Fattal que je remercie pour la bienveillance et l'intérêt porté pour l'avancement de ma thèse, thèse encadrée par l'école doctorale ED 425 Innovation thérapeutique dirigée par Monsieur Marc Pallardy que je remercie pour sa bienveillante compréhension.

J'ai été accueillie au Laboratoire de Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés dirigé par Sylviane Lesieur, à qui va toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour m'avoir formée, et pour m'avoir soutenue et aidée dans les moments les moins évidents de cette thèse.

Un grand merci également à Marc Port de la société Guerbet pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche où j'ai appris la synthèse des complexes de lanthanides et où j'ai pu faire mes études de relaxivité ainsi que les dosages de mes agents lipoCEST. Merci également à Christelle Médina pour sa disponibilité et son implication lors des soutenances annuelles de l'IFSBM, formation pour laquelle Madame Catherine Dubernet s'est également impliquée par ses conseils judicieux et son intérêt appréciable lors des réunions pour le rapport annuel de cette même école. Un grand merci à toutes deux pour vos lumières et votre expérience de terrain qui m'ont souvent débloquée.

Merci à Luce Vanderelst et Robert Muller de l'Université de Mons-Hainaut et à Julien Flament et Fawzi Boumezbou du laboratoire NeuroSpin du CEA Saclay pour leur collaboration, leur accueil lors des diverses expériences de RMN et IRM, leur expertise et leur savoir-faire.

Je voudrais remercier Madame Christine Ménager et Monsieur Laurent Lemaire pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire en qualité de rapporteurs. Merci pour le temps et l'énergie que vous y avez consacré, pour vos encouragements et je tiens à souligner combien la curiosité, l'intérêt et les remarques personnelles de Monsieur Laurent Lemaire sur le sujet m'ont été agréables.

Je remercie également Mesdames Dubernet et Célia Bonnet pour l'intérêt qu'elles ont témoigné pour ce travail en acceptant de faire partie du jury de cette thèse.

Je souhaite remercier Elisabeth, Hayate, Claire, Gaëlle, Sylvaine et Jean-François des laboratoires Guerbet pour leur aide en laboratoire, pour leurs explications et leur patience, pour leur bonne humeur et leur sympathie. De même, je remercie Vincent qui m'a formé à la synthèse des liposomes au laboratoire à Chatenay, et tous les autres pour leur amitié et leur

bonne humeur. Merci à Claudie, Gérard, Angéline, Vincent, Jean-Jacques, ainsi que tous les doctorants et doctorantes et stagiaires pour le soutien mutuel, les moments agréables qui ont été partagés et la bonne humeur omniprésente.

Enfin, je souhaite exprimer ma reconnaissance à Sébastien KAH, mon supérieur hiérarchique au sein de Faurecia, entreprise dans laquelle j'ai eu la chance d'être embauchée pendant la rédaction de ma thèse. Merci pour toute la patience, la compréhension, et les encouragements que tu as eu la bienveillance de me prodiguer pendant cette période longue période.

Je me suis sentie honorée et chanceuse, Dieu merci, d'avoir eu la chance d'apprendre autant sur le plan scientifique, intellectuel et humain au cours de cette expérience exceptionnelle qu'est la conduite d'une thèse.

Merci donc à tous, à ceux que je cite comme à ceux que je ne cite pas, en espérant que mon oubli dans un tel cas me sera pardonné.

SOMMAIRE

<u>Introduction Générale</u>	<u>9</u>
<u>PARTIE I : Bibliographie</u>	<u>15</u>
<u>Introduction</u>	<u>17</u>
<u>I. De la RMN à l'IRM</u>	<u>19</u>
<u>I-1. Magnétisme de l'atome</u>	<u>19</u>
<u>I-2. Résonance et signal</u>	<u>23</u>
<u>I-3. Relaxation</u>	<u>27</u>
<u>I-4. Influence du temps de répétition TR sur le contraste et image pondérée T_1</u>	
<u>I-5. Conclusion</u>	<u>28</u>
<u>II. Les agents de contraste de relaxivité</u>	<u>31</u>
<u>II-1. Définitions et Principe</u>	<u>31</u>
<u>II-2. Les Agents de contraste de type T_1</u>	<u>39</u>
<u>II-3. Les Agents de contraste de type T_2</u>	<u>40</u>
<u>III. Les agents de contraste de type CEST</u>	<u>50</u>
<u>III-1. Effet CEST : principe</u>	<u>53</u>
<u>III-2. Spectroscopie CEST ou Z-spectroscopie</u>	<u>55</u>
<u>III-3. Imagerie CEST</u>	<u>59</u>
<u>III-4. Les agents CEST diamagnétiques ou agents DiaCEST</u>	<u>61</u>
<u>III-5. Les agents CEST paramagnétiques ou agents ParaCEST</u>	<u>69</u>
<u>IV. Les agents de contraste de type LipoCEST</u>	<u>87</u>
<u>IV-1. Liposomes et perméabilité membranaire</u>	<u>87</u>
<u>IV-2. Agents LipoCEST : principe et preuve de concept</u>	<u>98</u>
<u>IV-3. Agents LipoCEST non sphériques</u>	<u>105</u>

<u>PARTIE II : Méthodologie</u>	<u>121</u>
<u>I. Matières premières</u>	<u>123</u>
<u>I-1. Les lipides</u>	<u>123</u>
<u>I-2. Les milieux aqueux</u>	<u>125</u>
<u>I-3. Ligands</u>	<u>126</u>
<u>II. Synthèse et purification des complexes de lanthanides</u>	<u>127</u>
<u>II-1. Synthèse</u>	<u>127</u>
<u>II-2. Osmolarité des solutions de complexes</u>	<u>128</u>
<u>II-3. Electrophorèse capillaire de zone</u>	<u>131</u>
<u>III. Formation des liposomes et purification</u>	<u>133</u>
<u>III-1. Préparation</u>	<u>133</u>
<u>III-2. Purification et Caractérisation des liposomes chargés en complexes de Lanthanides</u>	<u>135</u>
<u>IV. Rendement d'encapsulation et concentration intra-liposome de complexe</u>	<u>141</u>
<u>IV-1. Approche expérimentale</u>	<u>141</u>
<u>IV-2. Approche théorique</u>	<u>145</u>
<u>IV-3. Application aux liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés de [Gd-HPDO3A]</u>	<u>146</u>
<u>IV-4. Application aux liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés de [Eu-DOTA]</u>	<u>147</u>
<u>V. Dosages des lanthanides et du phosphore</u>	<u>148</u>
<u>VI. Caractérisation des liposomes LipoCEST par diffusion quasi-élastique de la lumière</u>	<u>149</u>
<u>VII. Expériences de résonance magnétique nucléaire</u>	<u>150</u>
<u>VII-1. Mesure du temps de relaxation par ¹⁷O RMN</u>	<u>150</u>
<u>VII-2. Expériences de ¹H RMN</u>	<u>151</u>
<u>VII-3 Imagerie par résonance magnétique</u>	<u>152</u>

VII-4. Mesures de relaxivité	153
<hr/>	
PARTIE III : Résultats expérimentaux	155
<hr/>	
I. Perméabilité membranaire	157
I-1 Méthode d'étude	157
I-2 Résultats	162
I-3 Discussion	168
<hr/>	
II. Systèmes LipoCEST PEGylés à base d'un complexe de Thullium(III) échangeant deux molécules d'eau, le [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂]	176
II-2 Synthèse et caractérisation des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargé en [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂].	176
II-3 Compléments d'étude	205
II-4 Exploration IRM de la réponse CEST de liposomes PEGylés de Tm-DO3A après injection intraveineuse chez le rat	219
<hr/>	
III. Influence de la structure du ligand sur l'efficacité et la stabilité des agents LipoCEST	222
III-1 Vitesse d'échange de l'eau liée au lanthanide par RMN de l'oxygène-17	223
III-2 Variation de déplacement chimique induite par les complexes	229
III-3 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTA	230
III-4 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTMA	233
III-5 Image IRM-CEST après injection intra crânienne de liposomes LipoCEST de Tm-DOTMA chez le rat	238
III-6 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTMA : Discussion	240
III-8 Comparaison des trois systèmes LipoCEST à membrane équivalente	246
<hr/>	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	249
<hr/>	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	257

INTRODUCTION GENERALE

L'intérêt de l'imagerie médicale pour le diagnostic et la compréhension d'anomalies structurelles ou de dysfonctionnements pathologiques de l'organisme n'est plus à démontrer. Depuis l'introduction du principe de la radiographie par Wilhelm Röntgen, technique utilisant la transmission des rayons X par la matière et qui permit la réalisation de la première image médicale en 1895, différents types d'imagerie ont été développés au fur et à mesure des progrès accomplis tout particulièrement dans les domaines de la physique ondulatoire ou nucléaire. Ainsi, l'on peut citer la tomographie à émission de positons (TEP ou *PET* pour *photon emission tomography*) ou la tomoscintigraphie par émission monophotonique gamma (TEMP ou *SPCET* pour *single photon emission computed tomography*) basées sur les propriétés de produits dérivés d'isotopes radioactifs qui sont injectés dans la zone à imager, l'échographie Doppler qui utilise la variation de fréquence d'ondes ultrasonores lors de leur propagation dans la région d'intérêt ou encore la thermographie infrarouge qui mesure la température de surface à partir de son émissivité dans le domaine du rayonnement infrarouge. Dans ce contexte, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est certainement l'une des techniques d'imagerie non-invasives les plus remarquables, permettant de réaliser une représentation bi- ou tridimensionnelle de la plupart des tissus ou organes, avec une excellente résolution spatiale et temporelle. L'IRM repose sur les propriétés d'aimantation des noyaux de certains atomes, notamment les noyaux d'hydrogène ou protons, présents dans la structure de substances endogènes et dont la réponse à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique peut être mesurée et transformée pour reconstituer une image. Bien que les équipements destinés à un usage clinique soient de plus en plus performants, la sensibilité de l'analyse IRM est encore limitée pour imager de façon spécifique une région ciblée de l'organisme au niveau cellulaire ou moléculaire, condition indispensable pour établir le diagnostic précoce d'une pathologie ou en comprendre le mécanisme. Le challenge consiste à rendre compte de l'activité métabolique d'un tissu, d'un organe ou d'une cellule en réalisant une imagerie sélective d'un traceur exogène administré au patient ou d'une substance endogène (hormones, protéines dont les enzymes, acides nucléiques ...). La sensibilité se mesure par l'effet de contraste entre la cible à imager et son milieu environnant, c'est-à-dire par la différence de réponse magnétique des noyaux atomiques selon qu'ils sont associés à la cible ou non. En fait, le contraste naturel est souvent trop insuffisant pour être correctement exploité dans la construction des images. Pour contourner cette difficulté, il est nécessaire

d'utiliser un produit ou agent de contraste dont le rôle est d'augmenter artificiellement le contraste des images. L'IRM médicale est principalement basée sur la réponse des noyaux d'hydrogène qui sont pour l'essentiel les protons des molécules d'eau de l'organisme, de loin les plus abondants. L'agent de contraste n'est pas directement visualisé. Il possède de par sa structure chimique, une configuration électronique telle qu'elle va moduler les processus d'aimantation des protons des molécules d'eau avec lesquelles il interagit et modifier la relaxation de leur aimantation augmentant ainsi la sensibilité de la détection de ces protons par résonance magnétique.

Aujourd'hui, différentes classes d'agents de contraste ont été proposées et développées, s'appuyant sur les propriétés diamagnétiques, paramagnétiques, ferromagnétiques ou superparamagnétiques des composés envisagés. Les premiers systèmes ont été conçus il y a une trentaine d'années à partir de dérivés du gadolinium puis quelques années plus tard à partir d'oxydes de fer dont certains ont connu un usage clinique. A titre d'exemple, citons le Dotarem® mis sur le marché par la société Guerbet en 1989 et l'Endorem® destiné à l'imagerie fonctionnelle du foie, commercialisé en 1995. La famille des lanthanides à laquelle appartient le gadolinium désigne les 15 éléments chimiques du tableau périodique dont le numéro atomique est compris entre 57 (lanthane) et 71 (lutécium). On les trouve naturellement dans leur état d'oxydation III, sous la forme de cations 3+. Leur particularité est de posséder un grand nombre d'électrons non appariés à l'origine de leur moment magnétique de spin électronique et qui, à l'exception du lanthane et du lutécium, leur confèrent un comportement paramagnétique, c'est-à-dire que sous l'action d'un champ magnétique externe, les cations lanthanide vont s'aimanter proportionnellement à l'intensité du champ appliqué. Lorsque le lanthanide est en contact avec des protons, son moment magnétique influence l'aimantation de ces protons, principalement au travers d'un couplage dipolaire, avec pour conséquence l'accélération de la vitesse de relaxation de leur aimantation après l'application d'une onde radiofréquence, ce qui peut être accompagné de la modification de la fréquence de résonance de ces mêmes protons. L'ion Gd(III) occupe une place privilégiée car possède sept électrons non appariés et représente un agent de relaxivité particulièrement efficace en raison de la grande symétrie de son état électronique fondamental et de son moment magnétique de spin électronique élevé ($S=7/2$). Les processus mettant en jeu l'interaction entre les moments magnétiques de spin nucléaire des protons et de spin électronique de l'agent de contraste seront décrits plus en détails dans la partie bibliographique de ce manuscrit. L'inconvénient majeur des cations lanthanide est leur toxicité due à leur grande réactivité en tant qu'oxydant et à leurs fortes interactions

électrostatiques avec les espèces anioniques, ce qui *in vivo* en font des compétiteurs des cations endogènes comme le calcium. Il est donc indispensable de les manipuler sous la forme de complexes stables ce qui est à l'origine d'une chimie spécialisée dans la construction de ligands ou de cages séquestrant le centre lanthanide tout en préservant ses propriétés paramagnétiques.

L'effet des composés paramagnétiques sur le déplacement chimique des protons, c'est-à-dire sur leur fréquence de résonance propre, beaucoup utilisé en RMN conventionnelle, peut également être un outil en IRM pour réaliser des images encodées en fréquence et donc sélectives selon la nature ou l'environnement de l'entité que l'on cherche à révéler. Cette approche fait intervenir le transfert d'aimantation par échange chimique de protons mobiles, en anglais « *Chemical Exchange Saturation Transfer* » (CEST). Le principe consiste à saturer sélectivement un signal donné de protons labiles appartenant à la structure-même de l'agent de contraste ou aux molécules d'eau qui lui sont transitoirement liées, à l'aide d'une impulsion radiofréquence bien choisie. L'image résulte alors de l'altération du signal des protons échangés. Le fonctionnement de la méthode repose sur l'existence effective de deux ensembles ou réservoirs de protons, celui correspondant aux protons associés à l'agent de contraste et celui représenté par le milieu environnant, autrement dit l'eau des tissus, ces deux réservoirs présentant une fréquence de résonance bien distincte.

En IRM-CEST, l'agent de contraste qui peut être éventuellement un constituant endogène, doit sa sensibilité au nombre de protons qu'il est capable d'échanger à l'échelle de temps de la RMN et sa sélectivité à la différence de déplacement chimique qu'il induit pour ces protons. Dans ce domaine, certains composés paramagnétiques capables de lier une ou plusieurs molécules d'eau au niveau de sites de coordination ou au niveau de leur seconde sphère d'hydratation sont des candidats tout à fait désignés. Certains complexes paramagnétiques de lanthanides appartiennent à cette catégorie d'agents de contraste, dénommés agents ParaCEST. L'effet de contraste est le résultat d'un compromis cinétique entre le temps de résidence des molécules d'eau sur le centre lanthanide du complexe et la différence de fréquence de résonance entre les protons des molécules liées et les protons de l'eau des tissus. Les deux types d'eau doivent idéalement s'échanger de façon suffisamment lente pour permettre le transfert d'aimantation et, dans cette limite, le plus rapidement possible pour optimiser la quantité d'eau échangée et gagner en sensibilité de signal. L'échange est essentiellement contrôlé par la nature du cation lanthanide et la structure du ligand.

Alors que l'IRM de relaxivité est pratiquée depuis une quarantaine d'années et que l'utilisation d'agents de contraste paramagnétiques remonte à près de vingt ans, l'IRM-CEST

a été proposée beaucoup plus récemment avec les premiers travaux utilisant le signal de substances diamagnétiques [Ward et al 2000; Zhou et al 2003] suivis de la résolution des équations de Bloch appliquées aux agents ParaCEST [Woessner et al 2005] et des premiers développements de ces systèmes [M. Woods et al 2006; S. Aime et al 2006]. Dans son principe la technique CEST offre l'unique possibilité de contrôler le contraste des images par simple déclenchement de type « on/off » d'une irradiation sélective à la fréquence propre des protons échangeables et permet de la même façon de détecter et de différencier simultanément différentes populations de protons. Cependant, malgré l'emploi d'agents ParaCEST tels que les complexes de lanthanides qui améliorent la dynamique du transfert d'aimantation et sa sélectivité fréquentielle, l'intensité du signal CEST reste faible comparativement au contraste obtenu en IRM de relaxivité, ce qui compromet son application *in vivo*. Ceci s'explique en grande partie par le fait qu'une molécule d'agent ParaCEST possède le plus souvent qu'un seul site de coordination à l'eau ce qui limite fortement le rendement du transfert d'aimantation, directement proportionnel à la quantité de protons échangeables [Delli Castelli et al 2008].

Sur ce constat, le groupe de Silvio Aime a introduit un concept nouveau en imagerie CEST qui consiste à utiliser comme agents de contraste des liposomes encapsulant un complexe paramagnétique de lanthanide [Aime et al 2005]. Ces systèmes ont été appelés agents LipoCEST. Quasi-parallèlement, la société Guerbet déposait un brevet sur ce même concept de sondes ParaCEST pour l'IRM-CEST ultrasensible [Guerbet *worldwide patent priorité, 23 Septembre, 2004*].

Les liposomes sont des vésicules fermées, le plus souvent submicroniques, délimitées par une ou plusieurs bicouches de lipides enfermant une fraction du milieu aqueux dans lequel elles ont été formées. Cette structure est très proche de l'édifice de base des enveloppes cellulaires, ce qui fait des liposomes les modèles désignés pour étudier les processus biologiques liés aux systèmes membranaires naturels. De plus, leur double faculté de pouvoir incorporer des composés lipophiles dans leur enveloppe ou d'encapsuler des substances hydrosolubles dans leur volume aqueux interne justifie un grand nombre de leurs applications notamment en tant que transporteurs ou vecteurs de principes actifs thérapeutiques [Lasic 1993 ; Allen 1995]. Les liposomes apportent un certain nombre d'avantages : ils évitent la dilution du matériel qu'ils transportent lors de leur administration à l'organisme, leur composition lipidique peut être modulée pour d'une part franchir les barrières naturelles (épithélium, endothélium, membranes cellulaires), éviter la capture par le système des phagocytes mononucléaires (liposomes recouverts de poly(éthylène glycol) ou PEG), contrôler la libération de leur

contenu aqueux interne (liposomes thermosensibles ou pH sensibles), moduler leur perméabilité (addition de cholestérol ou de lipides à chaînes saturées) ou encore reconnaître spécifiquement certains tissus ou cellules (liposomes ciblés par bio-conjugaison).

Dans les systèmes LipoCEST, la structure liposome permet de différencier les deux groupes de molécules d'eau nécessaires à l'obtention d'un effet CEST en régulant la vitesse de l'échange d'eau entre le compartiment interne du liposome et le continuum aqueux externe, grâce aux propriétés de perméabilité de la membrane lipidique. Le composé paramagnétique n'intervient qu'en tant qu'agent de déplacement chimique pour décaler en fréquence le signal de l'eau intra-liposome. L'ultra-sensibilité attendue pour un agent LipoCEST provient alors du fait que toutes les molécules d'eau contenues dans le volume interne des liposomes vont contribuer au transfert d'aimantation ce qui est considérable en comparaison des agents ParaCEST moléculaires ne liant généralement qu'une ou deux molécules d'eau par unité.

Il est important de considérer que deux difficultés majeures sont à résoudre lors de la mise au point d'un système LipoCEST. D'une part, le composé paramagnétique doit à la fois être un excellent agent de déplacement chimique et présenter au moins un site d'échange de molécules d'eau à cinétique très rapide devant leur vitesse de diffusion transmembranaire. D'autre part, la composition de la membrane des liposomes doit être ajustée de façon que sa perméabilité à l'eau conduise à une vitesse d'échange suffisamment lente à l'échelle de la RMN.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur une telle mise au point avec pour objectif l'optimisation de systèmes LipoCEST pour l'imagerie *in vivo* après administration par voie intraveineuse. De ce fait, le diamètre des liposomes a été fixé inférieur à 200 nm et leur surface recouverte de chaînes de poly(éthylène glycol) pour assurer leur future stabilité dans le compartiment sanguin. Nous avons ensuite fixé le choix des agents de déplacement chimique à centre lanthanide qu'il était raisonnable d'étudier dans le temps imparti de la thèse et testé différentes compositions lipidiques induisant une perméabilité membranaire distincte. Les expériences ont été menées au sein de quatre laboratoires dont l'activité relève de disciplines complémentaires :

Le Laboratoire de Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés (Institut Galien Paris-Sud, UMR CNRS 8612), spécialisé dans les systèmes formés par les lipides et leurs relations structure-propriétés.

Le Centre de Recherche Guerbet (groupe Guerbet France, Roissy), expert en produits de contraste pour l'IRM, notamment les complexes de lanthanide.

Le Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire (Université de Mons-Hainaut, Belgique), dont l'activité concerne les applications chimiques et biomédicales de la Résonance Magnétique Nucléaire.

Le Laboratoire d'Imagerie et de Spectroscopie, responsable de l'instrumentation RMN et de l'exploration du cerveau au sein du parc IRM NeuroSpin (Saclay).

Ce mémoire comporte trois parties. La première partie rassemble les informations nécessaires à la compréhension des travaux expérimentaux et dresse l'état de l'art du domaine auquel appartient notre sujet d'étude. Le premier chapitre rappelle les propriétés de la RMN ainsi que le passage de la RMN à l'IRM. Le second chapitre traite des agents de contraste de relaxivité utilisés en IRM, notamment les agents paramagnétiques, dont le fonctionnement est différent de celui propre aux agents de contraste de type CEST décrits dans le troisième chapitre. Le dernier chapitre est consacré aux études antérieures effectuées sur les agents LipoCEST.

La seconde partie du manuscrit porte sur les aspects méthodologiques et théoriques des travaux, présentés en sept chapitres.

La troisième partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus, discutés au fur et à mesure de leur présentation. Le premier chapitre concerne la détermination de la perméabilité à l'eau de différentes membranes en fonction de leur composition. Les expériences ont été menées sur des liposomes selon une méthodologie originale reposant sur des mesures de relaxivité. Après avoir justifié notre démarche scientifique et notre choix de travailler sur des complexes paramagnétiques de thulium, le second chapitre est entièrement dédié à un système LipoCEST jamais étudié auparavant et dont la particularité relève du choix du ligand associé au lanthanide. En effet, le complexe [Tm(III)-DO3A] encapsulé possède deux molécules d'eau de coordination. Une partie de ce chapitre est rédigée sous la forme d'un article en anglais. Le troisième et dernier chapitre regroupe une suite d'études réalisées sur des agents LipoCEST encapsulant les complexes [Tm(III)-DOTA] et [Tm(III)-DOTMA], déjà employés par d'autres auteurs et qui nous ont permis, à l'appui d'une comparaison de leurs efficacités respectives en réponse CEST, de dégager certains pré-requis pour la conception d'un système LipoCEST stable et performant. Deux expériences préliminaires *in vivo* chez le rat ont pu être réalisées et sont décrites respectivement dans les second et troisième chapitres de cette partie. Le manuscrit s'achève sur une conclusion générale apportant un bilan des résultats acquis au cours de la thèse ainsi que quelques perspectives.

PARTIE I : Bibliographie

Introduction

La résonance magnétique est une technique de spectroscopie appliquée aux particules ou ensembles de particules atomiques ayant la propriété de se comporter comme de petits aimants c'est-à-dire possédant un moment magnétique. C'est le cas des électrons et de certains noyaux atomiques. Le principe de la résonance magnétique repose sur le fait qu'un moment magnétique électronique ou nucléaire, situé dans un champ magnétique constant, ne va réagir à une excitation magnétique périodique que si celle-ci a une fréquence bien déterminée. La réponse électromagnétique obtenue constitue la mesure de résonance magnétique. La fréquence de résonance dépend de la nature, de la position et du mouvement relatif des particules atomiques, ainsi que de leurs interactions avec d'autres atomes au sein de la même molécule ou appartenant à d'autres entités chimiques.

En 1944, Isidor I. Rabi reçoit le prix Nobel de physique pour ces travaux commencé en 1930 illustrant les fondements de la résonance électronique ou Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), fondements également décrits en 1945 par le physicien soviétique E. Zavoisky [E. Zavoisky, 1945].

Le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a été mis en évidence en 1946 indépendamment par E.M. Purcell, R.V. Pound et H.C. Torrey à l'Université de Harvard [Purcell et al. 1946] et par F. Bloch, N.W. Handsen et M. Packard à l'Université de Stanford [Bloch et al. 1946]. Suite à leurs travaux sur la RMN, E.M. Purcell et F. Bloch ont reçu le prix Nobel de physique en 1952.

La résonance magnétique nucléaire est un instrument de premier ordre pour l'étude détaillée de la matière condensée dans les domaines de la physique, de la chimie et de la biologie. En particulier dans le secteur biomédical, on doit à la RMN la base du développement de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) appliquée au diagnostic de pathologies humaines avec la réalisation de la première image publiée en 1973 par P. Lauterbur [P. Lauterbur, 1973] et le début de l'utilisation d'appareils IRM dans les hôpitaux dès les années 80.

Le but de l'imagerie médicale par résonance magnétique nucléaire est de déterminer dans l'organisme vivant la distribution spatiale de la densité des noyaux d'hydrogène, principalement ceux appartenant à l'eau et, dans une moindre mesure, aux lipides et protéines constitutifs des tissus, afin de pouvoir reconstituer une représentation bi- ou tridimensionnelle d'un organe, d'un muscle ou d'une tumeur. Ceci s'explique en effet par le fait que l'eau

constitue environ 70% du corps humain et l'isotope ^1H de l'hydrogène, doté d'un moment magnétique non nul, est naturellement stable et très abondant (99,985 %).

Le contraste de l'eau endogène repose essentiellement sur les différences de mobilité intrinsèque des molécules et peut s'avérer insuffisant pour obtenir des images de qualité. Pour augmenter la résolution et la sensibilité de l'IRM il est possible d'utiliser un agent de contraste dont le rôle est de modifier la réponse de résonance magnétique des protons de l'eau. Ainsi, parallèlement aux avancées technologiques concernant les instruments d'IRM, la conception et l'élaboration de nanotechnologies efficaces pour améliorer le contraste des images avec une sélectivité de plus en plus maîtrisée à une échelle de plus en plus petite visant à atteindre les dimensions cellulaires font l'objet d'une attention grandissante.

Cette partie bibliographique a pour objectif de présenter le contexte des études réalisées au cours de cette thèse en commençant par expliquer le principe de construction d'une image à partir de mesures exploitant le phénomène de résonance magnétique nucléaire et introduire la notion générale d'agent de contraste pour l'IRM. Ces aspects sont suivis d'une analyse plus poussée des propriétés d'une catégorie particulière d'agents de contraste, les composés paramagnétiques à transfert de saturation par échange chimique ou agents de type paraCEST, de l'anglais « Chemical Exchange Saturation Transfer », à laquelle appartiennent les systèmes que nous avons développés. Ces derniers sont inspirés d'un concept original proposé initialement par E. Terreno et S. Aime et leurs collaborateurs, reposant sur l'encapsulation d'un dérivé paramagnétique de terre rare au sein d'une vésicule lipidique ou liposome [Aime et al. 2005]. La dernière partie de ce chapitre dresse un bilan approfondi des travaux antérieurs ayant porté sur ces systèmes encore désignés comme agents LipoCEST.

I. De la RMN à l'IRM

Ce chapitre introduit le principe de la résonance magnétique nucléaire en dégagant les caractéristiques physiques utiles pour son utilisation comme outil d'imagerie. Il s'appuie principalement sur un certain nombre de documents présentés sous la forme de cours ou inclus dans des thèses de Doctorat ayant porté sur la technique d'imagerie par résonance magnétique [H. Saint-Jalmes, 2010] ;[G. Karcher, 2011] ;[J.F. Le Bas, 2012] ;[J. Selb, 2002] ;[A. Nonat, 2007]

I-1. Magnétisme de l'atome

Tout noyau atomique est constitué de neutrons de charge nulle et de protons chargés positivement et, par conséquent, porte une charge nette. Lorsque le nombre de protons et de neutrons est impair, le noyau, considéré comme une sphère en rotation autour de son axe, présente alors un moment cinétique angulaire de spin non nul \mathbf{I} et le mouvement de sa charge autour de l'axe nucléaire engendre l'existence d'un moment magnétique $\boldsymbol{\mu}$ qui lui est propre (Figure 1), colinéaire au moment cinétique de spin et dont l'amplitude est proportionnelle à celle de ce dernier :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad [1]$$

γ est le rapport gyromagnétique du noyau et le module de \mathbf{I} a pour expression :

$$|\vec{I}| = \frac{hI}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} \quad [2]$$

Où h désigne la constante de Planck et I est le nombre quantique de spin de valeur entière ou demi-entière.



Figure 1 : Moment magnétique nucléaire produit par le mouvement de la charge du noyau autour de son axe. [adapté de H. Saint-Jalmes, 2010]

En absence de champ magnétique externe, les moments magnétiques $\boldsymbol{\mu}$ des noyaux sont orientés de façon aléatoire (Figure 2).

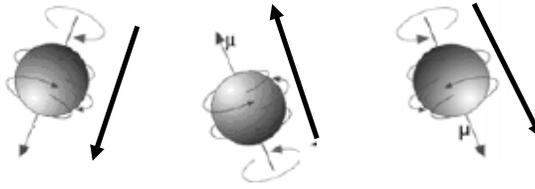


Figure 2 : Orientation aléatoire des moments magnétiques nucléaires. [adapté de H. Saint-Jalmes, 2010]

Par contre, placés dans un champ magnétique \mathbf{B}_0 continu, les moments magnétiques nucléaires s'orientent en fonction du champ selon $(2I+1)$ orientations ou niveaux d'énergie, affecté chacun d'un nombre quantique m prenant les valeurs $(-I), (-I+1), (-I+2), \dots, (+I)$. C'est l'effet Zeeman. L'énergie magnétique associée à chacun de ces états est donnée par:

$$E_m = -m \cdot \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 \quad [3]$$

Avec $\hbar = h/2\pi$.

La distribution des orientations des moments magnétiques nucléaires suit une préférence d'occupation des niveaux de plus faible énergie correspondant aux états les plus stables : il s'agit de la distribution de Boltzmann.

Le proton (noyau de l'isotope ^1H ($Z=1$) de l'hydrogène) possède un nombre quantique de spin I égal à $1/2$, donc deux orientations du moment magnétique possibles, de projection antiparallèle ($m = -1/2$) ou parallèle ($m = +1/2$) sur la direction du champ \mathbf{B}_0 (Figure 3). La différence d'énergie ΔE entre les 2 états est donc:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad [4]$$

La présence du champ magnétique continu soumet les moments magnétiques nucléaires à un couple et ces derniers décrivent donc autour de \mathbf{B}_0 un mouvement de précession avec une vitesse angulaire ω donnée par :

$$\omega = \gamma B_0 \quad [5]$$

Ce mouvement de précession est appelé précession de Larmor dont la fréquence ou fréquence de Larmor est définie par :

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad [6]$$

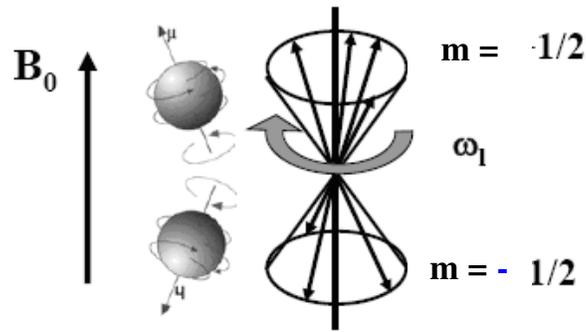


Figure 3 : Orientation et mouvement de précession des moments magnétiques d'un ensemble de protons dans un champ magnétique B_0 . Selon la loi de Boltzmann, la répartition des orientations des moments magnétiques privilégie l'état de plus faible énergie correspondant au nombre de spin $m = +1/2$ ($E = -1/2\gamma\hbar B_0$) [adapté de H. Saint-Jalmes, 2010].

Selon la loi de répartition de Boltzmann, l'état le plus stable (nombre de spin $m = +1/2$) est légèrement plus peuplé. Il en résulte une aimantation macroscopique M des protons orientée selon le champ B_0 (Figure 4) et telle que :

$$\vec{M} = \chi \vec{B}_0 \quad [7]$$

Où χ est la susceptibilité magnétique.

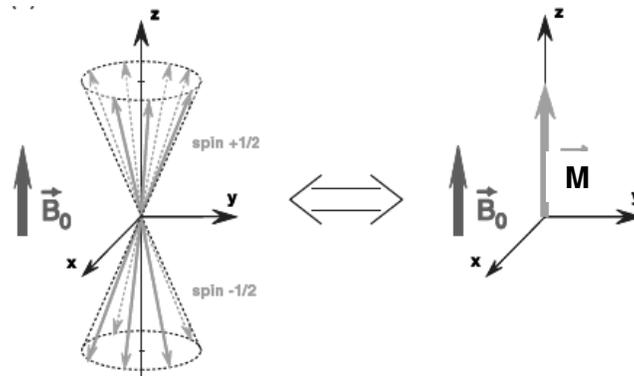


Figure 4 : Répartition des moments magnétiques nucléaires placés dans un champ magnétique B_0 . L'état le plus stable (nombre de spin $+1/2$) étant légèrement plus peuplé, il en résulte une aimantation macroscopique M non nulle et parallèle au champ B_0 . [d'après J. Selb 2002]

I-2. Résonance et signal

Les méthodes de détection du signal RMN utilisent le principe de résonance entre les noyaux atomiques et une onde radiofréquence à laquelle est associé un champ magnétique oscillant possédant une composante B_1 perpendiculaire au champ magnétique B_0 et tournant dans le même sens que les moments magnétiques nucléaires.

Lorsque la fréquence de rotation de \mathbf{B}_1 est égale à la fréquence de précession des moments magnétiques nucléaires, soit la fréquence de Larmor ν_0 , l'énergie transportée par l'onde est égale à $h\nu_0$ et permet d'induire une transition de l'état énergétique des noyaux en faisant basculer leurs moments magnétiques par rapport à leur position d'équilibre. C'est le phénomène de résonance. On observe donc le basculement de l'aimantation macroscopique \mathbf{M} d'un angle θ qui dépend de la durée τ de l'impulsion radiofréquence appliquée et de l'amplitude du champ magnétique B_1 (Figure 5) :

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau \quad [8]$$

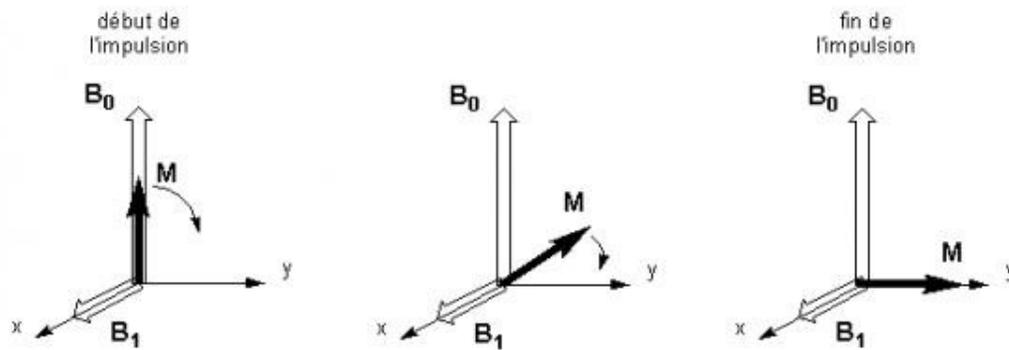


Figure 5 : Basculement de l'aimantation globale \mathbf{M} sous l'effet d'une impulsion radiofréquence créant un champ magnétique oscillant dont la composante B_1 perpendiculaire au champ magnétique appliqué B_0 tourne avec une fréquence égale à la fréquence de Larmor des moments magnétiques nucléaires. [D'après G. Karcher, 2011]

A l'arrêt de l'impulsion, l'aimantation \mathbf{M} revient à sa position d'équilibre en décrivant un mouvement hélicoïdal (Figure 6).

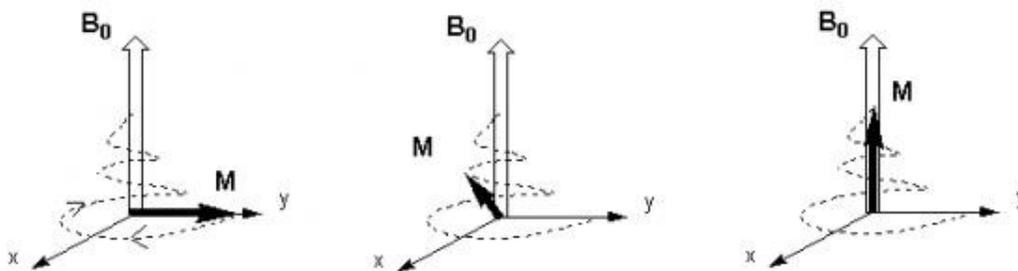


Figure 6 : Retour de l'aimantation macroscopique à sa position d'équilibre suite à l'arrêt d'une impulsion radiofréquence l'ayant fait basculer d'un angle de 90° . [D'après G. Karcher, 2011].

Le mouvement de M induit un courant dans la bobine qui a servi à produire l'impulsion excitatrice et qui fonctionne désormais en réception. Elle enregistre le signal de retour à l'équilibre. Une fois amplifié, le signal induit capté par la bobine est appelé FID (Free Induction Decay) ou encore signal de précession libre (Figure 7). Le signal FID représente un ensemble de sinusoïdes amorties en fonction du temps. Sa transformée de Fourier conduit au tracé du spectre RMN qui porte l'intensité en fonction de la fréquence caractéristique du FID (Figure 8) :

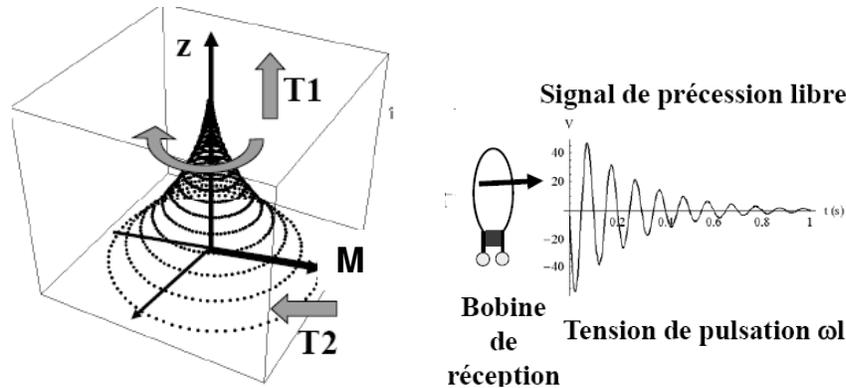


Figure 7 : Le mouvement de précession libre de l'aimantation induit un courant dans la bobine de détection qui transmet un signal sinusoïdal FID (free induction decay). [d'après H. Saint-Jalmes, 2010]

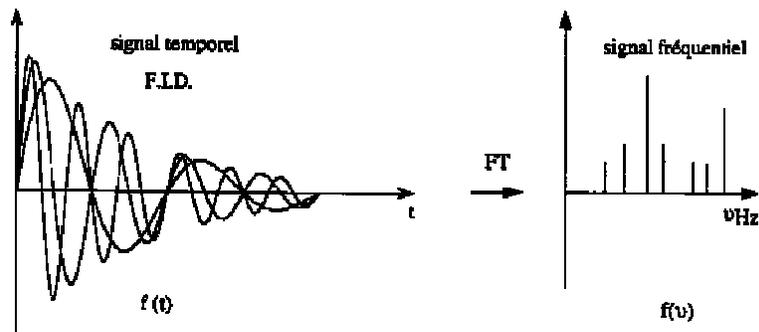


Figure 8 : Transformée de Fourier (FT) du signal temporel et tracé du spectre RMN fréquentiel. [D'après G. Karcher, 2011]

I-3. Relaxation

Le phénomène de retour à l'équilibre de l'aimantation M après avoir été soumise à une impulsion radiofréquence est appelé relaxation. Autrement dit, il y a relaxation de l'aimantation quand, après excitation suite à l'absorption de l'énergie électromagnétique fournie par le champ magnétique B_1 , les orientations des moments magnétiques nucléaires dans le seul champ magnétique B_0 retrouvent la distribution de Boltzmann.

Le processus de relaxation peut être ramené à la variation des deux composantes du vecteur aimantation \mathbf{M} selon l'axe z parallèle au champ magnétique \mathbf{B}_0 ou composante longitudinale \mathbf{M}_z et dans le plan (xy) perpendiculaire à \mathbf{B}_0 ou composante transversale \mathbf{M}_{xy} (Figure 9).

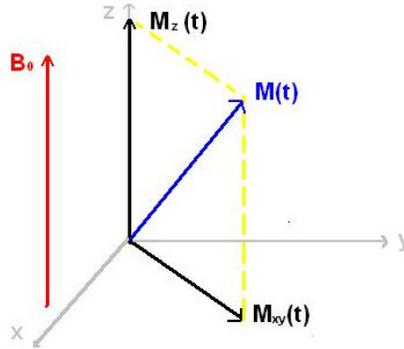


Figure 9 : Décomposition du vecteur aimantation \mathbf{M} . \mathbf{M}_z est la composante longitudinale projetée sur l'axe z parallèle au champ magnétique \mathbf{B}_0 et \mathbf{M}_{xy} la composante transversale projetée sur le plan xy qui lui est perpendiculaire.

Le retour à l'équilibre s'accompagne donc au cours du temps d'une augmentation de la composante longitudinale, caractérisée par une constante de temps T_1 , vers sa valeur d'équilibre \mathbf{M}_0 et de la décroissance de la composante transversale, associée à un temps caractéristique T_2 , qui tend à s'annuler. T_1 est appelé temps de relaxation longitudinal ou spin-réseau et T_2 temps de relaxation transversal ou spin-spin.

Relaxation longitudinale

Prenons par exemple le cas d'une excitation permettant de faire basculer l'aimantation de 90° . Pour la composante longitudinale de l'aimantation \mathbf{M}_z , on montre que sa vitesse de retour à l'équilibre est proportionnelle à sa différence avec sa valeur d'équilibre \mathbf{M}_0 :

$$dM_z/dt = 1/T_1 [M_0 - M_z(t)] \quad [9]$$

Juste après basculement ($\theta = 90^\circ$) on a ici : $M_z = 0$. Par intégration de l'équation [9], on obtient :

$$M_z(t) = M_0 \cdot [1 - \exp(-t/T_1)] \quad [10]$$

Ainsi, la constante de temps T_1 ou temps de relaxation longitudinale (relaxation spin-réseau) est le temps nécessaire pour que les noyaux atteignent les deux tiers de leur aimantation initiale (Figure 10).

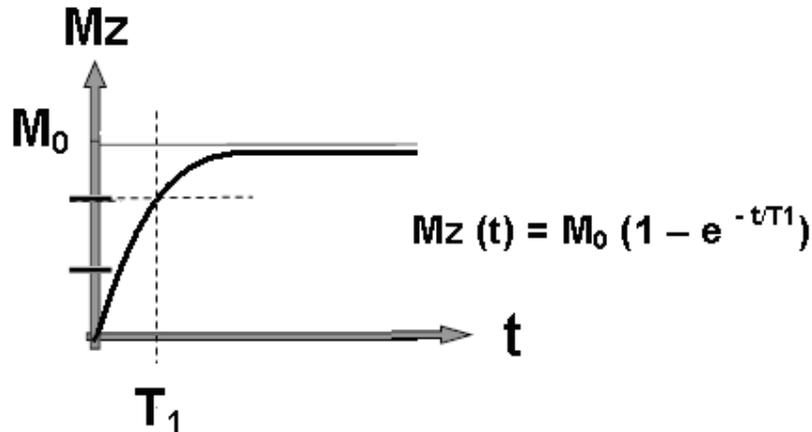


Figure 10: Croissance mono-exponentielle de la composante longitudinale M_z de l'aimantation vers sa valeur d'équilibre M_0 . Le temps de relaxation T_1 correspond au temps nécessaire pour que M_z atteigne $2/3$ de M_0 .

Relaxation transversale

Toujours dans le cas d'une excitation permettant de faire basculer l'aimantation de 90° , on démontre également que la vitesse de décroissance de la composante transversale M_{xy} de l'aimantation est proportionnelle à sa valeur à l'instant t et s'annule à l'équilibre:

$$dM_{xy}/dt = -1/T_2 M_{xy}(t) \quad [11]$$

soit, après intégration en considérant que la valeur initiale de M_{xy} est M_0 :

$$M_{xy}(t) = M_0 \exp(-t/T_2). \quad [12]$$

Le temps de relaxation T_2 ou temps de relaxation "spin-spin" correspond au temps pendant lequel l'intensité décroît de deux tiers de sa valeur initiale.

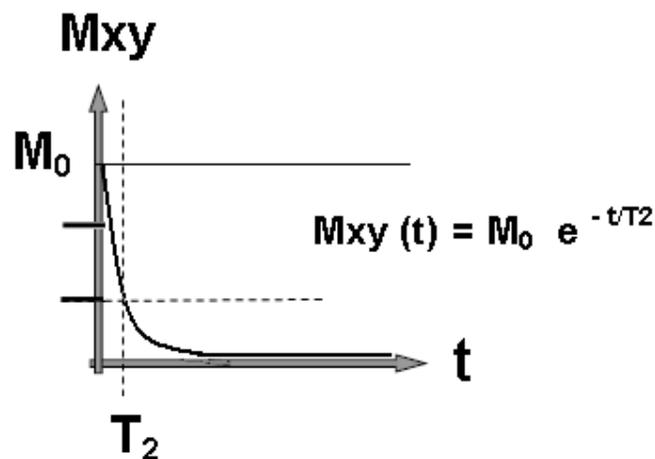


Figure 11 : Décroissance mono-exponentielle de la composante transversale M_{xy} de l'aimantation. Le temps de relaxation T_2 correspond au temps nécessaire pour que M_{xy} atteigne un tiers de sa valeur initiale M_0 .

Le temps de relaxation T_2 est toujours inférieur ou égal au temps de relaxation T_1 . Ces deux paramètres dépendent de l'environnement des noyaux atomiques. Ainsi, dans le cas qui nous intéresse ici, l'emploi de l'outil RMN va permettre de réaliser une cartographie des différents états de l'eau dans l'organisme humain à partir de la mesure des temps de relaxation des protons constituant les molécules d'eau des différents tissus observés. En effet, la valeur des temps de relaxation des protons varie selon la nature du tissu, de l'intensité du champ magnétique, de l'organisation et la densité de l'eau dans ce tissu. Le tableau 1 donne quelques ordres de grandeur des temps de relaxation des protons de l'eau contenue dans certains tissus de l'organisme [Stanisz et al. 2005].

Tableau 1: Comparaison des temps de relaxation dans différents tissus mesurés à 1,5T [Stanisz et al. 2005].

Tissus	T2 (ms)	T1 (ms)
Foie	46 ± 6	576 ± 30
Cœur	40 ± 6	1030 ± 34
Reins	55 ± 3	690 ± 30
Matière blanche	72 ± 3	884 ± 50
Matière grise	95 ± 8	1124 ± 50
Sang	290 ± 30	1441 ± 120

Le tableau 2 illustre la possibilité de distinguer différents états des tissus [Goldstein et al. 1989]. En effet, un tissu atteint d'une tumeur développe souvent au niveau de celle-ci une inflammation pouvant entraîner la formation d'œdèmes, ce qui augmente la quantité d'eau dans ces tissus et modifie le temps de relaxation des protons associés. Cela explique en particulier l'augmentation du T_1 . Dans un tissu cicatriciel au contraire, la quantité d'eau est diminuée et la valeur du T_1 abaissée.

Tableau 2 : Variations du temps de relaxation longitudinale entre tissu sain et tissu tumoral pour quelques organes (mesures réalisées à 1,5 T) [Goldstein et al. 1989]

Tissus	T_1 (ms) pour tissu sain	T_1 (ms) pour tissu tumoral
Foie	140-170	300-450
Pancréas	180-200	275-400
Rein	300-340	400-450
Prostate	250-325	350-400

I-4. Influence du temps de répétition TR sur le contraste et image pondérée T₁

Le choix du temps de répétition TR détermine la pondération du contraste en T₁ en limitant la croissance ou « repousse » de la composante longitudinale de l'aimantation lors de son retour à l'équilibre (Figure 14). Pour des temps de répétition longs par rapport à T₁, la repousse de la composante longitudinale est presque totale. Pour des temps de répétition courts ou de l'ordre du T₁ du tissu, la repousse de la composante longitudinale MR est incomplète, et cela d'autant plus que TR est court. Dans le premier cas, l'intensité du signal sera importante alors que dans le second cas elle sera atténuée. Il est ainsi possible de discriminer plusieurs types de protons en fonction de leurs temps de relaxation longitudinale respectifs.

Influence du temps d'écho TE sur le contraste et image pondérée T₂

Lorsque le temps de répétition est suffisamment long, le choix du temps d'écho TE détermine la pondération du contraste en T₂. Une fois projetée dans le plan transversal et soumise à la seconde impulsion à 180°, on mesurera une aimantation d'autant plus grande qu'elle a persisté longtemps dans le plan transversal et donc que le temps de relaxation T₂ des protons correspondants sera plus long.

Les tissus dont le temps T₂ est court apparaîtront donc en hyposignal tandis que les tissus de temps T₂ longs apparaîtront en hypersignal. On parle de pondération T₂ des images (Figure 12).

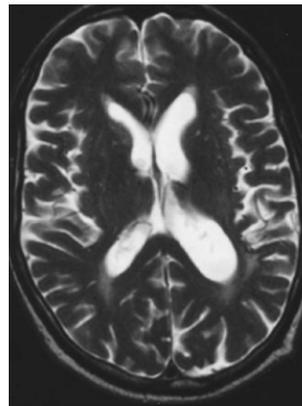


Figure 12 : Image IRM d'un cerveau humain en pondération T₂ [D'après Cheng et al. 2003]

Influence cumulée des temps TR et TE sur le contraste de l'image

Une séquence dont les TE et TR sont courts donnera lieu à une image pondérée en T_1 puisque cette configuration favorise les effets T_1 . De même, pour une séquence dont les TE et TR sont longs, les images observées seront pondérées en T_2 . Dans ce dernier cas le contraste entre des tissus dont les protons présentent des temps de relaxation transversale différents est souvent plus marqué (Figure 13).

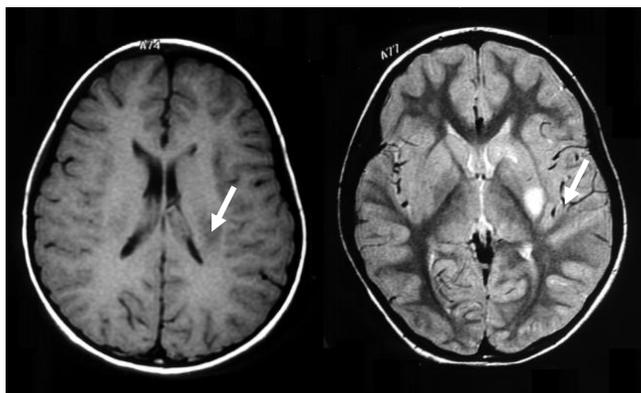


Figure 13 : Images pondérées en T_1 (à gauche) et en T_2 (à droite) faisant apparaître une lésion cérébrale [Sevigny Brown et al. 1995]

I-5. Conclusion

L'IRM en tant qu'outil non invasif montre des possibilités de diagnostic diverses et variées dont la résolution peut encore être améliorée. En effet, malgré une résolution spatiale excellente, il est souvent nécessaire de réaliser une acquisition longue (environ 20 min) afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. De plus, cette démarche n'est pas toujours suffisante. La qualité des images peut être tout d'abord améliorée grâce au développement instrumental visant à améliorer la résolution temporelle et à la mise en place de méthodologies basées sur les phénomènes de relaxation mais également sur d'autres phénomènes mesurables par RMN. Par exemple, l'optimisation des séquences IRM ^1H permet de gagner en qualité de l'image. Parmi les séquences utilisées en imagerie magnétique, il existe la technique d'inversion-récupération qui permet de supprimer de manière non sélective le signal de l'eau. Par exemple citons la séquence FLAIR "Fluid Attenuated Inversion Recovery", très utile en imagerie cérébrale, précisément pour les lésions dans la substance blanche et l'imagerie du liquide céphalo-rachidien. Pour imager des tissus riches en lipides.

Les séquences de suppression du signal par inversion-récupération, dites de saturation des protons des lipides ou de la matière grasse (par exemple la séquence appelée Fat Sat) créent un contraste par exploitation des caractéristiques différentes des protons selon qu'ils sont liés

à des molécules d'eau ou à des lipides. De plus, la graisse produit des artéfacts de déplacements chimiques qui sont ainsi évitées. [De Kerviler et Leroy-Willig, 1998]

L'augmentation de l'intensité du champ magnétique **B₀** de 1,5 T à 3 T a été assez rapidement envisagée pour atteindre un meilleur rapport signal sur bruit et diminuer les temps d'acquisition tout en augmentant la résolution spatiale. Toutefois, les séquences d'acquisition doivent être adaptées et le coefficient d'absorption spécifique ou SAR (Specific Absorption Rate) doit être pris en compte. En effet, il indique le taux d'échauffement produit dans le corps des patients soumis à des impulsions radiofréquences à très haut champ.

Ces échauffements peuvent causer des lésions irréversibles et plusieurs cas ont été signalés lors d'IRM à 3 T chez des patients avec systèmes de neurostimulation [Lehéricy ; 2010]. Pour limiter ces problèmes, les conditions d'acquisition doivent être parfaitement maîtrisées (augmentation du TR, baisse du nombre de coupes, de l'angle de bascule, de la longueur du train d'écho...) sans pour autant enfreindre le gain escompté [Barles, 2005]. Les artéfacts de déplacement chimique ou l'accentuation des effets de susceptibilité magnétique liés à l'utilisation de champ de haute intensité sont également à prendre en compte dans le paramétrage des acquisitions (augmentation de la bande passante, réduction de la taille des voxels).

Les progrès réalisés ces dernières années sur les protocoles cliniques justifient amplement le passage à l'IRM 3T qui apporte réellement une meilleure imagerie fonctionnelle et un meilleur contraste des tissus selon leur nature, notamment ceux riches en corps gras [Tanenbaum, 2006] [Heidemann et Seiberlich, 2006] [Voss et Zevin, 2006] [Merkle et Dale, 2006] [Mosher, 2006].

En dehors des modifications de séquences ou de l'augmentation du champ magnétique **B₀**, le choix d'un noyau autre que le noyau d'hydrogène est également possible. D'autres atomes ont été investigués comme le phosphore, le sodium, mais essentiellement le carbone-13. Cette méthode alternative a été appelée SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique) et permet d'étudier le métabolisme hépatique, musculaire ou celui du cerveau.

Divers types d'imagerie IRM ¹H existent, comme par exemple l'IRM de diffusion dont les séquences (appelées séquences de diffusion) permettent de mesurer le déplacement des molécules d'eau dans les tissus, ce qui donc permettent d'appréhender si le tissu est sain ou malade à partir de sa plus ou moins grande perméabilité. [Schaefer et al. 2000] [Koh et al. 2007]. Un autre type d'imagerie IRM ¹H est l'imagerie CEST permise par une séquence dite CEST, comme étudié au chapitre IV. L'IRM fonctionnelle mérite également d'être citée puisqu'elle permet de visualiser, de manière indirecte, l'activité cérébrale à travers sa

consommation en oxygène. Il s'agit d'un exemple d'IRM fonctionnelle dite IRMf dont l'application la plus importante est l'imagerie BOLD (pour Blood Oxygen Level Dependent imaging). Lorsqu'une partie du cerveau est en activité, la consommation d'oxygène augmente, donc l'afflux sanguin également. La concentration en désoxyhémoglobine fluctue. Or, la désoxyhémoglobine possède des propriétés paramagnétiques, et ce sont les variations en concentration de ces propriétés magnétiques qui sont exploitées en IRMf. L'oxygène ici joue le rôle d'agent de contraste dit endogène, mais il est également possible d'utiliser des agents de contraste dits exogènes.

L'utilisation de ces agents de contraste exogènes consiste en l'injection au patient d'un agent de contraste qui augmente spécifiquement le contraste des zones à analyser par modulation de la réponse magnétique des protons endogènes de manière la plus spécifique possible. Ces agents de contraste peuvent être injectés localement pour permettre l'imagerie de la zone choisie, passivement capturés et acheminés vers le foie, permettant l'imagerie de cet organe, ou bien greffé à des molécules spécifiques permettant de cibler un organe ou un tissu particulier.

Selon l'architecture de la molécule, il est possible de diminuer les doses injectées et d'obtenir un contraste entre tissus sains et malades accru, des images de meilleure qualité et un temps d'examen raccourci. Actuellement, près de 30% des examens requièrent l'utilisation d'un agent de contraste.

II. Les agents de contraste de relaxivité

Dans le cadre de l'IRM appliquée au proton, de nombreux agents de contrastes ont été développés au cours des trente dernières années. La majorité des agents de contraste commercialisés ont pour principe la modification des temps de relaxation des protons des tissus en accélérant le retour à l'équilibre de leurs moments magnétiques. Ces agents, dits de relaxivité, font l'objet d'une recherche continue qui a pour objectif d'améliorer leur sensibilité et de mettre au point de nouveaux systèmes adaptés au diagnostic précoce de pathologies graves et donc de cibler spécifiquement les sites biologiques correspondants. Contrairement aux autres techniques utilisées en médecine nucléaire ou en tomographie X, les agents de contraste pour l'IRM ne sont pas visualisés directement sur les images. Ce sont leurs effets sur les protons des tissus, essentiellement ceux composant les molécules d'eau endogènes, qui sont exploités. Ainsi, non seulement les propriétés magnétiques intrinsèques des agents de contraste de relaxivité définissent leur efficacité mais également leur comportement en milieu aqueux auquel vient s'ajouter leur stabilité biologique, primordiale pour la réalisation des images. Dans le texte qui suit, après avoir introduit le principe de l'imagerie de relaxivité, nous présenterons les agents de contraste actuellement commercialisés et leur utilisation au niveau clinique avant de résumer les orientations envisagées pour faire évoluer les systèmes existants à partir de quelques avancées récentes prises parmi les plus significatives.

II-1. Définitions et Principe

Selon qu'ils accélèrent la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$ ou transversale $1/T_2$ des protons, on distingue les agents de contraste de relaxivité de type T_1 des agents de type T_2 (Figure 1). Leurs effets sur les images sont différents. En augmentant la vitesse de récupération de l'aimantation longitudinale, les agents T_1 augmentent l'intensité du signal et les images gagnent en contraste positif (hypersignal visualisé en blanc ou gris clair sur les images). Ce sont généralement des composés paramagnétiques. Les agents T_2 , le plus souvent des entités de forte susceptibilité magnétique, accélèrent la perte de la composante transversale de l'aimantation et diminuent l'intensité du signal apportant un contraste négatif aux images (hyposignal visualisé en gris foncé ou noir).

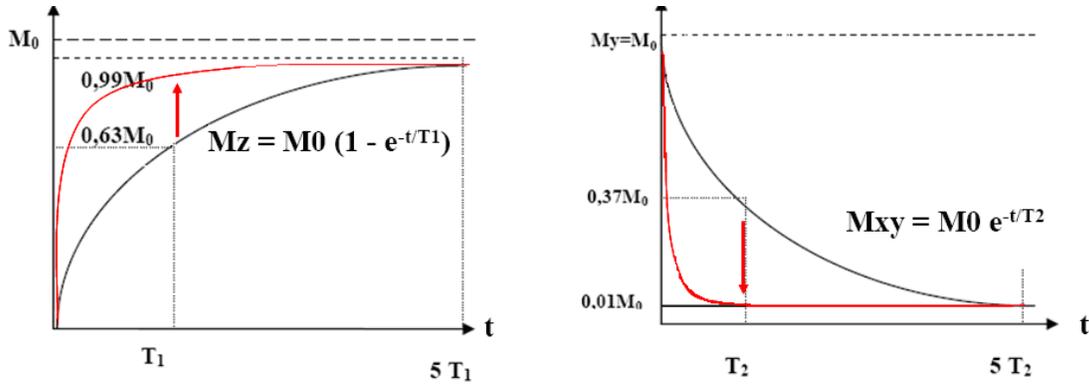


Figure 1 : Effet des agents de contraste sur la relaxation longitudinale et transversale en fonction du temps.

La vitesse de relaxation des protons observés $1/T_{1 \text{ observé}}$ est la résultante de leur vitesse de relaxation intrinsèque $1/T_{i \text{ intrinsèque}}$ et de la vitesse accélérée sous l'effet de l'agent de contraste $1/T_{i \text{ agent}}$, telle que:

$$1/T_{1 \text{ observé}} = 1/T_{1 \text{ intrinsèque}} + 1/T_{1 \text{ agent}} \quad [1]$$

$$1/T_{2 \text{ observé}} = 1/T_{2 \text{ intrinsèque}} + 1/T_{2 \text{ agent}} \quad [2]$$

On démontre que la vitesse relative à la présence de l'agent de contraste est directement proportionnelle à sa concentration [C]. Le facteur de proportionnalité appelé relaxivité (r_i) dépend de la température et du champ magnétique appliqué. La vitesse de relaxation s'écrit donc sous la forme suivante :

$$1/T_1 = 1/T_{1 \text{ intrinsèque}} + r_1 [C] \quad [3]$$

$$1/T_2 = 1/T_{2 \text{ intrinsèque}} + r_2 [C] \quad [4]$$

Si la vitesse de relaxation des protons dépend linéairement de la concentration en agent de contraste, l'intensité du signal IRM et donc le niveau de contraste des images ne suit pas cette loi linéaire (Figure 2). Quel que soit le type d'agent de contraste et à faibles concentrations en ce dernier, le contraste des images sera positif. A des concentrations intermédiaires, les agents paramagnétiques restent efficaces pour un contraste positif en pondération T_1 alors que les agents superparamagnétiques deviennent utiles pour une imagerie T_2 et apportent un contraste négatif. A très fortes concentrations, l'effet de susceptibilité l'emporte quelles que soient les caractéristiques du produit de contraste et c'est le contraste négatif qui devient privilégié.

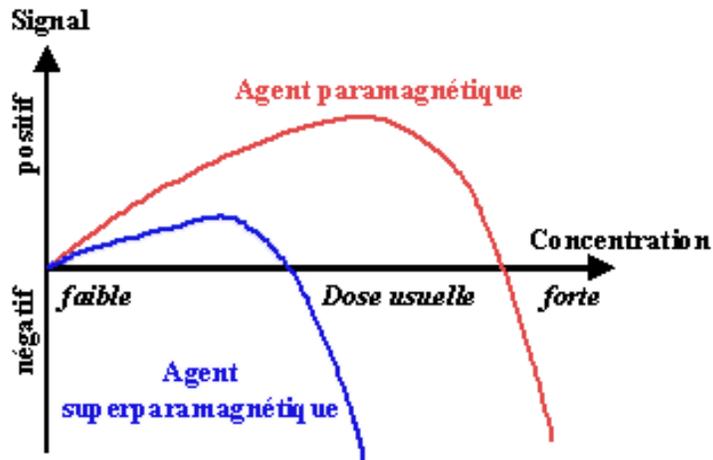


Figure 2: Effet de la concentration des agents de contraste T_1 et T_2 sur l'intensité du signal IRM. [Clément et al 1995]

Les agents paramagnétiques accélèrent les vitesses de relaxation des moments magnétiques des protons de l'eau des tissus mais leur portée est courte en fonction de la distance. L'effet de contraste est surtout visible sur des séquences pondérées T_1 , mettant en jeu les processus de relaxation spin-réseau accélérés et touchent les molécules d'eau directement en contact avec les agents paramagnétiques. Les agents de contraste dits T_2 couramment rencontrés sont pour l'essentiel des petites particules dotées de propriétés superparamagnétiques qui se comportent comme de petits aimants extrêmement plus magnétiques qu'une molécule paramagnétique. Les relaxivités r_2 de ces agents sont plus élevées que leurs relaxivités r_1 . Ce type de particules crée des inhomogénéités de champ magnétique importantes et déphase les protons environnants sur des distances bien plus importantes que les molécules paramagnétiques.

II-2. Les Agents de contraste de type T_1

Les agents de contraste paramagnétiques sont constitués d'atomes possédant un grand nombre d'électrons non appariés donc un grand moment magnétique intrinsèque lié au spin électronique. Ces atomes appartiennent à la classe des métaux de transition ou des lanthanides, notamment le gadolinium, doté de 7 électrons libres et utilisé en imagerie clinique sous forme de complexes. L'utilisation de complexes de terres rares est nécessaire pour diminuer leur toxicité due en effet à leur nature chimique qui les rend compétitifs avec les ions calcium de l'organisme, perturbant fortement les fonctions vitales assurées par les mécanismes biochimiques faisant intervenir ces ions.

L'association stable des cations lanthanide avec des ligands a permis non seulement de régler les problèmes de toxicité mais encore d'augmenter leur pouvoir contrastant.

Les premières molécules envisagées pour complexer les cations gadolinium Gd(III) ont été les polyacides carboxyliques polyaminés de types DTPA (complexe linéaire) ou DOTA complexe macrocyclique (Figure 3) et les diverses déclinaisons autour de ces deux chélates ont conduit majoritairement aux produits de contraste aujourd'hui commercialisés et utilisés en clinique.

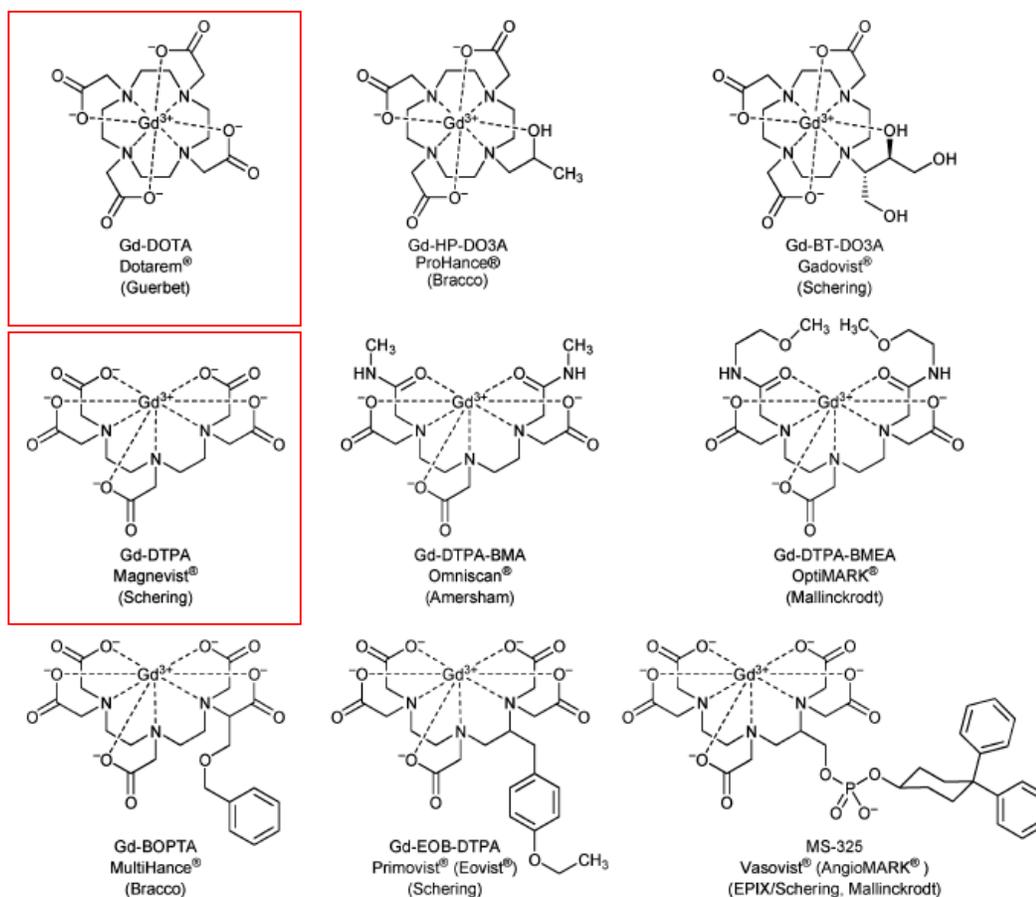


Figure 3 : Structure des principaux complexes de gadolinium utilisant comme ligand des dérivés de polyacides carboxyliques polyaminés, développés sur la base du complexe macrocyclique Gd-DOTA et du complexe linéaire Gd-DTPA, encadrés en rouge. [Hermann et al. 2008]

Les ligands utilisés possèdent une affinité élevée pour les cations volumineux comme le Gd(III) de sorte que les complexes formés non covalents présentent des constantes d'association élevées. Les molécules envisagées sont caractérisées par la présence dans leur structure d'atomes d'azote et d'oxygène électrodonneurs qui permettent au lanthanide complexé de compléter sa sphère de coordination.

Selon la nature du lanthanide, il s'entoure préférentiellement de sept voire huit atomes donneurs pour former un complexe stable et non toxique. Pour augmenter la vitesse de relaxation des protons de l'eau, la structure du complexe est adaptée de sorte à laisser au moins un site de coordination vacant du Gd(III) pour lier au moins une molécule d'eau.

La Figure 4 schématise les caractéristiques structurales d'un complexe hydraté de Gd(III).

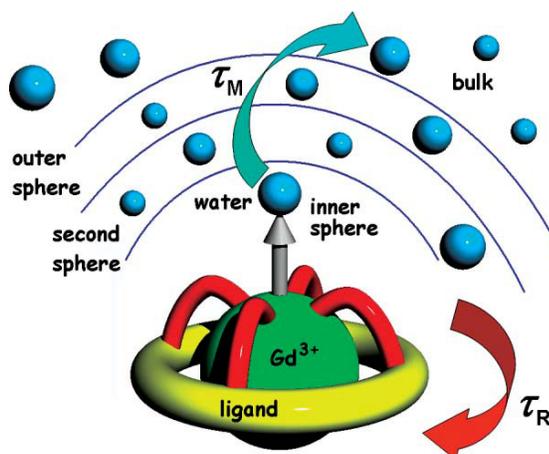


Figure 4 : Hydratation d'un complexe macrocyclique du cation Gd(III), possédant un site de coordination liant une molécule d'eau. [Hermann et al. 2008]

Au voisinage du complexe, l'eau s'organise selon 4 sphères d'hydratation. La première sphère ou sphère interne correspond aux molécules d'eau qui se lient directement au cation Gd(III). Dans le cas de la majorité des ligands utilisés en clinique, il y a une seule molécule d'eau. La seconde sphère d'hydratation se compose des molécules d'eau de solvatation maintenues dans le voisinage du complexe par des liaisons hydrogène. [Hermann et al, 2008]. La contribution de la sphère externe à l'hydratation du complexe découle de la diffusion de l'eau depuis l'eau du milieu aqueux directement environnant jusqu'à la couche de solvatation [Toth et al, 1998]. Quant à l'eau libre qui constitue la quatrième sphère, les molécules qui la constituent ne présentent aucune interaction avec le complexe de Gd(III). Le paramètre τ_m reporté sur la Figure 4 correspond au temps de séjour de la molécule d'eau coordonnée au cation Gd(III) ou encore le temps que cette molécule d'eau met à quitter la sphère d'hydratation interne. Dans le cas d'un agent de contraste de relaxivité, il est important que ce temps soit le plus court possible. Le paramètre τ_R correspond au temps de corrélation de rotation représentant le temps de basculement moléculaire d'un complexe, influençant donc la plus ou moins grande facilité pour une molécule d'eau à se lier au complexe. Plus le temps de rotation est lent, plus la liaison avec une molécule d'eau est facilitée.

Le Tableau 1 indique les produits principalement utilisés en administration par voie intraveineuse ainsi que leurs demi-vies plasmatiques. Les structures des ligands correspondants sont reportées dans les Figures 3 et 5. Ces complexes apportent tout d'abord du contraste au niveau du compartiment vasculaire et des zones de perméabilité capillaire. Leur faible masse molaire leur permet de franchir aisément les endothéliums vasculaires perméables et d'atteindre notamment le foie et les cellules de Küpffer ou encore le tissu tumoral.

Tableau 1: Principaux agents de contraste paramagnétiques commercialisés. [d'après Caravan et al. 1999 ; Clement et al. 1995 ; Bellin et Van Der Molen 2008 ; Reimer et al. 1996 ; Port et al. 2001]

<i>Nom commercial</i>	<i>Cible</i>	<i>Formule chimique</i>	<i>Laboratoire</i>	r_1 (r_2) ^a <i>mM⁻¹.s⁻¹</i>	Demi-vie plasmatique (h)
Magnevist ®	Extravasculaire	[Gd(DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	Schering	4,3 (4,4)	1,6
Dotarem ®		[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	Guerbet	4,2 (6,7)	1,6
Omniscan ®		[Gd(DTPA-BMA)(H ₂ O)]	GE Healthcare	4,6 (6,9)	1,3
Optimark ®		[Gd(DTPA-BMEA)(H ₂ O)]	Mallinkrodt	5,2 (6,0)	1,7
ProHance ®		[Gd(HP-DO3A)(H ₂ O)]	Bracco	4,4 (5,5)	1,6
Gadovist ®		[Gd(DO3A-butrol)(H ₂ O)]	Schering	5,3 (5,4)	1,5
Primovist (Eovist) ®	Extravasculaire et Hépatobiliaire	[Gd(EOB-DTPA)(H ₂ O)] ⁻	Schering	7,9	0,95
Vistarem®	Angiographie	cf Figure 5	Guerbet	29	0,33
MultiHance ®	Hépatospécifique	[Gd(BOPTA)(H ₂ O)] ²⁻	Bracco	6,7(8,9)	1,5

^a relaxivités mesurées à 1,5 T, pH = 7.4 et 25 °C

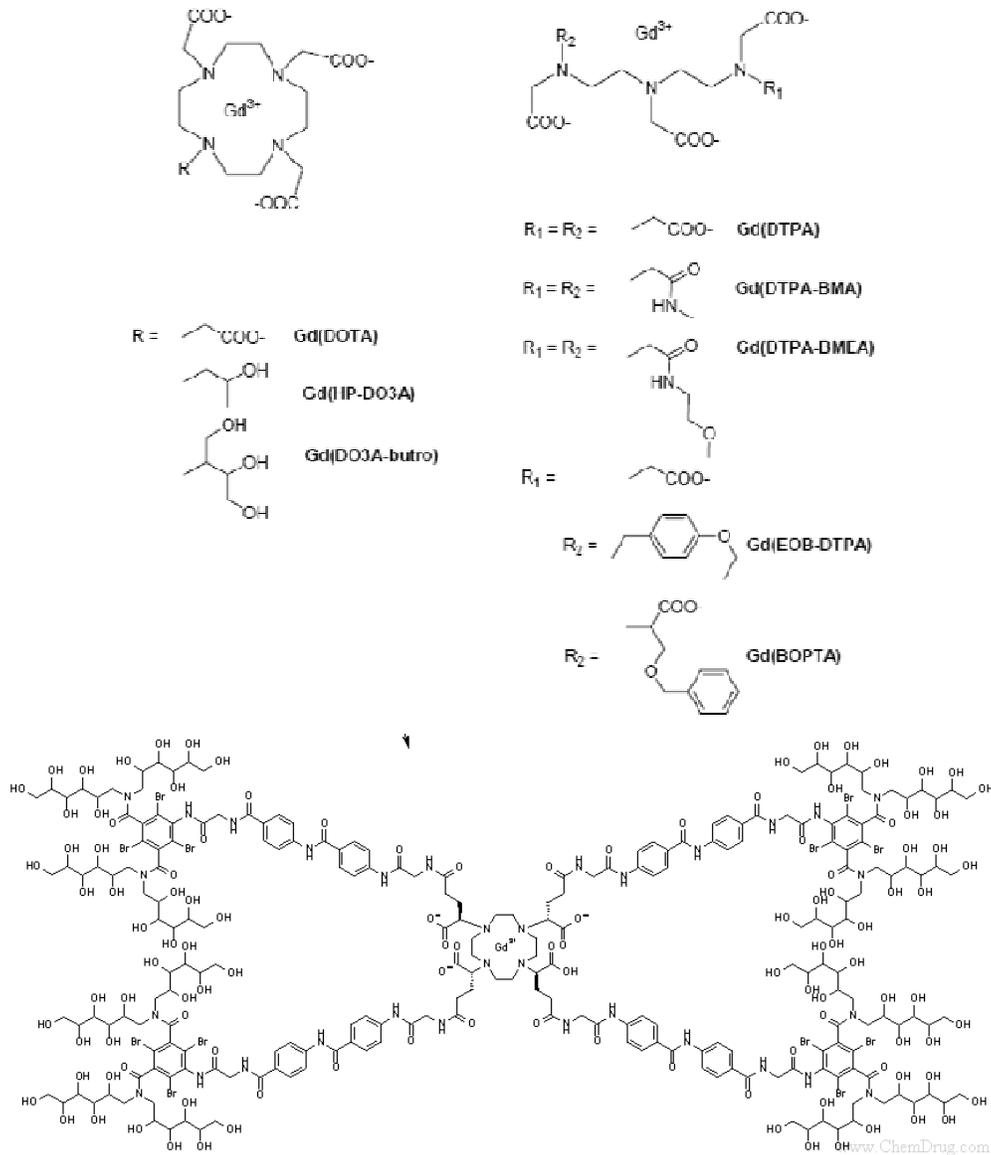


Figure 5 : Macrocyclus dérivés de DOTA⁴⁻ et DTPA⁵⁻ et constituant les principaux agents de contraste paramagnétiques à base de gadolinium [Nonat, 2007]

La substitution des groupes carboxyliques par d'autres groupements ou l'addition de motifs de natures chimiques variées visent à moduler les propriétés physiques des complexes (ex : stabilité, relaxivité) mais aussi leur biodistribution lors de leur administration dans l'organisme. On peut recenser ainsi plus d'une trentaine de composés. Par exemple, la substitution par un groupement comportant un noyau benzénique lipophile permet de cibler plus facilement les cellules du foie.

Ou encore, l'ajout d'une fonction cholestérol crée une affinité particulière pour les glandes surrénales [Muhler et al. 1995]. Cependant, de tels groupements présentent l'inconvénient de réduire la solubilité du complexe dans les milieux aqueux et peuvent modifier le nombre et la vitesse d'échange des molécules d'eau liées au cation gadolinium avec le risque de diminuer leur relaxivité [Hermann et al. 2008]. Sur un autre plan, le greffage de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) sur les complexes de gadolinium permet d'augmenter le temps de circulation dans le compartiment sanguin [Gupta et al. 1995]. La fixation d'anticorps a également été tentée afin de permettre le ciblage. Par exemple, un macro-complexe de Gd(III) (polymère d'environ 65 unités Gd-DTPA) greffé à un anticorps monoclonal RA96 et injecté par voie intraveineuse à des souris nude porteuses de tumeurs du cancer du colon. En dépit de la haute masse moléculaire du complexe, environ 9% de l'agent de ciblage a été retrouvé dans les tumeurs, ce qui témoigne de l'action spécifique de la macromolécule et de l'efficacité du ciblage réalisé [Göhr-Rosenthal et al. 1993].

Toujours pour améliorer l'efficacité des complexes de gadolinium, de nombreuses études ont porté sur leur association avec des liposomes pour permettre d'augmenter la concentration locale en gadolinium tout en contrôlant la biodistribution de l'agent de contraste qui devient alors celle du liposome [Tilcock et al. 1989] [Unger et al. 1989] [Tilcock et al. 1990] [Ghaghada et al. 2008]. A ce titre, l'emploi de vésicules stabilisées par des phospholipides porteurs de chaînes de PEG (liposomes PEG-ylés) a été proposé pour prolonger la demi-vie plasmatique des complexes [Ayyagari et al. 2006]. D'autres travaux ont porté sur des liposomes PEG-ylés chargés de complexes et recouverts en surface par des agents de ciblage [Wiener et al. 1997 ; Fossheim et al 1999 ;Strijkers et al. 2010]

Le gadolinium est de loin le lanthanide qui a été le plus étudié et utilisé en raison de ses performances bien reconnues aujourd'hui. Un seul agent de contraste a été par ailleurs développé à partir d'un élément n'appartenant pas à la famille des terres rares, le manganèse dont l'ion Mn(II) possède 5 électrons non appariés. Il s'agit du Teslascan® (GE Healthcare) ou Mangafodipir (de formule chimique $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{DPDP})]^{2-}$ (Figure 6). Il s'agit d'un agent de contraste extravasculaire et hépatobiliaire. Sa relaxivité, assez faible, est de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à pH 7,4 et 25°C et 1,5 T [Elizondo, 1991 ; Lim et al 1991]. Le mécanisme par lequel le contraste est obtenu repose sur la relative instabilité de la structure qui, une fois dans l'organisme, libère les ions Mn(II) qui vont être pris en charge par les protéines endogènes des hépatocytes. Ce sont en fait les complexes protéiques qui jouent le rôle d'agent de contraste paramagnétique [Rummeny & Marchal 1997]. L'agent de contraste étant de par sa structure destiné à transiter par le foie, il permet d'imager cet organe en pondération T_1 (Figure 7).

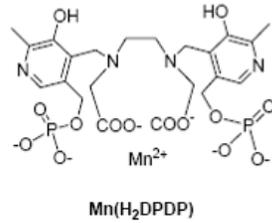


Figure 6 : Agent de contraste commercial à base de Mn(II).

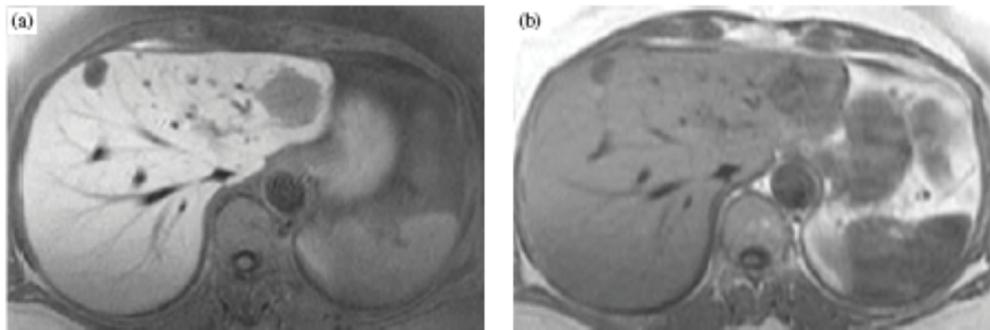


Figure 7 : Image IRM pondérée T₁ d'un foie métastasé. L'image (a) présente une acquisition après injection de l'agent Mn(II) tandis que l'image (b) à été acquise avant injection. [Olivia et Saini, 2004]

II-3. Les Agents de contraste de type T₂

Les agents de contraste T₂ démontrés jusqu'à ce jour les plus efficaces sont des systèmes particuliers essentiellement composés de nanocristaux d'oxydes de Fe(III) superparamagnétiques, magnétite (Fe₃O₄) ou maghémite (γFe₂O₃), chaque atome de fer possédant 5 électrons non appariés. Ces systèmes présentent une excellente biocompatibilité et sont efficaces à très faibles doses. De manière à garantir la stabilité de ces systèmes en milieux aqueux et physiologiques, spécialement dans le compartiment sanguin, il est nécessaire de modifier leur surface. Les principales stratégies sont :

- La stabilisation stérique par adsorption de polymères tels que dextrane, amidon, poly(éthylène glycol), silicone ou de protéines comme l'albumine
- La stabilisation électrostatique par association avec des ions carboxylate afin de créer une charges surfacique négative (ex : citrate, aspartate, acétate).
- L'Encapsulation dans des systèmes réservoirs, notamment dans des vésicules constituées de bicouches de phospholipidiques pour former des magnétoliposomes ou de copolymères amphiphiles pour obtenir des polymersomes magnétiques.

Selon le mode de stabilisation et le nombre de nanocristaux constitutifs des particules, non seulement les propriétés de surface mais également les dimensions des agents de contraste résultants sont variables ce qui influence leur pharmacocinétique et leur biodistribution [Okuhata 1999 ; Weinmann et al. 2003]. On comptabilise ainsi trois catégories d'agents T₂ :

- les très petites particules composées d'un seul grain superparamagnétique de quelques nanomètres ou USPIO (Ultra Small Particles of Iron Oxide) et dont la taille après recouvrement stabilisateur est inférieure à 50 nm.
- les petites particules composées d'un seul grain d'oxyde de fer mais excédant 50 nm après inclusion dans leur revêtement polymère ou SPIO (Small Particles of Iron Oxide).
- Les systèmes multiparticulaires composés de plusieurs grains et dont les dimensions sont de l'ordre de la centaine de nanomètres.

Les agents de contraste commercialisés et utilisés au niveau clinique appartiennent aux deux premières catégories (Tableau 2).

Tableau 2 : agents de contraste T₂ superparamagnétiques commercialisés [Nonat, 2007]

<i>Nom commercial</i>	<i>Laboratoire</i>	<i>Type de particule</i>	<i>stabilisation</i>	<i>Diamètre (nm)</i>	r_1^a <i>mM⁻¹.s⁻¹</i>	r_2^a <i>mM⁻¹.s⁻¹</i>
Clariscan®	GE Healthcare	USPIO	Amidon PEG-ylé	20	20	35
Sinerem®	Guerbet	USPIO	dextrane	20	23	53
Endorem®	Guerbet	SPIO	dextrane	200	24	107
Resovist®	Schering	SPIO	carboxydextrane	62	20	197
Lumirem®	Guerbet	SPIO	silicone	300	3.4	3.8

^a relaxivités mesurées à 0,5 T et 37°C

Les SPIOs

Les plus grosses particules (>200nm) sont injectées par voie orale ou rectale et sont utilisées pour l'exploration des voies gastro-intestinales. Pour les plus petites (entre 50 nm et 200 nm), leur administration par voie intraveineuse va conduire leur capture par les phagocytes mononucléaires de sorte que l'agent de contraste se retrouve principalement dans le foie et la rate. Ces organes deviennent donc les cibles privilégiées de ces agents de contraste. La distribution sera surtout fonction de la taille des SPIO. Plus la taille est importante, plus l'affinité pour le foie et la rate est importante [Okuhata 1999 ; Weinmann et al. 2003].

Concernant l'imagerie du foie, les lésions malignes ont généralement des cellules de Küpffer dysfonctionnelles, ce qui empêche l'absorption des SPIO dans la lésion. Le parenchyme environnant étant sain, ses cellules de Küpffer absorbent les SPIO et une chute de signal sur les séquences pondérées T₂ est alors observée dans cette zone. Le contraste entre tissu sain et tissu malade apparaît alors [Weishaupt 2003]. Quant aux lésions hépatiques bénignes, elles n'empêchent pas l'activité des cellules de Küpffer. Les SPIO vont donc pouvoir être captés au niveau des tumeurs hépatiques bénignes et par les cellules saines environnantes de sorte que la chute du signal sur les séquences pondérées T₂ s'opère sur les deux types de tissus et rend leur distinction impossible. [Weishaupt 2003]. Cette différence de contraste entre lésion bénigne et maligne peut être mise à profit pour le diagnostique (Figure 8).

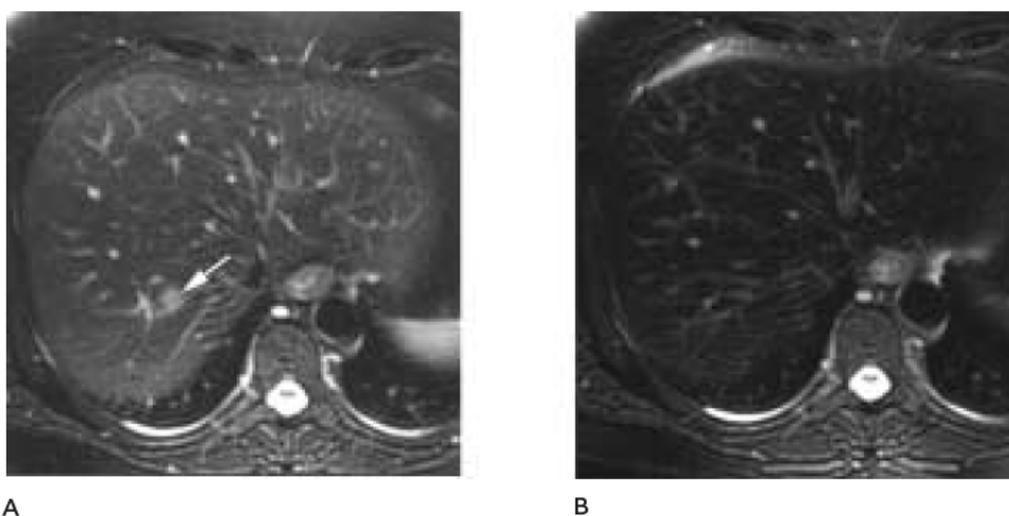


Figure 8 : IRM du foie d'un patient en coupe axiale A: l'examen sans agent de contraste révèle une tumeur (flèche) L'examen avec injection de SPIO en B montre la lésion ainsi que le parenchyme hépatique environnant avec une chute de signal en pondération T₂, ce qui permet de conclure à une tumeur bénigne. [Weishaupt 2003]

La modification chimique des particules d'oxyde de fer conduisant à la fixation en surface d'agents de reconnaissance spécifique des tissus biologiques a été envisagée pour orienter le diagnostic IRM. Citons à ce titre une étude réalisée sur l'imagerie ciblée l'apoptose dans des modèles de tumeurs solides EL4 exposées à un agent chimiothérapeutique [Zhao et al. 2001]. Les particules SPIO ont été conjuguées au fragment C2 de la protéine synaptotagmine qui se lie à la phosphatidylsérine présente à l'extérieur de la membrane plasmique des cellules apoptotiques (Figure 9).

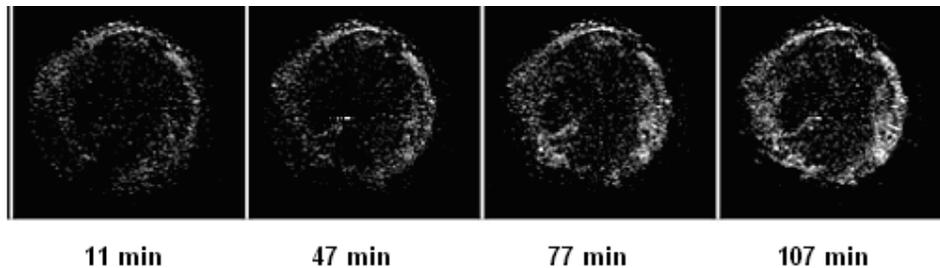


Figure 9: Images IRM de la tumeur d'une souris traitée par chimiothérapie et après injection d'un agent de ciblage C₂-SPIO à différentes périodes après injection. L'hypersignal qui apparaît révèle le processus apoptotique des cellules [Zhao et al. 2001].

Le ciblage par la fixation des anticorps ou des peptides de reconnaissance est également possible. En effet, le ciblage magnétique s'avère utile pour des pathologies dont le tissu malade est localisable et suffisamment proche de l'influence d'un aimant extracorporel. Le ciblage biochimique s'avère nécessaire lorsque la cible n'est pas totalement localisée ou lorsque l'organe à atteindre est profond. L'inconvénient du ciblage par utilisation d'anticorps ou de peptides est la grande taille de ces molécules qui peut gêner l'accès de l'agent de contraste au site visé. Toutefois, la perméabilité vasculaire accrue de manière significative dans les sites d'inflammation ou dans les tumeurs solides peut faciliter ce type de ciblage [Artemov, 2003].

Les USPIOs

Afin d'échapper à leur capture phagocytaire et atteindre d'autres zones que le foie, le diamètre des particules d'oxyde de fer doit être diminué pour atteindre un diamètre inférieur à 50 nm. Ces petites particules ou USPIO montrent en effet des temps de circulation plus longs dans le compartiment sanguin où ils peuvent être injectés directement. Ceci en fait des agents de contraste efficaces pour l'angiographie qui présentent l'avantage de pouvoir atteindre différents organes autres que le foie [Toth, 2001].

A l'instar des SPIO, les USPIO provoquent une chute du signal sur les images en séquence pondérée T₂. De même que pour les SPIO, il est possible de déterminer le caractère bénin ou ou non d'un tissu : s'il est de nature maligne, les macrophages autochtones seront dysfonctionnels, donc n'absorberont pas les USPIO, et le signal en séquence pondérée T₂ ne chutera qu'autour de la lésion. S'il est bénin, les macrophages fonctionnels absorberont les USPIO et apparaîtront aussi atténués que les tissus environnants.

Comme déjà illustré ci-dessus pour des SPIO dans le cas du foie, ici une étude sur le cancer prostatique a permis de montrer qu'il était possible de distinguer ainsi de manière fiable l'existence de tumeurs ganglionnaires malignes ou non [Harisinghani 2003].

Systemes multiparticulaires

Les systemes multiparticulaires font intervenir une structure reservoir capable d'assimiler plusieurs nanoparticules d'oxyde de fer. Plusieurs types de particules ont été envisagés (Figure 10).

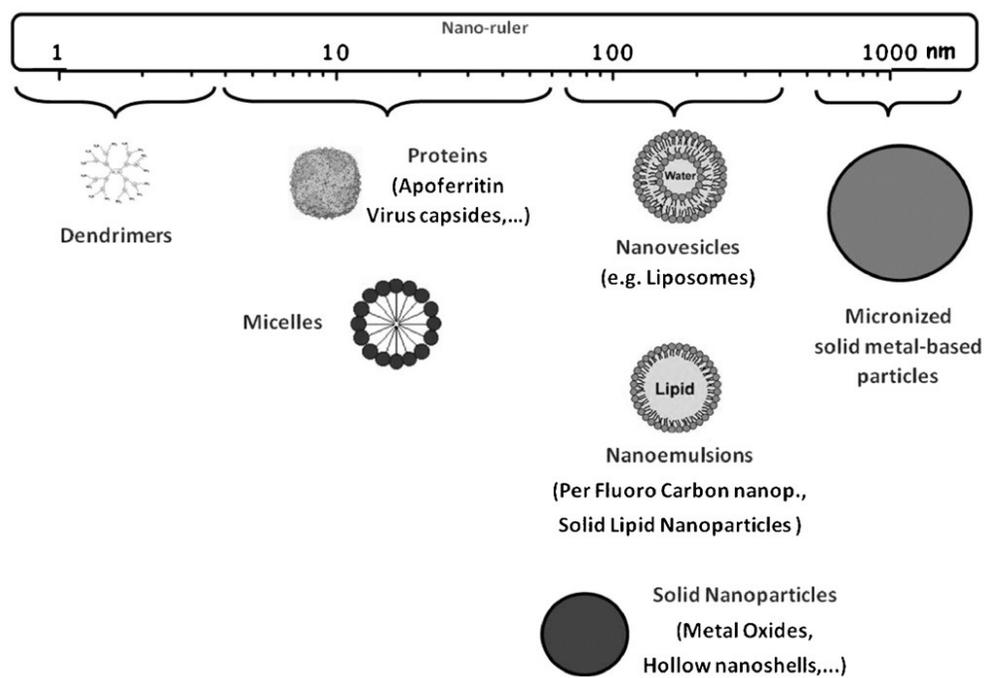
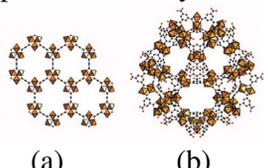


Figure 10 : Du dendrimère à la microsphère, systemes d'encapsulation multiparticulaires d'agents de contraste en fonction de leur taille et de leurs caracteristiques physico-chimihimiques [Delli Castelli et al. 2008].

Même si aucun d'entre eux n'a donné lieu à ce jour à une application au niveau clinique, le concept est assez prometteur puisqu'il repose sur la combinaison des propriétés de l'agent de contraste en tant que tel et de celles apportées par le systeme hôte et par l'augmentation de la concentration locale en grains magnétiques au sein d'une même entité. Le tableau 3 regroupe les principaux systemes développés.

Tableau 3 : agents T₂ superparamagnétiques multiparticulaires et leurs relaxivités (37°C)

désignation	références	Diamètre moyen (nm)	r ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r ₂ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	Champ magnétique (Tesla)
Microsphères magnétiques d'amidon	Colet et al. 1998	200	-	182	0,5
Nanoparticules de polyacrylamide	Moffat et al. 2003	60	1,7	910	7
Lipoparticules PEG-ylées	Bulte et al. 1999	40	3	240	1,5
Liposomes PEG-ylés	Pauser et al. 1997	194	2,7	37,5	2,35
Liposomes PEG-ylés	Martina et al. 2005 Fortin-Ripoche et al. 2006 Plassat et al. 2007	200	7,6	130	0,5
Nanostructures organométalliques poreuses PEG-ylées  (a) (b)	Horcajada et al. 2009	(a) 150 (b) 200	n.d.	(a) 95 (b) 92	9,4
Polymersomes	Sanson et al. 2011	100	1.3 à 5.5 selon diamètre des USPIO	37 à 283 selon diamètre des USPIO	4.7 T

Il est intéressant de noter que les particules d'oxydes de fer ne sont pas toujours encapsulées dans un domaine aqueux comme c'est le cas des liposomes mais qu'elles peuvent être incorporées individuellement dans la structure du transporteur. C'est le cas par exemple, des nanostructures organométalliques poreuses PEG-ylées synthétisées par Horcajada et al. (cf Tableau 3) ou encore de vésicules formées à partir de membranes biologiques (Figure 11) qui fixent en surface les grains d'oxyde de fer [Vats et al. 2010].

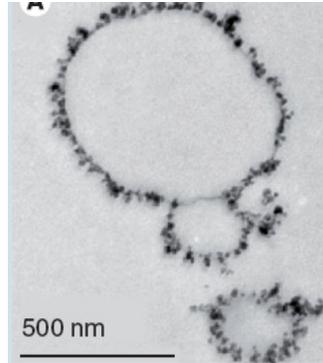


Figure 11 : Image de microscopie électronique à transmission, (MET) de vésicules préparées avec des membranes de cellules endothéliales de cordon ombilical humain. Les nanoparticules anioniques d'oxyde de fer revêtu d'ions citrate sont liées à la membrane.

Le double avantage d'un système multiparticulaire d'oxyde de fer repose sur l'efficacité du contraste IRM produit en pondération T_2 et la possibilité d'un ciblage magnétique par application d'un gradient de champ magnétique produit par un aimant externe [Fortin et al. 2006]. Par exemple, il a été démontré que des liposomes chargés de nanocristaux de maghémite pouvaient être concentrés au niveau de tumeurs xenogreffées chez la souris par exposition à un petit aimant de 0,4 T [Fortin et al. 2006]. La Figure 12 montre nettement l'accumulation préférentielle au niveau du tissu ciblé. La structure vésiculaire présente un avantage supplémentaire qui est de pouvoir incorporer d'autres substances hydrophiles ou lipophiles, principe actif thérapeutique ou autre marqueur pour l'imagerie. La Figure 13 illustre cette possibilité. Les auteurs ont inséré un lipide fluorescent porteur d'un groupe rhodamine dans la bicouche de magnétoliposomes et ont ainsi pu mettre en évidence chez la souris par spectroscopie de fluorescence in vivo le ciblage du cerveau [Rivière et al. 2007].

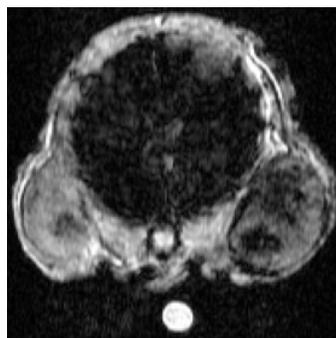


Figure 12 : Images par Résonance Magnétique pondérées T_2 d'une souris portant deux tumeurs d'adénocarcinome prostatique humain. La tumeur de droite présente un hyposignal significatif de la présence d'une forte concentration de magnétoliposomes accumulés après injection intraveineuse par application locale d'un gradient de champ magnétique [Fortin et al. 2006].

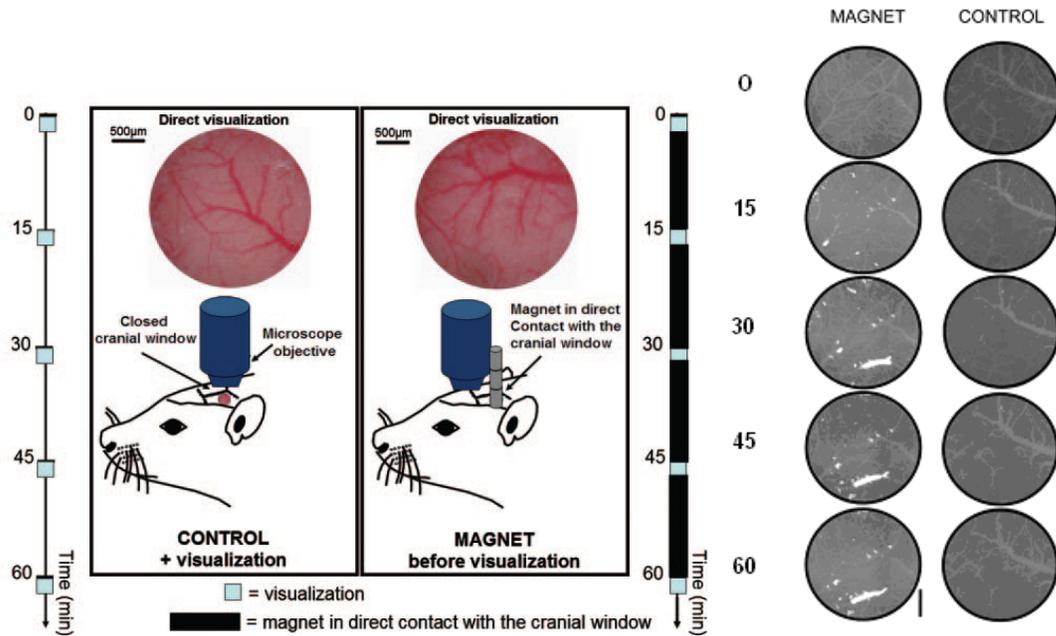


Figure 13 : Dispositif expérimental permettant d’observer le cortex de souris par microscopie de fluorescence. Les images montrent l’accumulation vasculaire de magnétoliposomes (en blancs sur les images) en fonction du temps, après injection intraveineuse et exposition à un aimant. la barre d’échelle correspond à 500µm) [Rivière et al. 2007]

En résumé, les systèmes multiparticulaires permettent de moduler les fonctionnalités de l’agent de contraste :

- Furtivité (par couplage avec de substances créant une répulsion stérique)
- Ciblage (ciblage physique par guidage sous gradient de champ magnétique ou ciblage biochimique par fixation en surface de ligands spécifiques)
- Co-transport de médicaments ou d’ADN dans la partie hydrophile ou hydrophobe de la particule (théranostique)
- Libération contrôlée de principes actifs en utilisant des systèmes thermosensibles ou chimiosensibles (pH, dégradation enzymatique...)

Par exemple, la délivrance sélective d’un anti-œstrogène, leRU 58668, par guidage magnétique de magnétoliposomes véhiculant dans leur bicouche lipidique la substance active a été démontrée. L’efficacité thérapeutique du ciblage magnétique a été démontrée [Plassat et al. 2011]. Les magnétoliposomes sont accumulés dans le tissu tumoral au niveau intracellulaire. Une seconde série d’expériences in vitro ont montré que les liposomes étaient endocytés sous forme de structures intactes par les cellules (Figure 14).

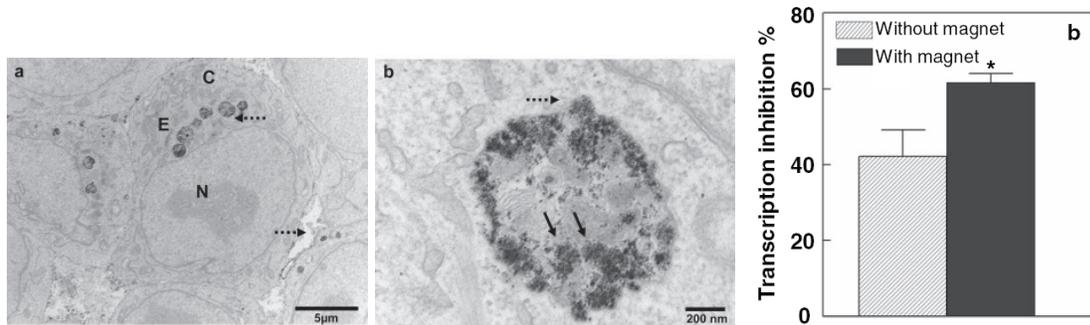
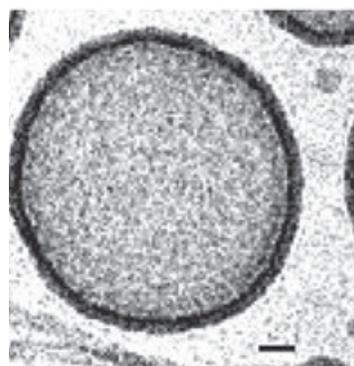


Figure 14: Images demicroscopie électronique à transmission d'une cellule MCF-7 après incubation de 4 h à 37 °C avec des magnétoliposomes chargés en RU 58668 en présence d'un aimant de 0.44μT (155 T/m). A échelle cellulaire (a), des endosomes (E) contenant des liposomes sont visibles (C : cytoplasme ; N : noyau). L'image (b) montre un endosome contenant des entités de taille voisine de 200nm remplies de grains d'oxyde de fer qui correspondent aux magnétoliposomes internalisés par la cellule. L'activité de l'antiestrogène délivré aux cellules avec et sans aimant est nettement améliorée comme le montre l'histogramme obtenu à partir d'expériences de transcription sur cellules MELN [Plassat et al. 2011].

D'autres groupes ont récemment développé un agent de contraste multiparticulaire constitués de polymères amphiphiles synthétiques ou polymersomes, s'associant pour former des vésicules stabilisées stériquement dont les propriétés d'agent de contraste et de vecteur magnétique de molécules actives sont prometteuses [Sandre et al. 1999 ; Aranda-Espinoza et al. 2001 ; Mabrouk et al. 2009 ; Sanson et al. 2011]. La particularité des polymersomes est due aux masses moléculaires des polymères constitutifs, 10 à 100 fois plus élevée que celle des lipides, ce qui augmente de fait l'épaisseur de la bicouche membranaire, au sein de laquelle sont incorporées les particules d'oxyde de fer (Figure 15).



20 nm

Figure 15 : Image d'un polymersome obtenue par cryo-microscopie électronique à transmission. L'épaisseur de la bicouche atteint 8 nm [Discher et al.1999].

Dans le cadre des études de Lecommandoux et ses collaborateurs, la membrane polymère est constituée de polycarbonate de triméthyle, polyester biocompatible et biodégradable, auquel est fixé du polyglutamate, oligopeptide hydrophile apportant une stabilisation stérique et permettant le greffage d'un agent de ciblage tel qu'un anticorps [Sanson et al. 2011].

Les polymersomes ont été chargés de doxorubicine (Figure 16). L'anticancéreux peut être libérée par par l'application d'un champ magnétique alternatif conduisant à la perméabilisation de la membrane des vésicules sensible à l'échauffement localement produit.

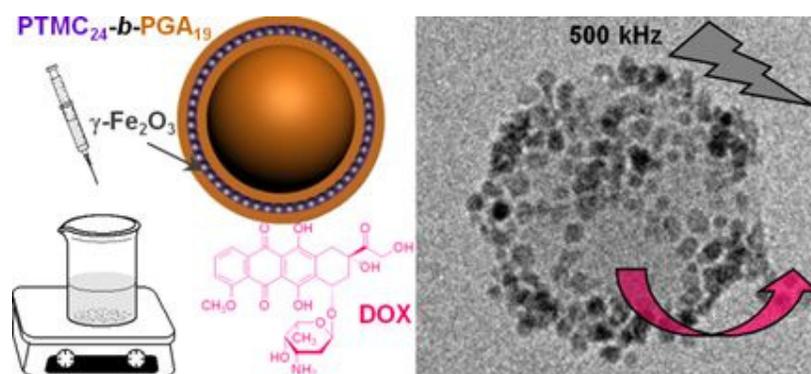


Figure 16: Préparation de vésicules de type polymersome par « nano-précipitation » d'un mélange de copolymère et de nanoparticules d'oxyde de fer hydrophobes L'image de droite, réalisée par cryo-microscopie électronique à transmission, montre la structure d'un polymersome. La flèche schématise la libération de doxorubicine, qui est fortement accélérée par application d'un champ magnétique alternatif à une fréquence de 500kHz pendant 30 minutes, sans élévation de la température corporelle [Sanson et al. 2011].

Des polymersomes de poly(2-hydroxyéthyl aspartamide), poly(éthylène glycol) et de poly(éthylène imine) chargé cationiquement, ont permis l'acquisition d'image IRM sur modèle murin en même temps que la délivrance de gènes dans une tumeur cancéreuse [Lee et al. 2012]. Les vésicules contenant des SPIO ont permis un guidage magnétique de la substance active dans la tumeur (Figure 17).

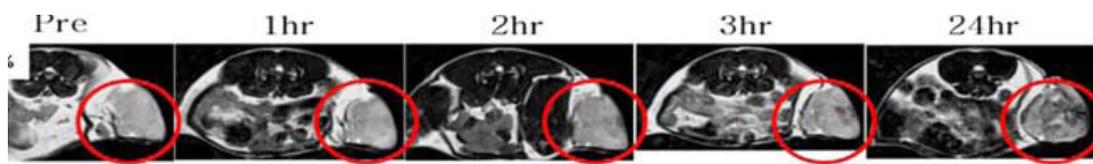


Figure17: Accumulation intra-tumorale de polymersomes chargés en SPIO et en fragments d'ADN. Images par IRM pondérée T2 d'une souris porteuse d'une tumeur xenogreffée avant injection intraveineuse puis en fonction du temps [Lee et al. 2012].

Aujourd'hui, malgré les progrès indéniables du ciblage des agents de contraste de relaxivité, biochimique ou magnétique, les avancées ne permettent pas encore une utilisation clinique généralisée. Parallèlement, même si le tissu cible peut être enrichi en agent de contraste, la sensibilité résultant du simple processus de relaxation de l'aimantation des protons de l'eau endogène n'est pas toujours suffisante d'autant plus qu'il est difficile d'atteindre une résolution au niveau cellulaire de la réponse IRM. Dans ce but, d'autres stratégies de contraste sont envisagées, telles que par exemple l'exploitation du phénomène de transfert de saturation de l'aimantation par échange chimique qui augmente considérablement la sensibilité de la réponse IRM [Hancu et al, 2010] et qui fait l'objet du chapitre suivant.

III. Les agents de contraste de type CEST

Le transfert de saturation de l'aimantation d'une entité chimique A à une autre entité chimique B par l'intermédiaire d'un échange d'atomes ou de molécules mobiles entre ces deux entités, encore désigné en anglais *Chemical Exchange Saturation Transfer* ou CEST, a été introduit en imagerie par résonance magnétique il y a une dizaine d'années environ comme une alternative à l'IRM de relaxivité. En IRM-CEST, l'agent de contraste, composé endogène ou exogène, possède un ou plusieurs groupes de protons échangeables avec les molécules d'eau du milieu environnant ou eau « bulk » de telle sorte que l'irradiation sélective de la résonance de ces protons jusqu'à saturation va induire la diminution de l'intensité de résonance des protons de l'eau libre. C'est cette diminution d'intensité qui est exploitée pour construire une image en générant un contraste négatif. La comparaison des images réalisées en présence ou en absence d'une impulsion radiofréquence saturant l'aimantation des protons mobiles révèle la présence de la molécule responsable du contraste. L'avantage principal de cette méthode est sa sélectivité potentielle puisqu'à chaque proton échangeable correspond en principe une fréquence de résonance précise déterminée par son environnement chimique. Dans l'absolu, toute molécule présentant des protons labiles telle que amines, alcools, thiols (...) ou capables de lier réversiblement au moins une molécule d'eau en modifiant sa mobilité est un candidat potentiel. L'IRM-CEST a donc été naturellement utilisée pour augmenter le contraste entre tissus de nature différente, détecter des molécules ou métabolites endogènes d'intérêt agissant comme leur propre agent de contraste ou faire apparaître des modifications locales de composition au niveau de lésions ou d'anomalies physiologiques [Henkelman et al 2001]. Ainsi, le transfert d'aimantation est une technique reconnue et appliquée en angiographie IRM [Dennis et al. 1995]. Un autre exemple concerne le suivi du métabolisme du glycogène (Figure 1) essentiel pour comprendre l'origine de certaines pathologies comme les diabètes de type 2 [van Zijl et al, 2007].

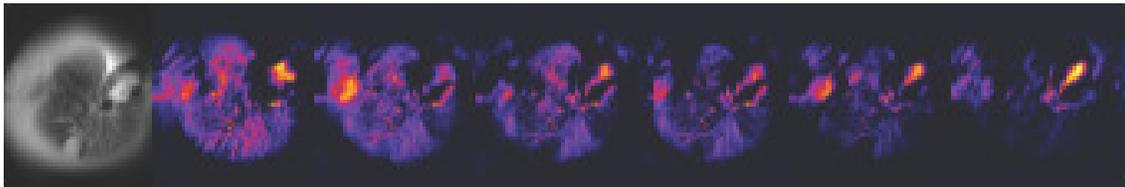


Figure 1: Suivi par IRM-CEST de la diminution du taux de glycogène dans le foie d'une souris perfusée avec une solution de glucagon. Les images ont été réalisées à 3 T (séquence spin-écho) à une fréquence de résonance de 1 ppm (protons mobiles des groupes hydroxyle du glycogène) et une impulsion radiofréquence à 3 μ T. [van Zijl et al 2007].

Citons aussi la détection de métabolites présents dans le foie tels que acides aminés ou protéines (Figure 2) ou la possibilité de mettre en évidence le défaut de certaines substances endogènes comme par exemple le phénomène de démyélinisation chez les malades atteints de sclérose en plaques (Figure 3).

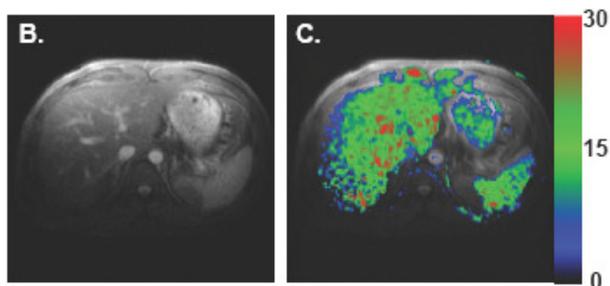


Figure 14 : images du foie d'un patient sain réalisées en IRM clinique à 3T (séquence écho de gradient) (B) en absence ou (C) en présence de transfert de saturation de l'aimantation des protons mobiles des fonctions amines des métabolites endogènes (fréquence de résonance de 3 ppm et impulsion radiofréquence à 12 μ T). D'après [Cai et al, 2011].

L'utilisation du transfert d'aimantation en IRM du proton exploite ainsi soit l'échange de molécules d'eau endogènes entre macromolécules présentes dans les tissus, principalement protéines et lipides, auxquelles elles sont transitoirement associées par liaisons hydrogène et le cytosol au sein duquel elles possèdent un plus grand degré de liberté [Wolff et al. 1989], soit l'échange de protons labiles des composés biologiques s'échangeant avec l'eau libre des tissus qui repose souvent sur le comportement acido-basique de ces composés [Grossman et al. 1994, Wolff et al. 1994, Henkelmann et al. 2001].

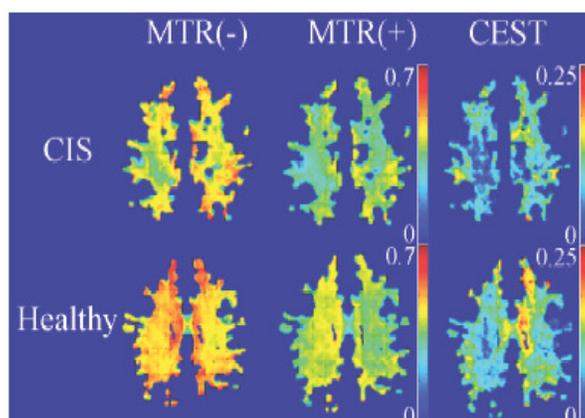


Figure 3 : Images CEST de cerveaux d'un patient sain et d'un patient atteint de sclérose en plaque (CIS) (IRM clinique à 7T-3,5 ppm) obtenues par soustraction des acquisitions réalisées en absence (MTR-) et en présence (MTR+) d'une impulsion radiofréquence (13,5 μ T). La perte d'intensité constatée au niveau de la substance blanche sur l'image CEST du cerveau malade indique le déficit en myéline. [d'après Al-Radaideh et al].

Cependant le contraste endogène se limite aux tissus possédant un marquage intrinsèque et peut dans certaines situations s'avérer peu efficace. Il est alors nécessaire d'avoir recours à des agents CEST exogènes. En pratique ces agents doivent remplir certaines conditions pour que la réalisation d'une image soit possible, notamment la vitesse de l'échange chimique doit être compatible avec l'échelle de temps de la RMN et la fréquence de résonance des protons échangeables suffisamment différente de celles des protons de l'eau des tissus. Ce dernier aspect est complexe puisque les matrices biologiques et les protéines endogènes présentent des protons mobiles qui, comme nous l'avons vu, ont leur propre effet CEST et contribuent à élargir la gamme de fréquence de résonance de l'eau de référence. S'ajoute le problème de la sensibilité de la méthode qui dépend du nombre de protons échangeables. Actuellement, le challenge consiste à mettre au point des agents CEST capables de répondre à ces contraintes et d'être dotés de propriétés complémentaires comme la possibilité de contrôler leur biodistribution voire de cibler ces systèmes *in vivo* jusqu'aux sites d'intérêt.

On distingue principalement deux catégories d'agents de contraste CEST. Les agents diamagnétiques, ou agents DiaCEST, possèdent des protons échangeables dans leur structure chimique la plus part du temps appartenant à des fonctions amine (-NH), acide ou alcool (-OH). Leur signal de résonance en RMN du ^1H apparaît autour de 5ppm par rapport au signal de l'eau libre. L'observation de ce déplacement chimique demande une constante d'échange relativement lente, ce qui limite l'effet observé par rapport à la dose injectée. Les agents paramagnétiques, ou agents ParaCEST, sont des complexes d'ions paramagnétiques le plus souvent de terres rares qui lient transitoirement des protons dont les déplacements chimiques des protons sont beaucoup plus importants pouvant dépasser la centaine de ppm.

Dans ce qui suit, après un rappel sur le principe de l'effet CEST nous présenterons les principaux exemples d'agents de contraste CEST diamagnétiques et paramagnétiques développés depuis ces quinze dernières années.

III-1. Effet CEST : principe

Le mécanisme de transfert de saturation de l'aimantation par échange chimique (CEST) initialement dénommé transfert de saturation ou d'aimantation (en anglais «*magnetization transfer*») implique lors de la mesure de résonance magnétique d'un noyau sa transition entre deux sites de nature ou d'environnement chimiques différents. L'expérience consiste à appliquer une impulsion radiofréquence capable de saturer la réponse magnétique du noyau lorsqu'il est au niveau du premier site de sorte que lorsqu'il atteint le second site son signal de résonance reste au moins en partie saturé. Rappelons que dans le cas du proton qui possède un nombre de spin égal à $\frac{1}{2}$, dans un champ magnétique uniforme et constant \mathbf{B}_0 , son moment magnétique s'oriente soit dans la même direction que \mathbf{B}_0 (état de faible énergie α), soit dans la direction opposée (état de forte énergie β). Pour un ensemble de protons ayant le même environnement chimique, la répartition des moments magnétiques selon ces deux états d'énergie suit la loi de Boltzmann :

$$N_\beta/N_\alpha = \exp(-\Delta E/kT) \quad [1]$$

ΔE désigne la différence d'énergie entre les deux états et k est la constante de Boltzmann. A l'équilibre, le niveau de faible énergie est légèrement plus peuplé que celui de forte énergie de sorte que le nombre de protons dans l'état α (N_α) est supérieur au nombre de protons dans l'état β (N_β). Il en résulte une aimantation macroscopique résultante non nulle et parallèle à \mathbf{B}_0 . Si on applique à présent une impulsion radiofréquence fournissant une énergie voisine de ΔE pendant une durée adéquate, les protons excédentaires de faible énergie vont venir peupler l'état de forte énergie. Il y a saturation lorsque $N_\alpha = N_\beta$ et l'aimantation macroscopique s'annule (Figure 4). Le signal RMN, proportionnel à l'aimantation, disparaît.

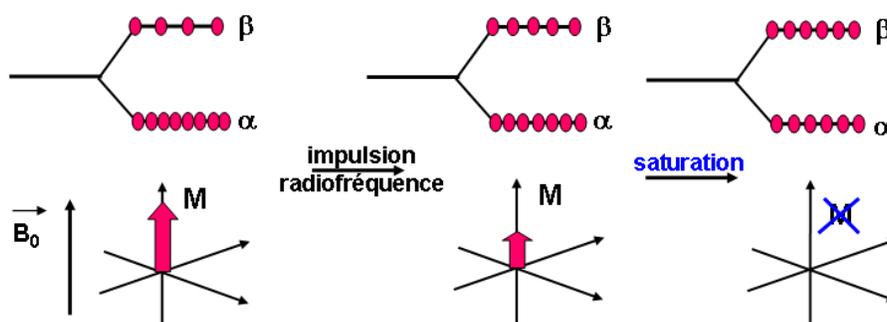


Figure 4 : Evolution de la distribution de Boltzmann des moments magnétiques de protons placés dans un champ magnétique B_0 sous l'influence d'une impulsion radiofréquence conduisant à l'équilibre des populations entre les états énergétiques α (faible énergie) et β (forte énergie) c'est-à-dire à l'état de saturation de l'aimantation.

Considérons à présent deux réservoirs A et B de protons d'un même échantillon (ou tissu biologique) procurant un environnement chimique distinct et tels que les protons puissent s'échanger entre ces deux réservoirs avec une cinétique d'échange caractérisée par la constante de vitesse k_{ex} . La saturation de l'aimantation des protons du réservoir B aura un effet sur le signal RMN mesuré pour les protons du réservoir A si et seulement si la vitesse d'échange entre les deux réservoirs est inférieure ou au moins égale à la différence entre les fréquences de résonance des protons dans les deux réservoirs $\Delta\omega$:

$$k_{ex} \leq \Delta\omega \quad [2]$$

Dans ce cas, l'échange chimique des protons depuis le réservoir B vers le réservoir A va entraîner une modification de la distribution d'équilibre de Boltzmann des protons du réservoir A (Figure 5). De plus, on constate aisément que plus la différence $\Delta\omega$ de fréquences est importante, plus la vitesse d'échange tolérée peut être rapide et donc plus la quantité de protons qui peuvent être saturés dans l'état B augmente, ce qui favorise le rendement du transfert de saturation et augmente la sensibilité de l'effet CEST. Néanmoins, en pratique, l'effet CEST reste très efficace puisqu'une saturation de l'aimantation de seulement 10% des protons échangeables d'un agent de contraste CEST (réservoir B) est souvent suffisante pour atténuer significativement le signal de l'eau libre des tissus (réservoir A) [Viswanathan et al. 2009].

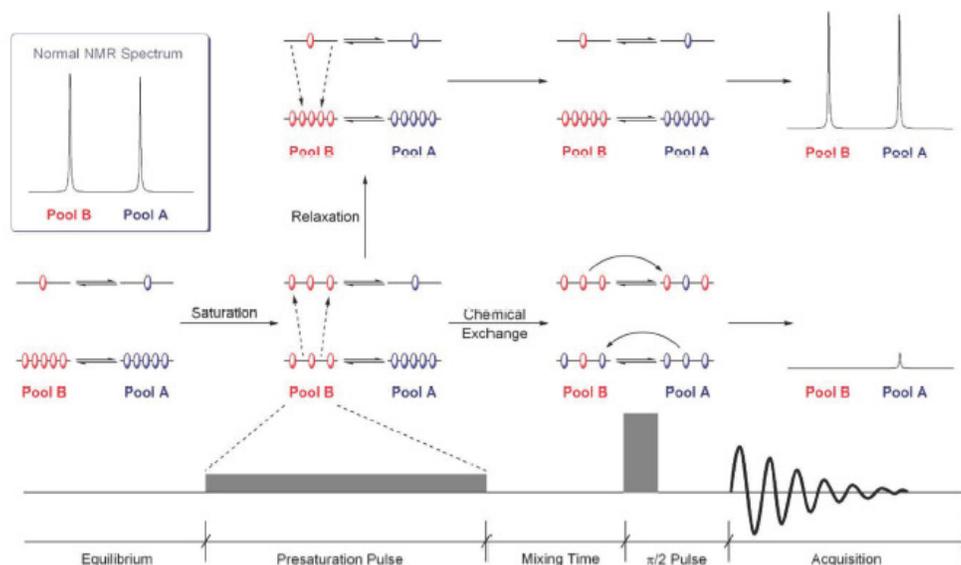


Figure 5 : Schéma décrivant l'effet CEST sur le signal de RMN de protons s'échangeant entre 2 réservoirs (pools A et B) caractérisés par des fréquences de résonance distinctes. Quand les protons du pool B subissent une irradiation sélective radiofréquence entraînant la saturation de leur aimantation, le signal des protons du pool A diminue. [D'après Woods et al 2006 et 2009]

Une seconde condition pour observer un transfert de saturation de l'aimantation concerne les propriétés de relaxation des protons des deux réservoirs. En effet si le temps d'échange entre les deux réservoirs est plus long que le temps de relaxation longitudinal (T_1) des protons considérés, leur aimantation sera revenue à l'équilibre soit avant le transfert de saturation (T_1 des protons B trop court), soit avant que la mesure de l'atténuation du signal RMN puisse être réalisée (T_1 des protons A trop court). Ainsi la vitesse de l'échange chimique doit être plus lente que la vitesse de relaxation des protons appartenant aux deux réservoirs.

En imagerie CEST, les réservoirs de protons échangeables sont d'une part celui de l'eau libre des tissus ou du cytosol et d'autre part celui correspondant aux sites transitoires d'association avec l'agent de contraste CEST qu'il soit endogène ou exogène. Pour des systèmes simples, la loi cinétique d'échange chimique est généralement du premier ordre et la constante de vitesse k_{ex} est proportionnelle à la constante cinétique d'échange par site d'échange k_1 que multiplie le nombre de sites (c'est-à-dire la concentration en agent de contraste $[A]$) et le nombre de protons échangeables par site $[n]$ [Ward et al 2000 ; Woods et al 2006 & 2009] :

$$k_{ex} = k_1 [A] [n] \quad [3]$$

En pratique, l'eau libre des tissus vivants atteint environ une concentration de 80 M et la concentration tolérée pour un agent de contraste exogène ne doit pas excéder 1 mM. Il est donc avantageux d'utiliser des agents de contraste présentant plusieurs protons échangeables et un effet sur le déplacement chimique de ces protons important (ce qui permet d'augmenter k_A) pour diminuer les doses utiles. De plus, une grande différence de fréquence $\Delta\omega$ permet une meilleure sélectivité de la présaturation des protons liés à l'agent CEST sans risque de saturer simultanément une partie des protons de l'eau libre des tissus ni les protons associés aux substances endogènes elles-mêmes se comportant comme des agents CEST.

III-2. Spectroscopie CEST ou Z-spectroscopie

Dans les expériences CEST, le spectre qui est tracé représente l'atténuation relative de l'intensité du signal de l'eau libre en fonction de la fréquence (ω en ppm) de l'impulsion appliquée pour saturer l'aimantation des protons échangeables (transitoirement liés à l'agent CEST endogène ou exogène) en prenant comme référence celle de l'eau libre (0 ppm). Le champ magnétique des différentes impulsions radiofréquence \mathbf{B}_1 appliquées est fixé. Ainsi, on porte la variation du rapport M_z/M_0 de l'aimantation des protons de l'eau libre après (composante en z après présaturation M_z) et en absence (composante à l'équilibre M_0) de l'application d'une impulsion radiofréquence en fonction de la valeur de celle-ci. Grad et Bryant utilisèrent pour la première fois le terme spectre « Z » ou en anglais « Z-spectrum »

pour désigner un spectre CEST en notant $Z=M_z/M_0$ [Grad & Bryant 1990]. Pour obtenir un spectre CEST (ou *Z-spectrum*), chaque impulsion radiofréquence est appliquée pendant une durée définie (étape de présaturation), suivie d'une séquence écho de gradient ou spin-écho qui permet de mesurer l'intensité du signal de l'eau libre (Figure 5). La répétition de cette expérience sur une plage de fréquences différentes donne un spectre CEST complet pour l'agent de contraste étudié. La Figure 6 montre l'exemple du spectre CEST d'une solution aqueuse d'acide barbiturique. La fréquence de saturation des protons liés à l'acide est décalée de 5 ppm par rapport à celle des protons de l'eau libre et le maximum de transfert de saturation correspond à une atténuation proche de 50% du signal de ces protons.

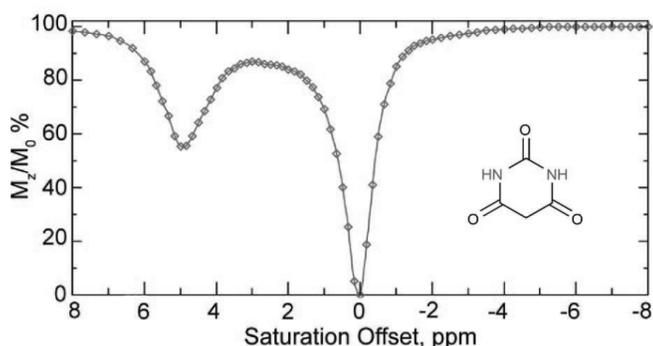


Figure 615 : Spectre CEST d'une solution aqueuse d'acide barbiturique [adapté de Sherry et al. 2008]

Une autre représentation du spectre CEST consiste à reporter la diminution de l'intensité du signal des protons de l'eau libre soit $1-(M_z/M_0)$ ou $1-(I_z/I_0)$ ou encore $1-Z$, en fonction de la fréquence (Figure 7).

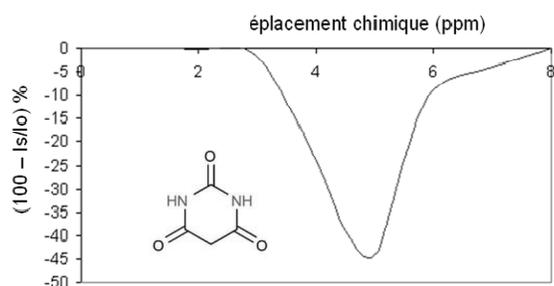


Figure 7 : Spectre CEST d'une solution aqueuse d'acide barbiturique représenté en reportant la diminution de l'intensité du signal des protons de l'eau libre [adapté de Sherry et al. 2008]

Il est intéressant de noter que le rapport M_z/M_0 dépend de la vitesse d'échange des protons entre les sites de liaison à l'agent CEST et l'eau libre ainsi que du temps de relaxation des protons en présence de l'impulsion radiofréquence de saturation selon la relation simplifiée:

$$M_z/M_0 \sim 1/(1+k_{ex} \cdot T_1) \quad [4]$$

En effet, reprenons le cas de deux réservoirs A et B, A correspondant aux protons mobiles de l'eau libre et B représentant la population de protons échangeables. A l'équilibre, l'aimantation de chaque type de protons Mo^A et Mo^B est proportionnelle à leurs concentrations respectives ($[H_A] \sim Mo^A$; $[H_B] \sim Mo^B$). Ainsi, le transfert d'aimantation entre protons A et B est directement relié à la cinétique d'échange chimique entre les deux réservoirs. Lors d'un échange, les protons se déplacent de A vers B à la vitesse $k_A = 1/\tau_A$ (τ_A est le temps de résidence des protons dans le réservoir A). Quand une impulsion radiofréquence est appliquée et que l'aimantation des protons échangeables est complètement saturée, les protons qui quittent le réservoir A avec une aimantation Mz^A vont être remplacés par des protons venant du réservoir B qui n'ont pas d'aimantation entraînant une diminution de l'aimantation globale dans le réservoir A à une vitesse $k_A \cdot Mz^A$. En même temps le phénomène de relaxation spin-réseau entraîne le retour à l'équilibre de l'aimantation des protons du réservoir A à leur état d'équilibre avec une vitesse $(Mo^A - Mz^A)/T_{1A}$. A l'état stationnaire, les deux vitesses sont égales, de sorte que :

$$k_A Mz^A = (Mo^A - Mz^A)/T_{1A} \quad [5]$$

ou encore, en faisant apparaître le rapport Z :

$$Z = Mz^A/Mo^A = \tau_A / (\tau_A + T_{1A}) \quad [6]$$

L'échange de matière entre les deux réservoirs permet par ailleurs d'établir que la relation entre les temps de résidence des protons respectivement dans le réservoir A (τ_A) et dans le réservoir B (τ_B) est telle que : $\tau_A = \tau_B \cdot (Mo^B/Mo^A)$. L'équation [6] peut donc s'écrire en fonction de la teneur en protons échangeables (proportionnelle à Mo^B/Mo^A) et du temps de résidence des protons dans B :

$$Z = Mz^A/Mo^A = \tau_B / (\tau_B + (Mo^A/Mo^B)T_{1A}) \quad [7]$$

En transposant à la situation agent de contraste (réservoir B) et eau libre des tissus (réservoir A), il apparaît que l'effet CEST (Z) sera d'autant plus marqué que la concentration en agent de contraste sera élevée et que la durée de vie des protons dans leur état lié à ce dernier sera courte. Ceci dans la limite de l'échelle de temps de la RMN ($k_{ex} \leq \Delta\omega$, cf équation [2]) .

La dernière remarque importante concerne l'influence de la puissance de l'impulsion radiofréquence, en d'autres termes de la valeur du champ magnétique associé $B_1 = \omega_1/2\pi$ sur le rendement de saturation de l'aimantation des protons dans le réservoir B. La résolution des équations de Bloch [Woessner et al Magn Res Med 2005] permet de montrer que l'efficacité de présaturation est optimale lorsque :

$$\tau_B = 1/2\pi B_1 = 1/\omega_1 \quad [8]$$

Le temps de résidence des protons dans le réservoir B détermine ainsi les conditions de présaturation pour atteindre une réponse efficace (Figure 8).

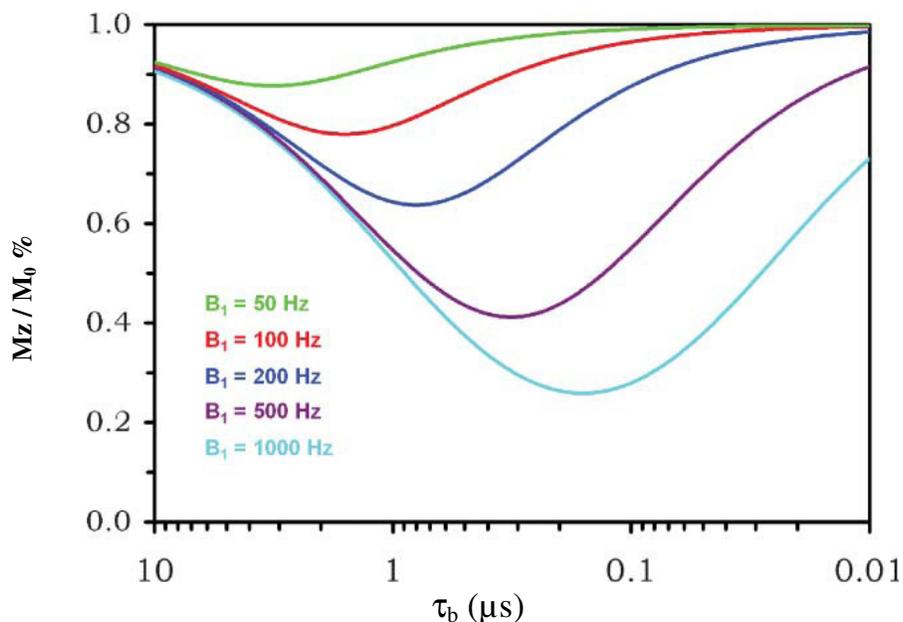


Figure 8 : Influence sur l'effet CEST de la durée de vie de l'état lié de protons échangeables à un agent CEST en fonction de la puissance de l'impulsion radiofréquence de présaturation [d'après Woods et al 2006].

En résumé : pour pouvoir effectuer une image par spectrométrie CEST, il est indispensable d'avoir un échange chimique possible entre les protons mobiles de l'eau libre des tissus et une substance capable de lier transitoirement ces protons, qu'elle soit endogène ou exogène et que le mécanisme de liaison soit direct (propriétés acido-basiques) ou relatif à une association avec des molécules d'eau. La différence de déplacement chimique entre les deux types de protons doit être la plus grande possible de façon à éviter de saturer partiellement le signal de l'eau libre des tissus pendant l'étape de présaturation de l'aimantation des protons liés. Le temps de résidence des protons liés à l'agent CEST doit être le plus court possible tout en respectant une vitesse d'échange suffisamment lente pour permettre le transfert de saturation de l'aimantation. Enfin, l'impulsion radiofréquence de présaturation doit être ajustée en fonction de la fréquence de résonance des protons liés à l'agent CEST et de la durée de vie de leur état lié.

III-3. Imagerie CEST

L'imagerie *in vivo* basée sur la technique de transfert d'aimantation ou « *magnetization transfer* » (MT) est utilisée depuis plusieurs années en exploitant les propriétés d'hydratation ou acido-basiques de macromolécules endogènes telles que les protéines qui sont capables de lier transitoirement les molécules d'eau des tissus sans être toutefois totalement solubles ou d'échanger certains de leurs atomes d'hydrogène chimiquement labiles [Wolff et al. 1989]. Ces entités induisent ainsi une modification de la fréquence de résonance des protons de l'eau piégée dans leur structure ce qui se traduit par l'existence d'un large signal en RMN du ^1H . . Lorsqu'une impulsion radiofréquence est appliquée aux protons concernés, le transfert de leur aimantation aux protons de l'eau libre voisine se produit selon deux mécanismes [Henkelmann et al. 2001] :

- par couplage dipolaire entre les protons d'hydratation dont les mouvements sont limités en raison de l'immobilisation transitoire de l'eau au sein du réseau de macromolécules (Effet MT global)
- par échange chimique entre les protons de l'eau et les protons labiles portés par les chaînes latérales macromoléculaires au niveau de groupes échangeurs de type -NH ou -OH. (Effet CEST endogène)

Il est difficile de distinguer ces deux mécanismes dans la pratique car ils ont lieu en même temps, et l'effet dû aux échanges des molécules d'eau par diffusion a tendance à masquer l'effet lié à l'échange chimique de protons. En effet, l'échange physique de molécules d'eau depuis la phase macromoléculaire semi-solide vers les tissus se traduit habituellement par l'apparition de signaux de RMN larges pouvant atteindre environ 100 kHz et conditionnés par l'énergie des interactions dipolaires, la susceptibilité magnétique, et l'anisotropie chimique des macromolécules, tandis que les effets de type CEST issus de l'échange de protons labiles conduisent habituellement à des signaux plus étroits en fréquences mais qui se situent dans la gamme de fréquences globale caractérisant l'échange physique d'eau [Zhou et al. 2006].

Pour réaliser une image résolutive des tissus, ce problème de recouvrement peut être en partie contourné en réalisant une acquisition après une impulsion de présaturation appliquée à des fréquences de déplacement chimique symétriques par rapport à la fréquence de résonance de l'eau libre prise comme origine [Hsieh et al. 1987 ; Guivel-Scharen et al. 1998]. On obtient ainsi deux images, la première étant produite

Après saturation sélective de l'aimantation des protons correspondant au déplacement chimique d'intérêt, tandis que la seconde image est recueillie après saturation au déplacement chimique symétrique.

La division pixel par pixel ou la soustraction des deux images conduit à une image CEST dont le contraste est optimisé. L'asymétrie de l'effet CEST est donc ainsi mise à contribution pour discriminer les effets globaux de l'eau des effets CEST des protons. La même procédure est appliquée lorsque l'on utilise un agent d'échange chimique autre que macromoléculaire endogène (ex : urée, [Given et al. 1998] ou exogène qui va lier préférentiellement les protons de l'eau des tissus. Pour illustrer le principe de la construction d'une image, prenons l'exemple d'une étude récente portant sur un agent de contraste CEST d'euporium : le complexe EuDOTA(gly)₄.

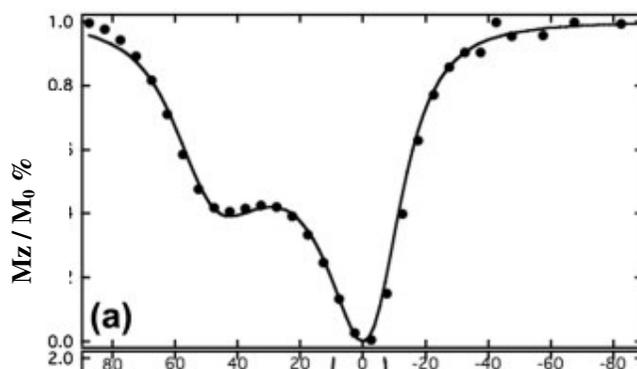


Figure 9 : Spectre CEST d'une solution de complexe EuDOTA(gly)₄ (10 mM) enregistré à 400 MHz (impulsion $B_1 = 46\mu\text{T}$) [Vinogradova et al. 2012].

Le spectre CEST montré Figure 9 permet de localiser la fréquence d'intérêt à 50 ppm. Les images reportées Figure 10 sont celles de tubes fantômes contenant 4% d'agar et 10 mM d'agent CEST EuDOTA(gly)₄ après application d'une impulsion radiofréquence de présaturation à 50 ppm (première image) puis à -50 ppm (seconde image). L'image CEST est obtenue par soustractions de deux premières.

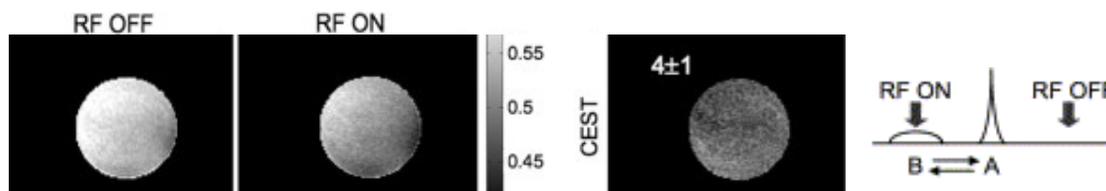


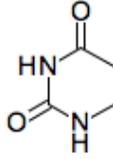
Figure 1016 : Images IRM CEST de fantômes contenant 4% d'agar et 10 mM d'agent CEST EuDOTA(gly)₄. La première image est recueillie du côté opposé symétriquement à la résonance de l'eau ($M_0 = -50\text{ppm}$, RF OFF), tandis que la seconde image est acquise après saturation sélective au déplacement chimique d'intérêt ($M_z = 50\text{ ppm}$ ou RF ON). La troisième image correspond à la soustraction des deux premières. Le schéma indique les fréquences des protons A de l'eau libre en échange chimique avec les protons B de l'eau liée à l'agent CEST. $B_1 = 14\mu\text{T}$, $B_0 = 360\text{MHz}$ [Vinogradova et al. 2012].

III-4. Les agents CEST diamagnétiques ou agents DiaCEST

Les premiers agents CEST étudiés sont des molécules diamagnétiques comportant des protons échangeables par l'intermédiaire de propriétés acido-basiques au sens de Brønsted donc sensibles au pH de l'environnement et/ou aux variations de température [Ward et al. 2000]. Ils regroupent soit de petites molécules organiques de synthèse, plus rarement des polymères, soit des composés d'origine biologique. La plupart des composés diamagnétiques présentent une fréquence de résonance de leur(s) proton(s) labile(s) ne différant pas plus de 5 ppm (soit 315 Hz à 1,5T) de la fréquence de l'eau libre du milieu environnant, limitant l'efficacité d'irradiation sélective des protons échangeables [Zhang et al. 2001]. De plus, l'utilisation *in vivo* de composés diamagnétiques peut être compromise par le manque de discrimination avec l'effet d'agents CEST endogènes dont le signal est souvent très large. Malgré ces inconvénients, l'innocuité des composés diamagnétiques reste intéressante et il est possible de les exploiter soit en tant que signal intrinsèque des tissus ou pour rendre compte de certains processus métaboliques ou facteurs environnementaux (pH, température) voire encore pour révéler la présence d'autres substances par activation de leur contraste après interaction spécifique.

Le tableau 1, extrait des travaux de Ward et ses collaborateurs [Ward et al. en 2000], donne un synoptique assez complet des caractéristiques CEST d'entités de faible masses moléculaires mais retrouvées pour certaines dans la structure de substances endogènes telles que certains sucres, acides et bases nucléotidiques. Ces résultats confirment le faible déplacement en fréquence des protons échangeables par rapport au signal de l'eau libre qui reste le plus souvent inférieur à 6 ppm. On peut noter également une grande variabilité de l'effet CEST selon la nature du composé et les concentrations relativement élevées nécessaires pour atteindre un effet maximum voisin de 60%.

Dans l'étude sur les agents CEST diamagnétiques réalisée par Ward et ses collaborateurs [Ward et al. 2000], l'expérience concernant la molécule de 5,6-dihydrouracile met en évidence la possibilité de produire un double contraste selon les conditions d'acquisition. Ce composé possède 2 protons échangeables dont les constantes d'échange dépendent du pH et la différence de déplacement chimique relatif aux 2 protons est suffisante pour permettre une saturation sélective. Ainsi, en mesurant indépendamment les deux effets CEST en fonction de l'acidité du milieu, il est possible de mesurer le pH de la solution (Figure 11).



structure chimique du 5,6-dihydrouracile

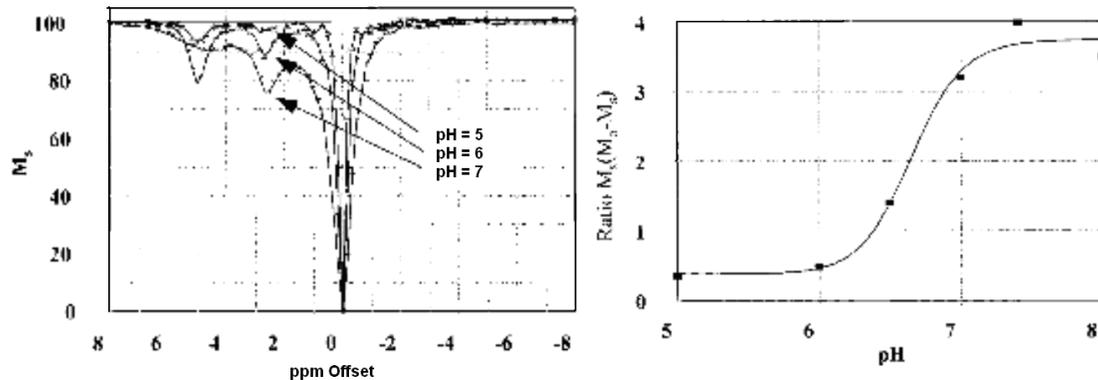


Figure 11: Spectres CEST d'une solution de 5,6-dihydrouracile (62.5mM) mesurés à différents pH (graphe de gauche). Les deux sites d'échange de protons induisent un signal à respectivement 5 ppm et 2,67 ppm du signal de l'eau libre. Rapport des effets CEST mesurés en fonction du pH (graphe de droite). D'après [Ward et Balaban, 2000].

L'utilisation de petites molécules endogènes pour réaliser des images IRM à visée diagnostique peut être illustrée par le cas du glutamate qui est le neurotransmetteur exciteur le plus important du système nerveux central. Son effet CEST dépend de sa fonction amine et de ses deux groupes carboxylate, toutes deux pH- et concentration-dépendantes. Le déplacement chimique des protons échangeables est d'environ 3 ppm par rapport à l'eau libre. La Figure 12 montre l'influence du pH sur l'effet CEST du glutamate et la Figure 13 une image CEST réalisée sur cerveau sain par la technique dite gluCEST qui permet de différencier la matière grise de la matière blanche [Cai et al. 2012]. Par ailleurs, certaines lésions dans le cerveau comme l'ischémie peuvent être détectées (Figure 14).

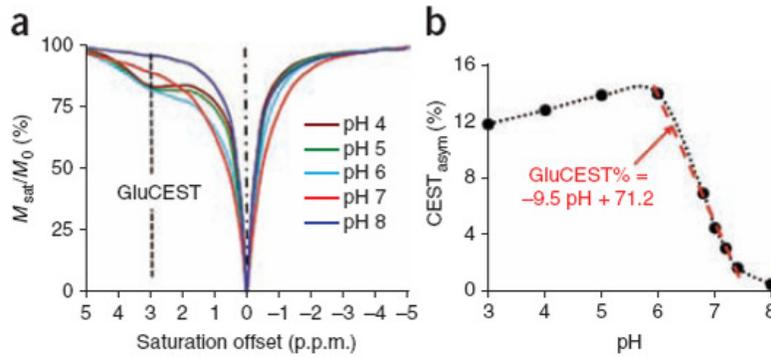


Figure 12: Sensibilité et influence du pH sur le spectre CEST du glutamate à une concentration de 10 mM: (a) spectres réalisés à 7T et 37 °C ; (b) valeur de l'effet CEST maximum en fonction du pH, la ligne rouge souligne la gamme physiologique (pH 6,0-7,4 ; $B_1 = 3,6\mu T$) [Cai et al. 2012].

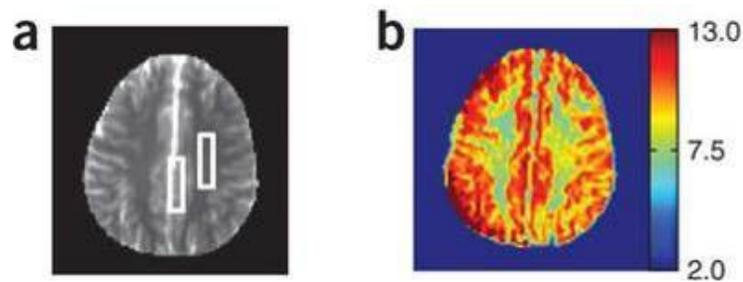


Figure 13: Image IRM de relaxivité classique (a) et de type gluCEST (b) d'un cerveau sain chez l'homme vu en coupe axiale (acquisitions effectuées à 7T). La barre colorée représente le pourcentage de contraste CEST lié aux protons échangeables du glutamate. D'après [Cai et al. 2012].

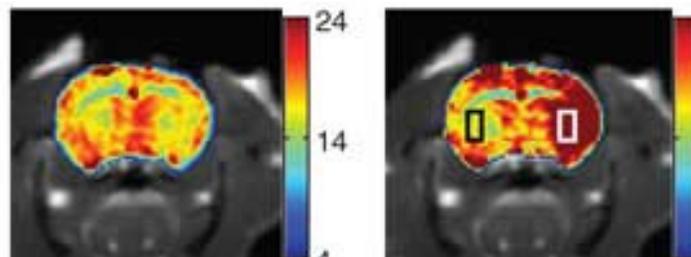
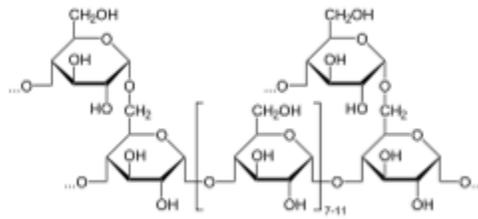


Figure 14: Image IRM de type gluCEST d'un cerveau de rat 1h (a) et 4,5h (b) après ischémie provoquée (acquisitions réalisées à 7T ; $B_1 = 3,6\mu T$). La barre colorée représente le pourcentage de contraste CEST. D'après [Cai et al. 2012].

Concernant les dérivés macromoléculaires endogènes, le glycogène (Figure 15), polymère formé d'unités glucose possède de nombreux groupes hydroxyle dont le proton est échangeable, ce qui lui confère de très bonnes propriétés de contraste CEST. La technique de RMN dite « glycoCEST » [Van Zijl et al. 2007] est notamment utilisée pour réaliser des images du foie, organe de stockage du glycogène mais également des muscles. Le suivi de sa concentration permet de déceler certaines pathologies causées par une anomalie de son métabolisme comme les diabètes.

Tableau 1 : Caractéristiques CEST de différentes molécules DiaCEST déterminées à 37°C et 7 T. D'après [Ward et al. 2000]

composé	concentration (mM)	Groupe fonctionnel	$\Delta\omega$ ppm	pH	Mz/Mo	(Mo-Mz)/Mo %
Mannitol	250 mM	-OH	1.000	7.0	0.89	9.0
Sorbitol	250 mM	-OH	1.000	7.0	0.88	7.3
Fructose	250 mM	-OH	1.333	7.0	0.88	9.3
Dextrose	250 mM	-OH	1.500	7.0	0.89	8.7
Galactose	250 mM	-OH	1.167	7.0	0.85	10.3
Sucrose	250 mM	-OH	1.333	7.0	0.86	10.2
Maltose	250 mM	-OH	1.500	7.0	0.79	14.8
Lactose	250 mM	-OH	1.333	7.0	0.68	20.9
Dextran						
1.75gm/100ml	0.25mM	-OH	1.167	7.0	0.91	8.1
3.50gm/100ml	0.5mM	-OH	1.333	7.0	0.88	10.2
7.00gm/100ml	1.0mM	-OH	1.333	7.0	0.81	13.6
14.0gm/100ml	2.0mM	-OH	1.500	7.0	0.76	18.9
L-Alanine	125mM	-NH ₂	3.000	4.0	0.36	67.4
L-Arginine	125mM	-NH ₂	3.000	4.0	0.36	65.8
L-Arginine	125mM	Guanidinium protons	2.000	5.0	0.33	57.7
L-Lysine	125mM	-NH ₂	3.000	4.0	0.34	66.2
L-Glutamine (25°C)	125mM	-NH ₂	2.000	5.2	0.70	27.6
L-Tryptophan (25°C)	35mM	-NH ₂	2.000	6.5	0.89	12.2
5-Hydroxytryptophan	62.5mM	-NH ₂	2.833	4.0	0.57	41.6
		Indole ring -NH	5.333	8.0	0.79	21.2
5,6-Dihydrouracil	62.5mM	3-NH	5.000	6.0	0.78	22.2
5,6-Dihydrouracil	62.5 mM	2-NH	2.667	7.0	0.77	22.2
Uridine	125 mM	3-NH	6.333	4.0	0.65	34.7
Thymidine	125 mM	3-NH	6.333	5.0	0.65	34.8
Barbituric acid	62.5mM	-NH	5.000	6.5	0.68	32.5
2-Thiobarbituric acid	62.5 mM	-NH	6.333	5.0	0.65	35.3
5-Isopropylbarbituric acid	62.5 mM	-NH	5.000	7.0	0.64	36.0
Barbital (5,5-diethyl-barbituric acid)	62.5 mM	-NH	5.000	4.0	0.82	14.2
Pipecolinic acid	62.5 mM	-NH	3.33	5.0	0.81	19.3
4-trans-Hydroxyproline	62.5 mM	-NH	4.50	4.0	0.77	18.6
		-NH	3.50	4.0	0.80	20.0
Azetidine-2-carboxylic acid	62.5 mM	-NH	3.50	5.0	0.74	25.5
Miscellaneous						
Guanidine HCl	125 mM	Guanidinium protons	2.000	7.0	0.38	60.0
Hydantoin	62.5mM	-NH	5.667	4.0	0.81	18.7
		-NH	2.833	6.0	0.78	21.3
Parabanic acid	62.5 mM	-NH	5.167	7.0	0.79	20.5
		-NH	3.333	8.0	0.74	25.4
		-NH	2.333	8.0	0.77	22.5
2-Imidazolidone	62.5mM	Ring proton -NH	1.167	5.0	0.68	30.4
		Ring proton -NH	1.167	8.0	0.68	29.8
2-Imidazolidinethione	62.5mM	Ring proton -NH	2.833	3.0	0.64	36.7
		Ring proton -NH	2.833	7.0	0.65	34.5



Structure du glycogène

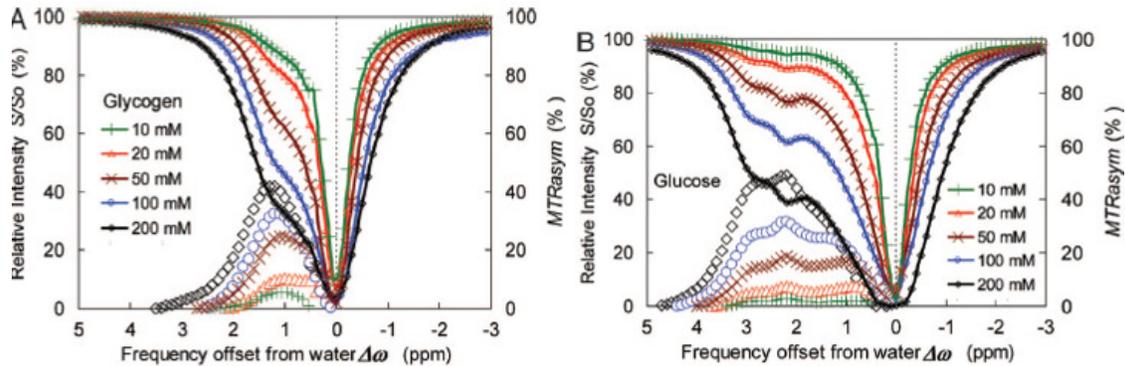
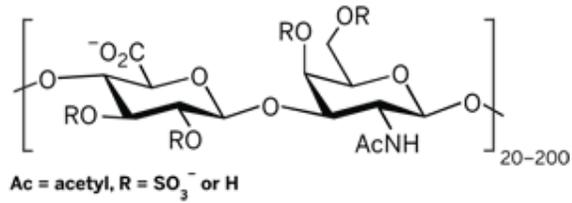


Figure 15: Spectres CEST du glycogène (A) réalisés à ?? T, 37°C et pH 7,4 de solutions aqueuses de glycogène (A) ou de glucose (B) [Van Zijl et al. 2007].

Les glycoaminoglycanes ou glycosaminoglycanes (GAGs) sont des glucides de masse moléculaire élevée qui entrent dans la composition des [matrices extracellulaires](#) des [tissus conjonctifs](#) et représentent environ 30% de la matière organique de l'organisme. Citons parmi ces glucides particuliers, l'héparine retrouvées dans le foie les poumons et l'aorte ou la chondroïtine et la kératine sulfate présentes notamment dans les cartilages et la cornée. Chaque monomère (Figure 16) contient une fonction -NH et trois fonctions -OH dont les protons présentent un déplacement chimique respectif de 3,2 ppm et 0,9-1,9 ppm, potentiellement exploitable en RMN CEST. L'effet CEST lié aux GAGs endogènes est beaucoup utilisé pour visualiser le cartilage [Saar et al. 2012 ; Schmitt et al 2001]. Cette procédure référencée « gagCEST » est illustrée par la Figure 16 qui montre une image du genou dont le cartilage apparaît parfaitement contrasté.



Structure d'un monomère de glycosaminoglycane (GAG)

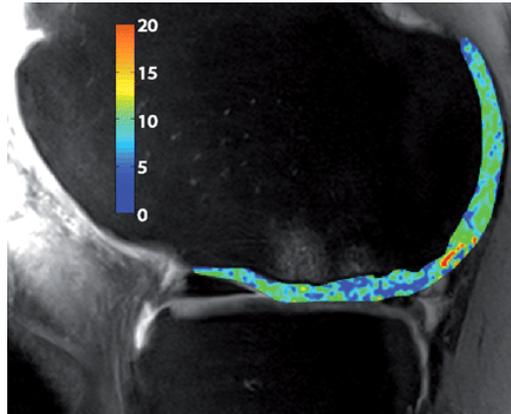


Figure 16: Image IRM de type « gagCEST » du cartilage du genou chez l'homme, réalisée à 7T [Schmitt et al. 2001].

Les protéines, polypeptides naturels, présentent dans leur structure un grand nombre d'acides aminés qui possèdent des groupes amide, amine ou hydroxyle dont les protons sont échangeables avec l'eau du milieu environnant. La Figure 17 montre les séquences d'acides aminés particulièrement riches en protons labiles et donc bons candidats pour un contraste CEST.

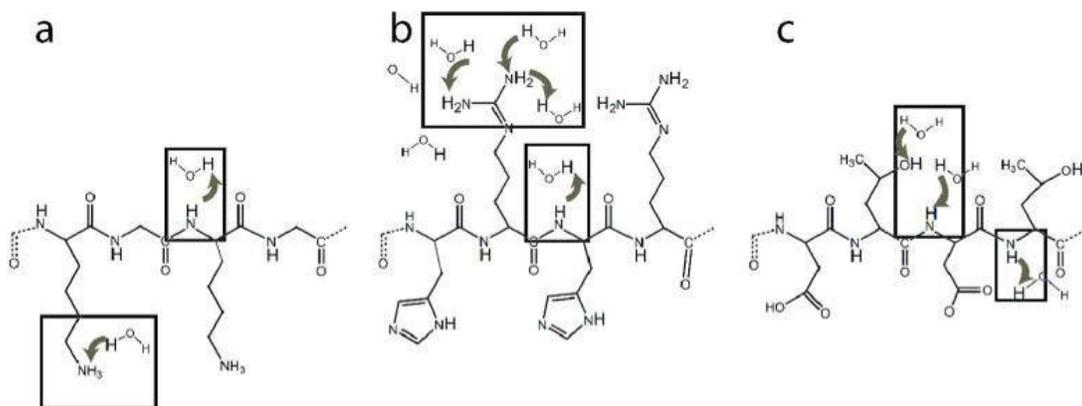


Figure 17: Structure chimique de trois peptides DiaCEST dont les sites d'échange chimique sont identifiés par les encadrés. (a) séquence Gly-Lys-Gly-Lys, (b) séquence His-Arg-His-Arg, (c) séquence Asp-Thr-Asp-Thr. D'après [Mc Mahon et al. 2008].

Les protéines apportent un signal CEST systématique dans une gamme de fréquences correspondant à un déplacement centré sur environ 3 ppm par rapport aux protons de l'eau libre des tissus. L'effet CEST est cependant plus ou moins important selon le pH local. Cette caractéristique a été exploitée pour distinguer le tissu tumoral du tissu sain. En effet, le pH d'une tumeur est plus élevé que celui d'un tissu sain et la vitesse d'échange chimique des protons de groupes amide protéiques augmente avec le pH. Ainsi, la technique de transfert d'aimantation de protons des groupe amide aux protons de l'eau libre des tissus ou « *amide proton transfer* » (APT) permet de détecter la présence de glioblastome dans le cerveau chez l'homme (Figure 18) sans injection d'agent de contraste [Jones et al. 2006].

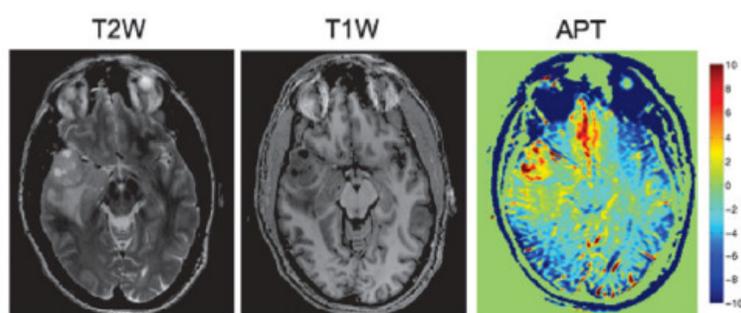


Figure 18: Images IRM d'un cerveau de patient présentant un glioblastome. Les deux premières images correspondent à des séquences enregistrées après injection d'un agent de contraste paramagnétique (complexe de Gd(III)) et la troisième image a été obtenue en contraste CEST APT sans agent de contraste (3T, $B_1=3\mu T$). Après injection l'image IRM pondérée T1 (T1W) démontre une masse hétérogène dans le lobe temporal antérieur droit. De même pour l'image pondérée T2 (T2W). L'échange de protons stimulé par un pH plus élevé dans la tumeur conduit à une visualisation par effet CEST du glioblastome [Jones et al. 2006].

De façon à gagner en contraste local, il a été proposé d'utiliser des cellules génétiquement modifiées pour leur permettre de sur-exprimer des agents CEST protéiques [Mc Mahon et al. 2008]. Ainsi, la protéine rapporteur LRP (lysine rich protein) a été envisagée comme agent de contraste pour l'imagerie CEST APT [Gilad et al. 2007]. Les cellules exprimant la LRP injectées dans le cerveau de souris ont été clairement mises en évidence contrairement à des cellules témoins (Figure 19). L'avantage d'utiliser des cellules génétiquement modifiées est la conservation de la concentration en protéines agents CEST au fur et à mesure de la division cellulaire alors que pour des agents de contraste classiques, leur concentration intracellulaire diminue lors de la multiplication.

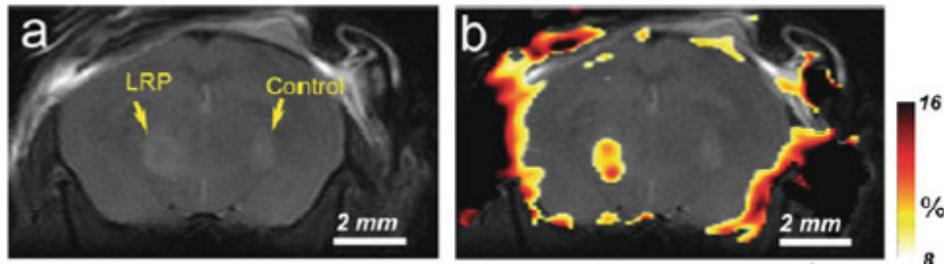


Figure 19: Images IRM d'un cerveau de rat après implantation de cellules de gliome sur-exprimant la LRP et réalisées en séquence classique (a) et en CEST APT (b : superposition des deux images) à 4,7T ($B_1 = 3,6\mu\text{T}$). D'après [Gilad et al. 2007].

L'utilisation de cellules génétiquement modifiées pour l'expression de protéines diaCEST permet également d'évaluer la viabilité cellulaire *in vivo in situ*. En effet, la prolifération de cellules vivantes s'accompagne d'une expression importante de la protéine et conduit donc à un signal CEST intense. Par contre, la mort cellulaire inhibe la production de protéine et l'effet CEST diminue. Un autre avantage de la méthode est la sensibilité du contraste au pH. A nouveau, dans le cas de la LRP dont les protons labiles des unités lysine de la LRP sont échangeables en milieu basique il est possible de matérialiser une lésion ischémique qui entraîne une acidification locale. Le signal CEST est en effet divisé par dix pour chaque réduction de 1 unité pH par rapport au pH physiologique.

Sur la base des substances biologiques diaCEST, de nouveaux agents de contraste ont été synthétisés dans le but d'avoir des entités plus stables, plus efficaces et plus spécifiques soit d'une cible définie, soit d'un facteur précis (température, pH). L'idée est également de mieux contrôler le processus d'échange des protons pour augmenter l'efficacité CEST ou encore d'ajouter une fonctionnalité supplémentaire par exemple la possibilité de coupler imagerie et transport de molécules d'intérêt [Mc Mahon et al. 2008]. Ainsi certains polymères cationiques (Figure 20) utilisés dans la compaction de l'ADN et la transfection de gènes peuvent être exploités pour l'imagerie CEST [Goffeney et al. 2001]. La grande quantité de protons échangeables a permis d'atteindre un effet CEST de 50% à une concentration très faible pour un agent DiaCEST, de l'ordre du micromolaire.

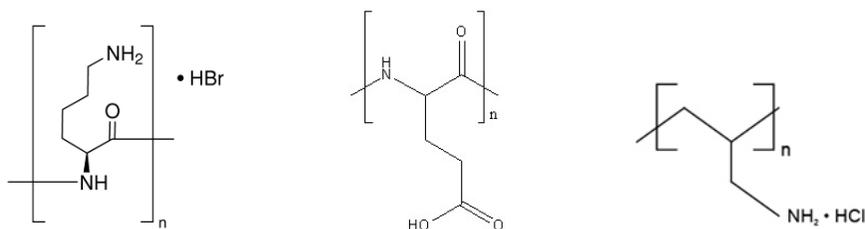


Figure 20: Structures chimiques de macromolécules DiaCEST utilisés comme transporteur de gènes: poly-L-lysine, poly-L-glutamate, poly(allyl amine).

Néanmoins, les composés diamagnétiques, synthétiques ou naturels, restent limités par la plage de fréquences accessibles inférieure à 5-6 ppm par rapport à l'eau libre des tissus qui par ailleurs présente un signal propre lui-même assez large rendant difficile une présaturation sélective *in vivo*. Pour éviter ce problème, il faut avoir recours aux agents paramagnétiques.

III-5. Les agents CEST paramagnétiques ou agents ParaCEST

Les agents de contraste ParaCEST allient propriétés paramagnétiques, liées à la présence dans leur structure chimique d'un certain nombre d'électrons non appariés possédant un moment magnétique de spin électronique important, et capacité d'échanger une ou plusieurs molécules d'eau d'hydratation avec le milieu aqueux environnant. L'avantage particulier est le déplacement chimique important des protons de l'eau induit par l'agent de contraste qui permet un effet CEST beaucoup plus sélectif que celui obtenu avec des agents DiaCEST.

Certaines entités comportant un ou plusieurs atomes de lanthanide ont été révélées comme des agents ParaCEST particulièrement intéressants. En effet, en dehors des ions lanthane (II) et lutétium (III), tous les ions lanthanides Ln(III) sont paramagnétiques puisqu'ils possèdent des électrons non appariés. Chacun d'entre eux présente une susceptibilité magnétique différente qui dépend de sa configuration électronique et qui va influencer d'une part son action d'accélération de la vitesse de relaxation longitudinale de l'aimantation des protons de son environnement direct (par exemple appartenant à des molécules d'eau capables de s'échanger) et d'autre part la fréquence de résonance de ces protons par interactions dipolaires [Viswanathan et al. 2010 ; E. Schouman-Claeys 2011]. L'effet de contraste paramagnétique de relaxation a été décrit dans le chapitre II. Ici nous nous attachons aux propriétés d'agent de déplacement chimique (ou shift agent) et au transfert d'aimantation par échange chimique.

La découverte des agents de déplacement chimique à base de lanthanides remonte à environ une quarantaine d'années [Hinckley 1969] et ont été utilisés pour mieux résoudre l'attribution

des signaux en RMN du ^1H de molécules de structures compliquées, notamment d'origine biologique (acides nucléiques, peptides, protéines). Les premiers composés étaient des complexes de Ln(III) ayant un comportement de type acide de Lewis [Hinckley et al. 1973 A et B] comme le complexe $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ (tris(2,2,6,6-tetramethylhepta-3,5-dionato)europium(III)) [Hinckley, 1969] et son analogue fluoré $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (tris(7,7-dimethyl-1,1,2,2,2,3,3-heptafluoroocta-7,7-dimethyl-4,6-dionato)europium(III)) [Rondeau, Sievers, 1971], plus soluble (Figure 21).

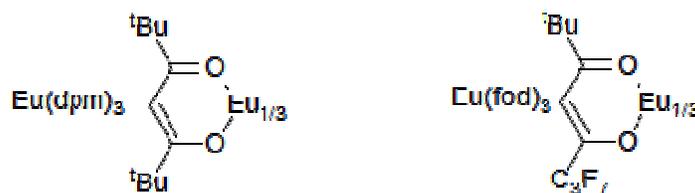


Figure 21 : structure chimique de complexes $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ (tris(2,2,6,6-tetramethylhepta-3,5-dionato)europium(III)) et $\text{Eu}(\text{fod})_3$ (tris(7,7-dimethyl-1,1,2,2,2,3,3-heptafluoroocta-7,7-dimethyl-4,6-dionato)europium(III)), premiers agents de déplacement chimique pour la RMN du ^1H .

L'utilisation de complexes de gadolinium Gd(III) est apparue ensuite avec l'intérêt de ces agents de déplacement chimique de modifier sensiblement les temps de relaxation des protons et de pouvoir conduire à un contraste de type T_1 en IRM [Caravan et al. 1999].

Concernant l'Imagerie par résonance magnétique, si pour un agent paramagnétique de relaxivité, l'efficacité est d'autant plus importante que la vitesse d'échange avec les molécules d'eau du milieu environnant est grande (effet de contraste sur une plus grande quantité de molécules d'eau du tissu imagé, cf chapitre II sur le contraste de relaxivité), dans le contexte CEST, l'échange des molécules d'eau doit être suffisamment lent pour permettre le transfert d'aimantation de sorte que la constante d'échange k_{ex} soit inférieure à la différence de déplacement chimique entre l'eau liée et l'eau libre $\Delta\omega$ (cf chapitre III sur le principe de l'imagerie IRM-CEST). Ainsi, la recherche de chélates de Ln(III) permettant de réguler les constantes cinétiques d'hydratation de l'ion paramagnétique a été entreprise pour développer des agents ParaCEST efficaces. La géométrie de la cage et ses liaisons engagées avec l'ion détermine le site de coordination de ce dernier à l'eau et par conséquent sa vitesse de déshydratation-réhydratation (Figure 22, [Hermann et al. 2008]).

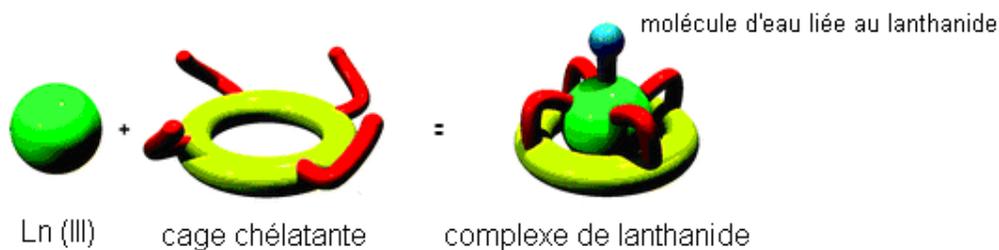


Figure 22 : modélisation d'un complexe de lanthanide [d'après Hermann et al. 2008]

Comme déjà évoqué dans le chapitre II, les interactions entre les molécules d'eau et l'agent paramagnétique proviennent de trois contributions (Figure 23). La contribution de sphère interne (ou sphère de coordination), de seconde sphère (ou sphère de solvatation) et de sphère externe (ou couche de diffusion). Au-delà de ces trois sphères se trouve l'eau libre du milieu (ou eau « bulk »).

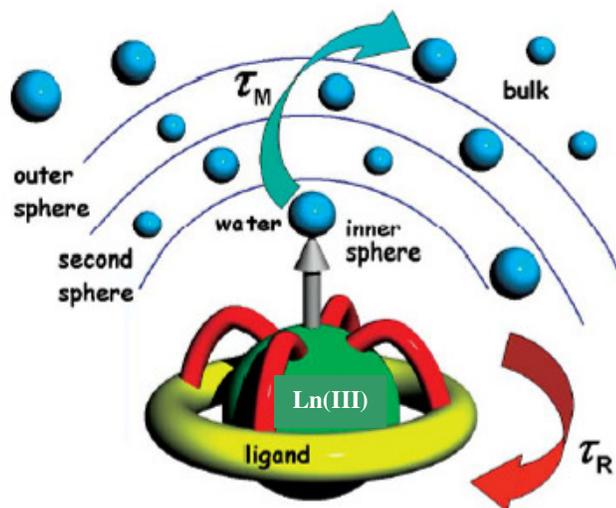


Figure 23 : Hydratation d'un agent de contraste de lanthanide liant une molécule d'eau [d'après Hermann et al. 2008]

La contribution de sphère interne concerne les protons de la ou des molécule(s) d'eau directement liée(s) à l'ion Ln(III) [Toth et al, 1998] et se caractérise par:

- q : le nombre de molécules d'eau de coordination (le plus souvent $q = 1$)
- τ_m : le temps de séjour de la (ou des) molécule(s) d'eau de coordination

- τ_R : le temps de corrélation de rotation représentant le temps de basculement moléculaire d'un complexe
- q_{ss} : nombre d'hydratation et $\tau_{m\ ss}$: temps de séjour moyen des molécules d'eau en interaction avec le complexe dans les domaines de seconde sphère et de sphère externe
- les paramètres électroniques

La conception d'un ligand efficace se base sur l'affinement de ces différents paramètres qui sont accessibles par RMN d'après la théorie Salomon Bloembergen-Morgan (SBM) [Hermann et al. 2008]. La vitesse de relaxation longitudinale $1/T_{1m}$ par effet paramagnétique et interaction dipôle-dipôle est donnée par l'équation 1 :

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{(r_{GdH})^6} \left[\frac{3 \tau_{c1}}{(1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2)} + \frac{7 \tau_{c2}}{(1 + \omega_s^2 \tau_{c2}^2)} \right] \quad [1]$$

Avec :

- γ_I le rapport gyromagnétique nucléaire du proton
- g le facteur de Landé pour l'électron libre
- μ_B le magnéton de Bohr
- S le nombre quantique de spin électronique
- r_{GdH} la distance entre le spin électronique S et le spin nucléaire I (du proton)
- ω_I et ω_s les fréquences de Larmor du proton et de l'électron
- τ_{ci} ($i = 1,2$) le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage S-I.

Ce dernier paramètre τ_{ci} est relié au temps de résidence des molécules d'eau de coordination τ_m par [Li et al. 2002]:

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} \quad [2]$$

Où T_{ie} est le temps de relaxation électronique

La caractérisation des agents paramagnétiques requiert la détermination du profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) [Nonat, 2007] qui correspond à la mesure des temps de relaxation des protons en fonction du champ magnétique et de la concentration en agent de contraste, méthode appelée, comme nous l'avons déjà vu, relaxométrie. L'analyse des profils NMRD nécessite souvent la caractérisation indépendante du temps de relaxation

électronique par spectrométrie de résonance paramagnétique électronique (RPE) et de la vitesse d'échange de l'eau par RMN de l'oxygène 17 (RMN ^{17}O) [Toth et al, 1998].

Le nombre de molécules d'eau de coordination peut être un critère de classification des agents ParaCEST. Il peut être déterminé à partir de la résolution de la structure du complexe de Ln(III) hydraté et cristallin par diffraction des rayons X. Cependant, il est préférable de déterminer ce paramètre par des techniques d'étude en solution (comme la méthode de RMN ^{17}O) car la corrélation n'est pas toujours juste avec les données obtenues pour l'état solide. Tous les agents de contraste paramagnétiques ayant mené à une application en particulier clinique présentent à ce jour une seule molécule d'eau de coordination ($q = 1$) [Hancu et al. 2010], comme les complexes à base de dérivés du DTPA ou du DOTA (chapitre II). Ci-dessous, nous présentons quelques exemples rencontrés dans la littérature et discutés selon l'ajustement des paramètres pertinents pour l'optimisation d'un agent ParaCEST.

Nombre de molécules d'eau de coordination q

➤ $q = 0$: agents *ParaCEST* sans site d'échange avec l'eau

Dans ce cas précis, étant donné que le cation Ln(III) ne lie directement aucune molécule d'eau, les propriétés d'échange chimique de protons peuvent provenir soit de l'eau d'hydratation de seconde sphère, soit de protons labiles portés par le chélate comme dans la situation des agents DiaCEST mais avec toutefois un bénéfice au niveau de la séparation entre fréquence de résonance des protons labiles et des protons de l'eau libre grâce à l'effet paramagnétique du ParaCEST. On peut citer les complexes de ligand DOTA dont les groupes carboxylate sont substitués par quatre groupes phosphate (DOTP ou DOTP_R) [Vojtisek et al. 2005]. L'encombrement stérique de ces groupes expulse la molécule d'eau de la première sphère de coordination. C'est également le cas pour les complexes de DOTA tétra-amide (DOTAM) qui possèdent une chaîne alkyle placée juste au-dessus du site de liaison à l'eau [Hermann et al, 2008]. La Figure 24 montre l'efficacité d'agent de déplacement chimique de protons labiles de fonctions amide de DOTA en fonction du cation Ln(III) complexé. Ceci met en évidence l'effet paramagnétique (en effet pour un agent DiaCEST, la valeur de $\Delta\omega$ n'excède pas 5 ppm) et l'influence de la nature de la terre rare.

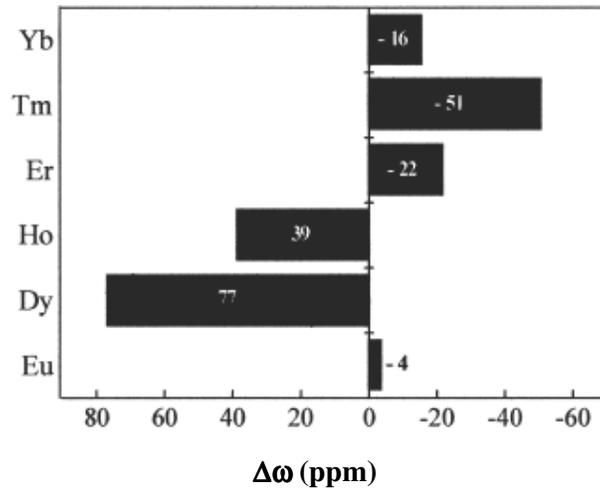


Figure 24: différence de déplacement chimique ($\Delta\omega$ en ppm) entre les protons N-H des groupes amide et l'eau libre pour des complexes de DOTAM-Gly à 7 T et 312 K [Aime et al. 2002].

➤ **q = 1** : agents *ParaCEST* à une molécule d'eau de coordination

La très grande majorité des complexes de lanthanide possède un site de coordination avec une molécule d'eau (dérivés DOTA et dérivés DTPA, cf chapitre II). Le temps de résidence de la molécule d'eau liée dépend de la flexibilité de la molécule de ligand et de la taille de l'ion Ln(III), sa translation au sein de la cage, plus ou moins facile, impactant directement sur la stabilité de sa liaison à l'eau. Ainsi, pour ralentir l'échange d'eau (ce qui est recherché pour l'effet CEST), on cherchera à apporter des contraintes stériques proches du site de coordination de l'eau sans toutefois empêcher la liaison. C'est le cas par exemple de certains ligands macrocycliques à six chaînons (figure 2) [Polasek et al. 2004].

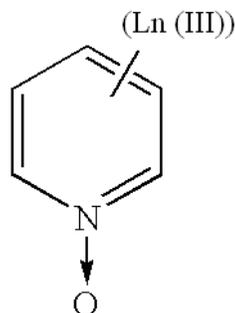


Figure 25 : complexes Lanthanide(III) de pyridine N-oxide analogue du DOTA D'après [Polasek et al. 2004].

➤ **q = 2 : agents ParaCEST à deux molécules d'eau de coordination**

Il est également possible de synthétiser des chélates qui lient simultanément deux molécules d'eau. Le premier complexe étudié dans cette catégorie est le complexe [Gd (DO3A) (H₂O)₂] (Figure 25) [Toth et al. 1999]. Toutefois, la structure de ce dernier est relativement instable dans des conditions *in vivo* en raison de la substitution des molécules d'eau liées par des substances comportant des groupes carbonate, par des acides aminés ou hydroxycarboxyliques ou par certains atomes donneurs présentés en surface de protéines comme la sérum albumine. Son dérivé méthylé (DO3MA, Figure 26) stabilise la liaison des molécules d'eau mais forme des dimères en solution induisant un changement conformationnel de la cage et la perte d'accessibilité aux sites de coordination. Ceci explique le peu d'études concernant les dérivés de DO3A pour l'imagerie CEST [Hermann et al. 2008].

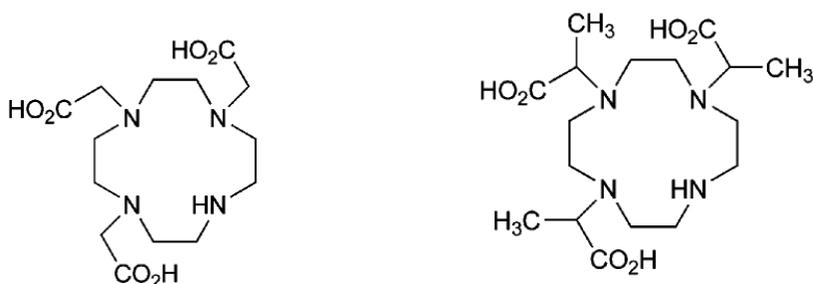


Figure 26 : structures chimiques des ligands macrocycliques DO3A et DO3MA

Les analogues des ligands DTTA [Costa et al. 2005], AAZTA [Aime et al. 2004] ou HOPO [Raymond et al. 2005] (Figure 27) ont une meilleure stabilité thermodynamique et pourraient être des candidats potentiellement intéressants mais peu de données existent quant à leur comportement cinétique [Hermann et al, 2008].

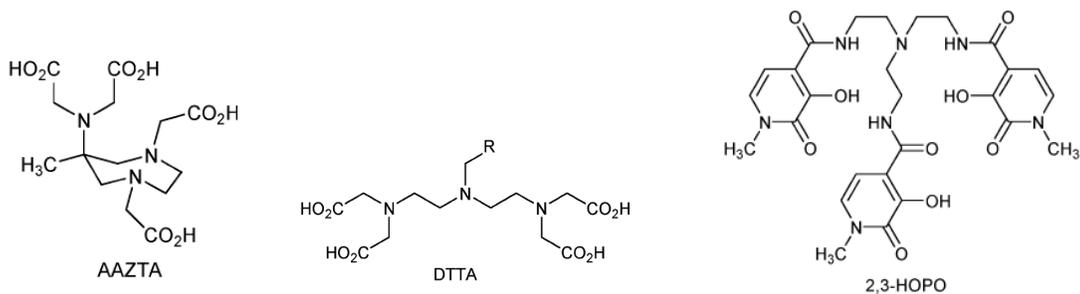


Figure 27: structures chimiques des chélates AAZTA, DTTA et HOPO

Temps de résidence des molécules d'eau de coordination τ_m

La valeur de τ_m ou de la constante d'échange de l'eau entre le complexe et le milieu solvant (k_{ex}) dépend principalement de la charge nette du complexe, de l'accessibilité du solvant et des contraintes stériques au voisinage du site de liaison de l'eau, des mécanismes d'échange de l'eau, facteurs étroitement dépendants de la conformation du ligand et de l'orientation correspondante d'éventuels substituants comme dans le cas des complexes de DOTA. Ainsi il a été montré que le complexe $[Gd(DOTA)(H_2O)]$ pouvait exister sous la forme de quatre stéréoisomères [Bottrill et al. 2006] de structure anti-prisme carré et différant par l'angle de rotation entre les plans formés par les atomes d'oxygène O_4 et les atomes d'azote N_4 de la cage. Les deux diastéroisomères majoritaires (distincts par l'orientation du bras acetate) correspondent à un angle de tilt voisin de 40° (isomère SA pour « square-antiprism ») et les diastéroisomères minoritaires à un angle plus faible proche de 24° (isomère TSA pour « twisted square antiprism ») (Figure 28). Selon le lanthanide et la structure/nature du groupe fixé sur la fonction carboxylique, l'échange d'une molécule d'eau entre le site de coordination et la sphère d'hydratation peut être plus ou moins ralenti, l'isomère TSA conduisant à des temps de résidence beaucoup plus longs.

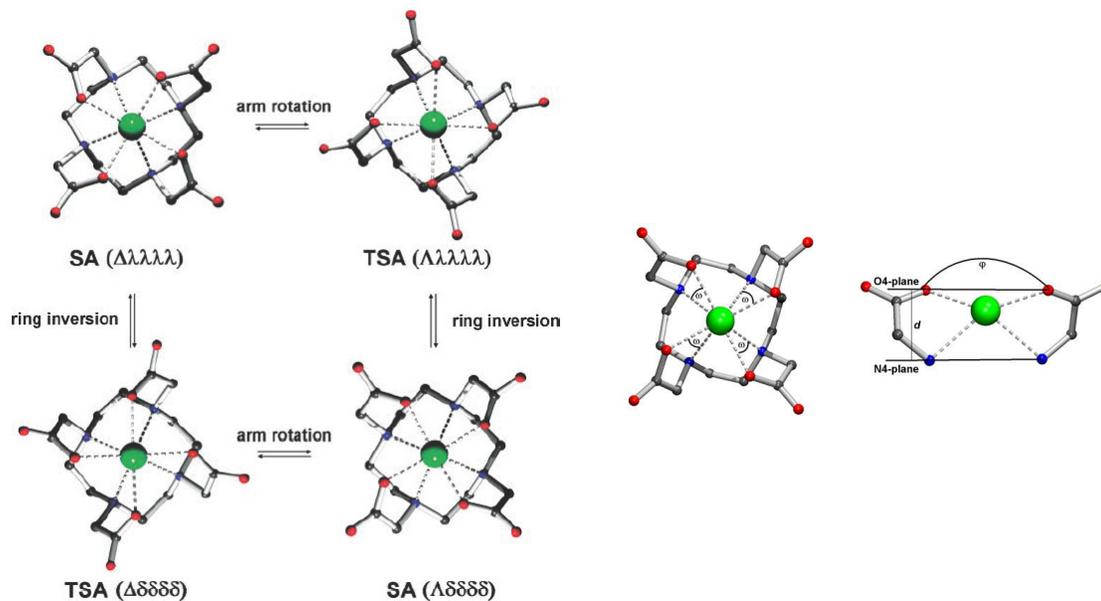


Figure 28: Stéréoisomères possibles pour des complexes formés à partir du ligand DOTA. SA : square-antiprismatic isomer ; TSA : twisted square-antiprismatic isomer. La transition $\Delta \leftrightarrow \Lambda$ correspond à la rotation du bras acetate et la transition $\delta \leftrightarrow \lambda$ à la rotation des plans des atomes O_4 et N_4 d'un angle ω [Hermann et al. 2008 ; Vojtíšek 2005].

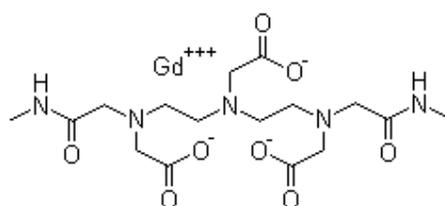
Le Tableau 2 reporte quelques valeurs de τ_m pour des complexes de Gd(III). Les dérivés mono- ou tétra-amides du DOTA (Figure 28) présentent des τ_m souvent supérieurs à la

milliseconde [Caravan et al. 1999 ; Zhang et al. 2005A]. Lorsque l'on remplace le Gd(III) par l'ion Eu(III), on conserve le même effet avec par exemple un τ_m de près de 300 μ s pour le complexe DOTA-tétra-amide [Mani et al. 2009]. Les complexes de DTPA et de ses dérivés montrent un comportement similaire. On peut noter le ligand bis-amide DTPA-BMA (Figure 29) dont le complexe avec le Gd(III) conduit à un τ_m de l'ordre de quelques microsecondes [Powell et al. 1996].

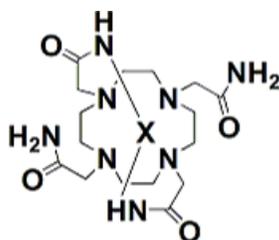
Tableau 2 : temps de résidence τ_m des molécules d'eau de coordination et leur constante d'échange k_{ex} à 25°C pour différents complexes de Gd (III) d'après [Hermann et al, 2008].

Complexe	Nom usuel	τ_m (ns)	k_{ex} (10^6 s ⁻¹)	q
[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	Gd-DOTA	217-244	4,2-4,6	1
[Gd(DOTAM)(H ₂ O)] ³⁺ (isomère SA)	Gd-DOTAM (isomère SA)	1,33 10 ⁶	0,0083	1
[Gd(DOTAM)(H ₂ O)] ³⁺ (isomère TSA)	Gd-DOTAM (isomère TSA)	3,06 10 ³	0,33	1
[Gd(DO3A)(H ₂ O) ₂]	Gd-DO3A	91-160	6,2-11	2
[Gd(PyDO3A)(H ₂ O) ₂]	Gd-PyDO3A	70	14	2
[Gd(PyDO3P)(H ₂ O)] ³⁻	Gd-PyDO3P	6-8	170	1

En règle générale, un candidat ParaCEST commence à être utilisable lorsque le temps d'échange avec l'eau est supérieur à la microseconde, l'idéal étant la milliseconde, et par conséquent aura une mauvaise efficacité en tant qu'agent de relaxivité T₁ (pour lequel le temps d'échange doit être le plus court possible, de l'ordre de la centaine de nanosecondes).



Diéthylène triamine pentaacétate bis(méthyl-amide) [Gd-(DTPA-BMA)]



[X-(DOTA-tétra-amide)]

Figure 29: Exemples de ligands permettant de ralentir les échanges de l'eau sur le lanthanide [Hancu et al. 2010]

Paramètres: τ_R , q_{SS} et τ_{mS}

Le temps de corrélation rotationnel τ_R des complexes correspond à leur mouvement de réorientation moléculaire global. En théorie, plus on accélère ce mouvement (plus τ_R est court), plus il est possible de ralentir l'échange des molécules d'eau [Toth et al, 1998]. Dans l'absolu, cet aspect limite la dimension des ligands car en effet une masse moléculaire élevée ralentit le mouvement du complexe en solution comme en témoigne le grand nombre d'études menées pour améliorer les performances des agents paramagnétiques de relaxivité [Hermann et al. 2008].

Les paramètres de seconde sphère d'hydratation ont été plutôt considérés pour améliorer la relaxivité des complexes. Il ressort des différentes approches publiées que si intrinsèquement la présence de molécules d'eau d'hydratation favorise l'efficacité de l'effet CEST et ce d'autant mieux que q_{SS} est grand, leur cinétique d'échange reste plus rapide que celle de l'eau de coordination et peut théoriquement atteindre la picoseconde [Fulton et al. 2006 ; Hermann et al, 2008]. Cependant, dans le cas de complexes n'ayant aucune molécule d'eau de coordination et à condition de stabiliser l'eau de solvatation à l'aide de certains groupements comme le DOTA-tétra-amide portant des unités pyridine (PyDOTAM) [Hermann et al. 2008].

Paramètres électroniques

La présence de groupements électro-donneurs sur le complexe est responsable de l'échange rapide de l'eau sur le lanthanide en raison de la délocalisation électronique en faveur du cation qui produit une interaction eau-lanthanide plus faible. Ainsi un échange lent sera privilégié par des groupements faiblement donneurs, dans l'ordre: cétones < amides < carboxylates [Powell et al. 1996 ; Aime et al. 1999]. Etrangement, alors que les cétones fournissent l'échange le plus lent, aucun complexe ParaCEST ne semble avoir été étudié à ce jour. Par contre il a été envisagé de fixer des groupements électro-attracteurs. A titre d'exemple, le complexe de l'ion Eu(III) avec le ligand DOTA-tétra-amide substitué par des groupes soit amine électro-donneurs (p-NH₂-phényle) soit nitro électro-attracteurs (p-NO₂-phényle). [Ratnakar et al. 2008]. La Figure 30 montre la différence d'efficacité des complexes selon leurs propriétés oxydant-réducteur en tant qu'agent ParaCEST IRM.

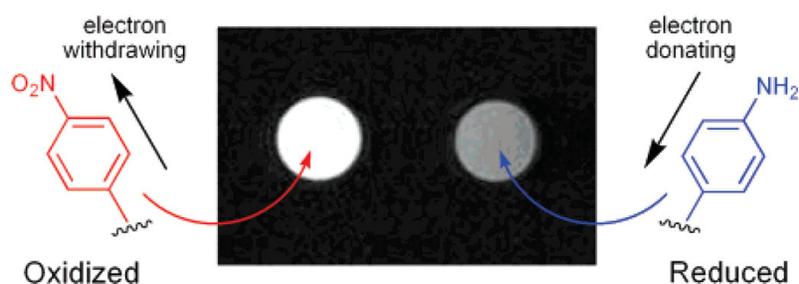


Figure 30 : Images en IRM CEST (9,4 T, après soustraction des signaux avec présaturation à 47,5 ppm et -47,5 ppm) de ParaCEST de [Eu (DOTA-tétra-amide)] substitués par un groupe soit électro-donneur (NH₂) ou électro-attracteur (NO₂) [Ratnakar et al. 2008].

Le concept de rendre spécifique l'agent de contraste d'un facteur extrinsèque caractéristique du tissu ciblé a été également appliqué aux agents ParaCEST. L'idée directrice vient du fait que la constante d'échange de l'eau de coordination k_{ex} et/ou la différence de déplacement chimique $\Delta\omega$ induite par l'agent peuvent varier selon l'environnement biologique. Dans la suite de ce chapitre nous citerons quelques exemples illustratifs.

Conception et développement de sondes ParaCEST sensibles au milieu

➤ Sonde ParaCEST de température

Suite à la constatation que la température est plus élevée dans les cellules cancéreuses [Gillies et al. 2004], des techniques non invasives d'IRM ont été proposées pour imaginer les différences de température. La méthode la plus largement utilisée appelée « *proton resonance frequency* » (PRF) repose sur l'observation de Hindman selon laquelle il existe une relation linéaire entre

la fréquence de résonance des protons de l'eau et la température sur une gamme de 37-43 °C [Hindman 1966]. Dans le cas de complexes ParaCEST, leur structure présente deux facteurs répondant aux changements de température: la vitesse d'échange des protons de l'eau liée et l'ampleur du déplacement chimique induit par le complexe de lanthanide. Aussi, le déplacement chimique et la forme des spectres CEST sont extrêmement sensibles aux variations de température de sorte que tous les agents ParaCEST répondent plus ou moins aux changements de température. Par exemple, Zhang et al. [Zhang et al. 2005B] ont mis au point un complexe d'Eu(III) [Eu(DOTAM-Gly)]⁻ comportant quatre protons amine modulant la variation de déplacement chimique des protons échangeables $\Delta\omega$ en fonction de la température (Figure 31).

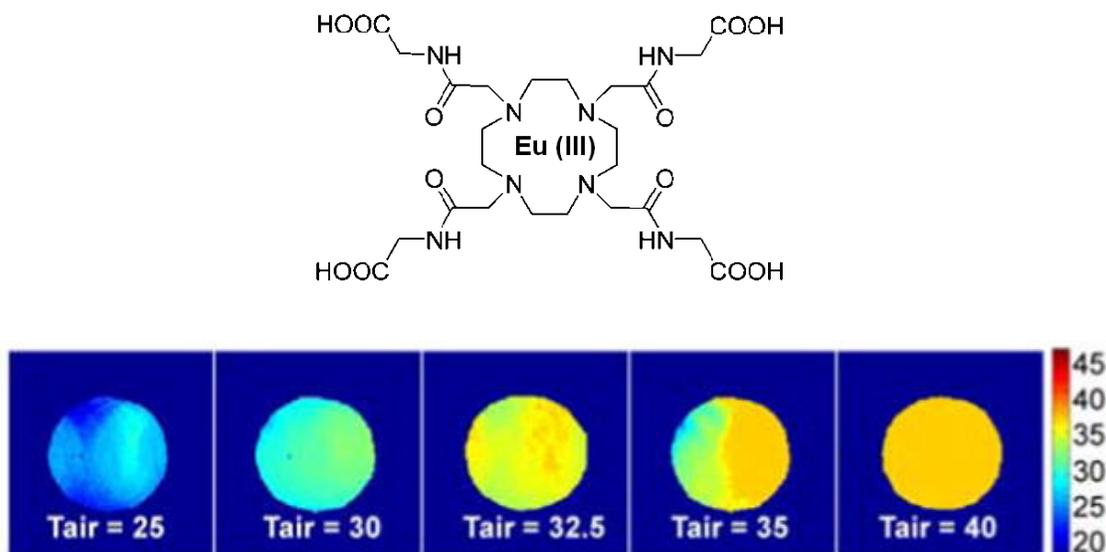


Figure 31: Agent de contraste paraCEST servant de sonde de température [Zhang et al. 2005 B]. Images IRM-CEST (4,7 T, pH 7,0 $B_1=17 \mu\text{T}$) d'une solution aqueuse à 10 mM de [Eu(DOTAM-Gly)]. Les températures T_{air} ont été mesurées à l'aide d'un thermocouple tandis que le code couleur rend compte des températures mesurées par effet CEST (°C).

➤ Sonde ParaCEST à présence de zinc

Dans cet exemple, le complexe Eu(III) 1,4,7,10-tetraazacyclodécane-1,7-di-N-butylacetamide ([Eu(D2BAM-2BiPyAM)]) (Figure 32) a été spécialement conçu pour répondre à la présence de cations Zn^{2+} [Trokowski et al. 2005]. A pH physiologique, les 4 groupements pyridyl sont situés au dessus des sites de coordination de l'eau et lient un cation Zn^{2+} , stabilisé par sa liaison hydrogène avec un groupe hydroxyle qui interagit avec la molécule d'eau coordonnée au cation Eu^{3+} . Cette situation permet de catalyser l'échange de protons entre l'eau liée à l'Eu(III) et l'eau libre. En absence de Zn^{2+} , l'effet CEST fonctionne

mais dès lors que le groupe hydroxyle est introduit par la présence de Zn^{2+} , le signal CEST est éteint. Cette réponse négative est spécifique du zinc (Figure 31).

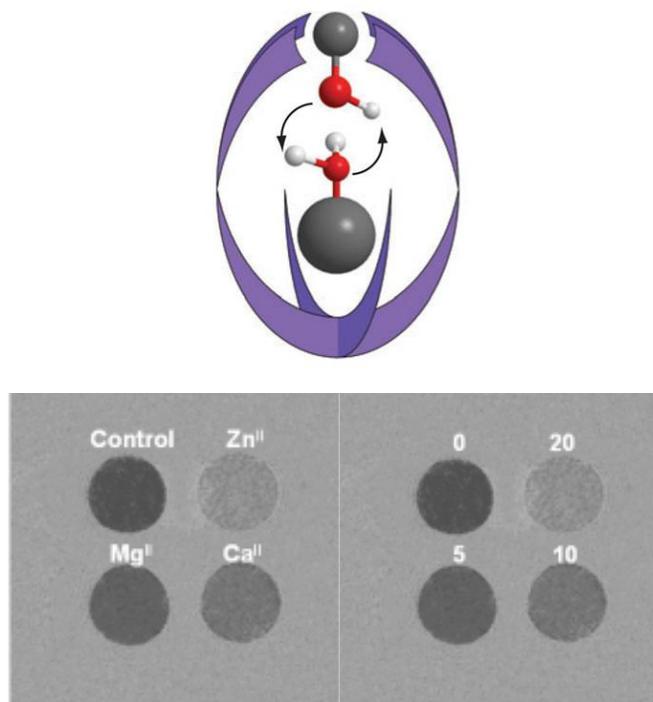


Figure 32: Images IRM CEST (4,7T, $B_1 = 8\mu T$, température ambiante) de solution de ParaCEST [Eu(D2BAM-2BiPyAM)] activé par la présence de Zn(II) : à gauche le complexe dans différents milieux (absence d'ions, Zn(II), Mg(II) et Ca(II)) ; à droite, complexe en présence de 0, 5, 10 et 20 mM de Zn(II) [Trokowski et al. 2005]. A pH physiologique, la liaison de Zn^{2+} à son site de liaison au-dessus de la molécule d'eau liée au cation Eu^{3+} donne lieu à un échange de protons rapide ce qui modifie les propriétés CEST [Sherry et Woods 2008].

➤ Sonde ParaCEST à présence de glucose

Ici, une molécule de glucose peut se lier au complexe Eu(III)-1,4,7,10-tetraazacyclodécane-1,7-di-N-méthylacetamide-4,10-di-N-(m-phenylborate)acetamide ([Eu(D2BAM-2PB)]) par l'intermédiaire des groupes borate de phényl et piéger la molécule d'eau sur son site de liaison (Figure 33), ralentissant l'échange avec l'eau libre et conduisant à un effet CEST renforcé les molécules d'eau liées à l'euporium du, ce qui ralentit les échanges de l'eau et favorise un meilleur effet CEST [Trokowski et al. 2004; Viswanathan et al. 2010].

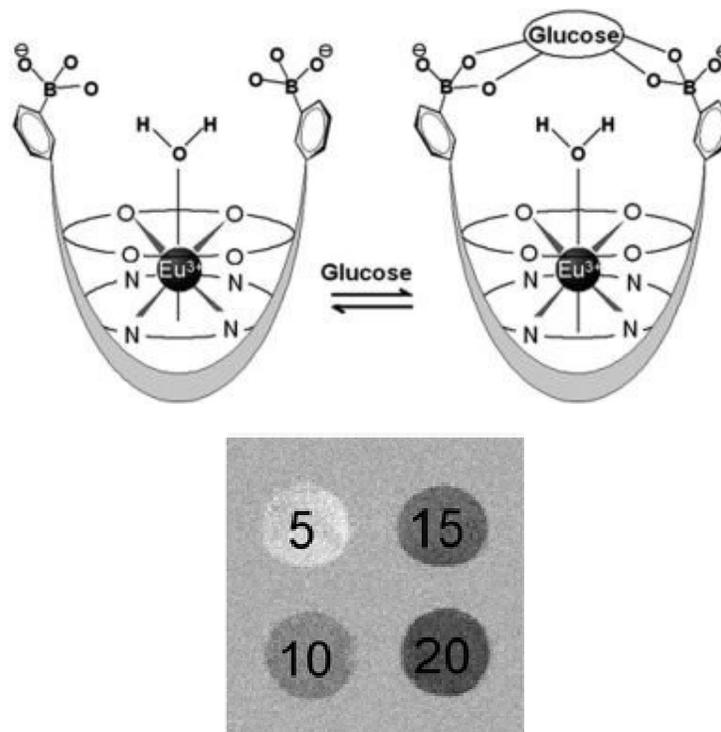


Figure 33: Image IRM CEST (4,7T, $B_1 = 8\mu\text{T}$, température ambiante) de solutions de ParaCEST [Eu(D2BAM-2PB)] à différentes concentrations de glucose (5, 10, 15 et 20 mM) [Trokowski et al. 2004]. La liaison de la molécule de glucose au-dessus de la molécule d'eau liée ralentit l'échange de l'eau, ce qui augmente l'effet CEST [Viswanathan et al. 2010]

D'autres agents ParaCEST ont été conçus pour les rendre sensibles à un environnement particulier ou à une molécule donnée comme certaines enzymes, lactates, ions métalliques de natures variables ou protéines telles que l'albumine [Ratnakar et al. 2008 ; Ren et al. 2008 ; Trokowski et al. 2004 ; Trokowski et al. 2005; Liu et al. 2007 ; Zhang et al. 2003 ; Aime et al. 2002 ; Huang et Morrow 2009]

D'autres pistes ont été abordées pour modifier les propriétés des agents ParaCEST, telles que leur ciblage spécifique ou leur stabilisation par association à des macromolécules ou à des systèmes supramoléculaires.

Agents PARACEST de ciblage étudiés du point de vue physico-chimique

Le ciblage peptidique est une voie qui connaît un essor grandissant pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques. Dans le domaine de l'imagerie CEST, des ligands dérivés du DOTA ou du DOTAM par conjugaison à des peptides ont été envisagés [Wojciechowski et al 2007 ; León-Rodríguez et Kovacs, 2008]. La Figure 34 montre un certain nombre de spectres CEST réalisés à partir de solutions de complexes ParaCEST de différents ions Ln(III).

Selon le lanthanide et le peptide, les effets CEST sont différents de par la cinétique d'échange d'eau mais également de par l'origine des protons responsables de l'effet CEST (qui peuvent aussi bien provenir de l'eau liée que des protons amines ou amides des ligands peptidiques)

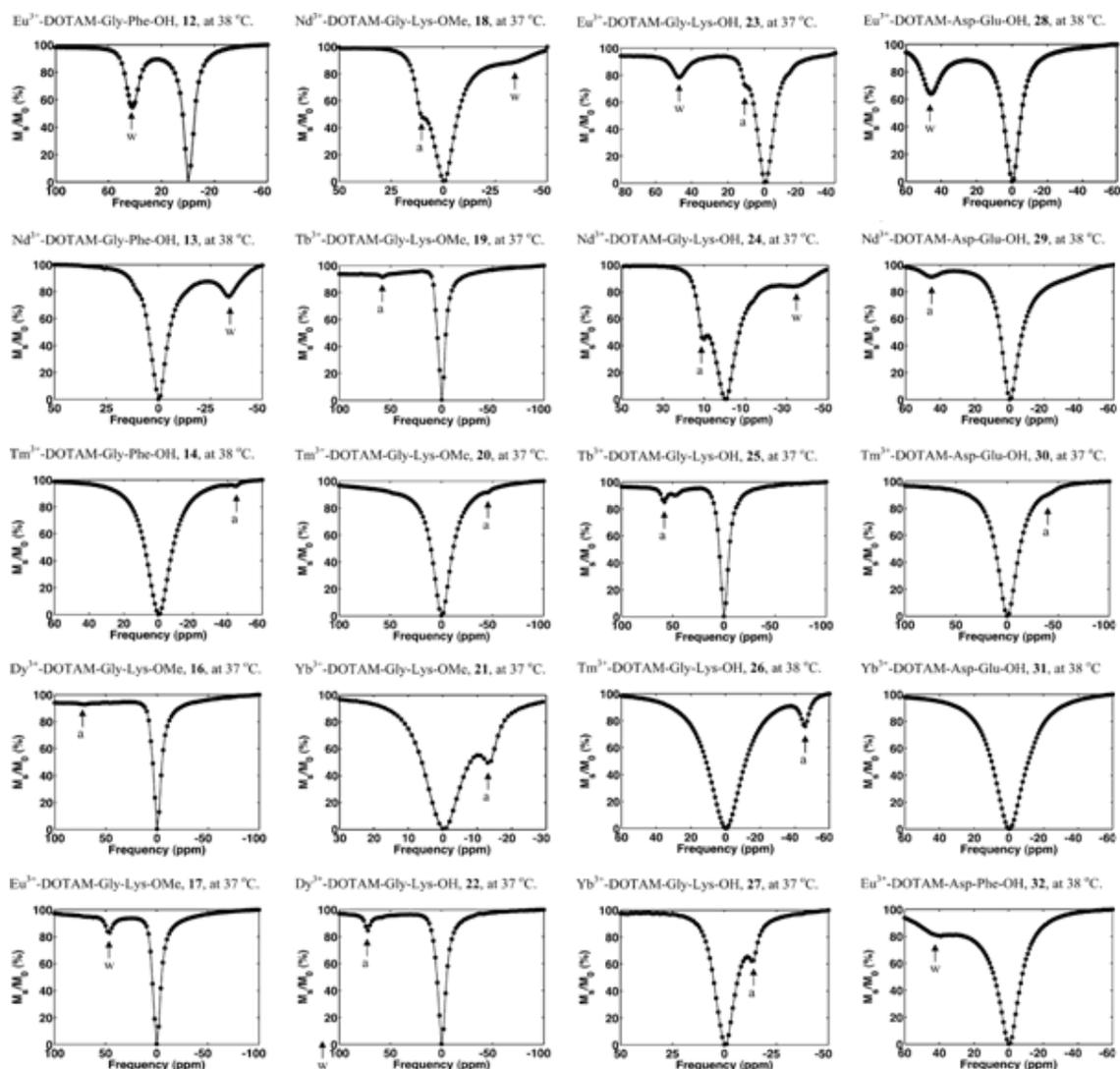


Figure 34: Spectres CEST (10 mM pH 7.0. 9.4 T et B1 = 14 μ T) de différents complexes de dérivés DOTAM conjugués à deux peptides et complexant des ions Eu(III), Nd(III), Tb(III) Tm (III) Dy (III) et Yb (III). La lettre « w » indique les signaux CEST des protons de l'eau et la lettre « a » indique les signaux CEST induit par les protons amides.

Agents ParaCEST supramoléculaires

Si le principe de l'effet CEST est bien démontré expérimentalement, il reste une limite souvent problématique à leur utilisation : leur sensibilité. Les systèmes usuels présentent en effet une efficacité CEST n'excédant pas 5% pour des concentrations de l'ordre de 0.5 mM [Aime et al. 2003].

Pour palier le manque de sensibilité, critique *in vivo*, une solution consiste à associer le complexe paramagnétique à une entité capable d'augmenter le rendement CEST par la multiplication des sites d'échanges, de ralentir les échanges de l'eau afin de répondre aux exigences cinétiques propres aux agents ParaCEST, éventuellement d'influencer favorablement les paramètres de deuxième sphère, q_{SS} et τ_m tout en induisant de fortes variations de déplacement chimique.

Aime et al. proposèrent l'utilisation d'un polymère cationique, la poly-L-arginine, ayant un comportement DiaCEST pour le coupler au complexe paramagnétique de Tm(III) [Tm(HDOTP)] efficace en tant qu'agent de déplacement chimique [Aime et al. 2003]. Le rendement de l'effet CEST ainsi obtenu dépasse d'environ 30 fois l'effet CEST du polymère seul (Figure 35). La limite de détection est repoussée à 1,7 μ M de polymère et 30 μ M de complexe.

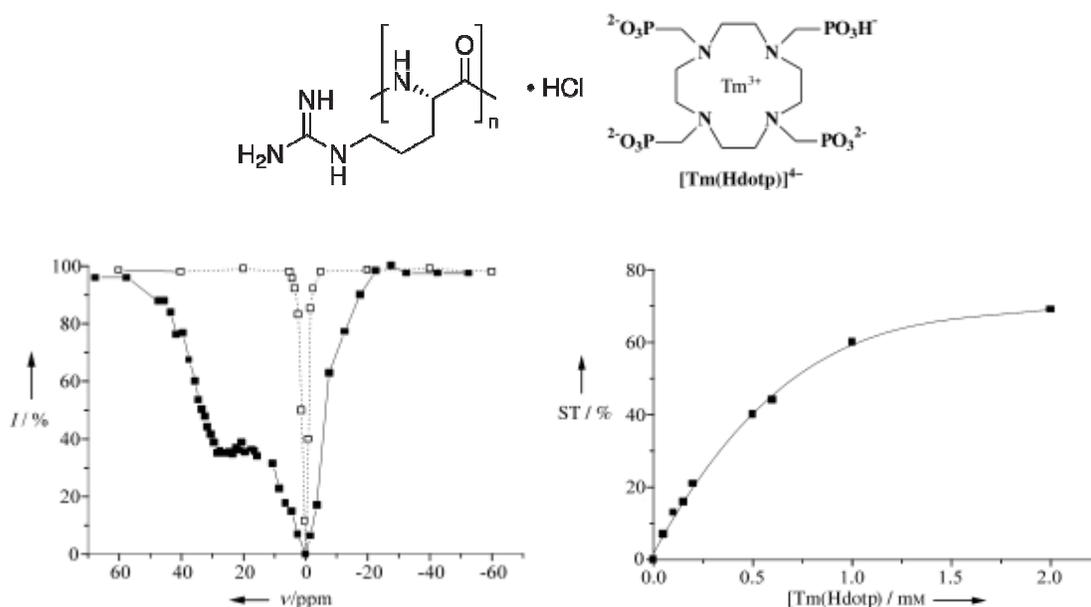


Figure 35: Spectre CEST (7.05 T, 312 K, pH 7.4, B1 = 25 μ T) d'une solution aqueuse à 0,1mM de poly-L-arginine en présence (carrés noirs) et en absence (carrés blancs) de [Tm (HDOTP)] (à gauche) et variation de l'effet CEST (ST%) en fonction de la concentration en complexe (à droite). La structure chimique du polymère possède des protons labiles sur les groupes amide et amine qui produisent l'effet CEST sous l'influence du complexe paramagnétique par formation d'un adduit [Aime et al. 2003].

Une autre stratégie consiste à créer une macromolécule (polymère [Wu et al. 2008] ou dendrimère [Pikkemaat et al. 2007]) contenant plusieurs sites protoniques et incorporant plusieurs ions Ln(III).

Dans l'exemple de la Figure 35, la fixation sur le polymère préserve les caractéristiques de déplacement chimique et augmente considérablement la sensibilité de l'agent paraCEST.

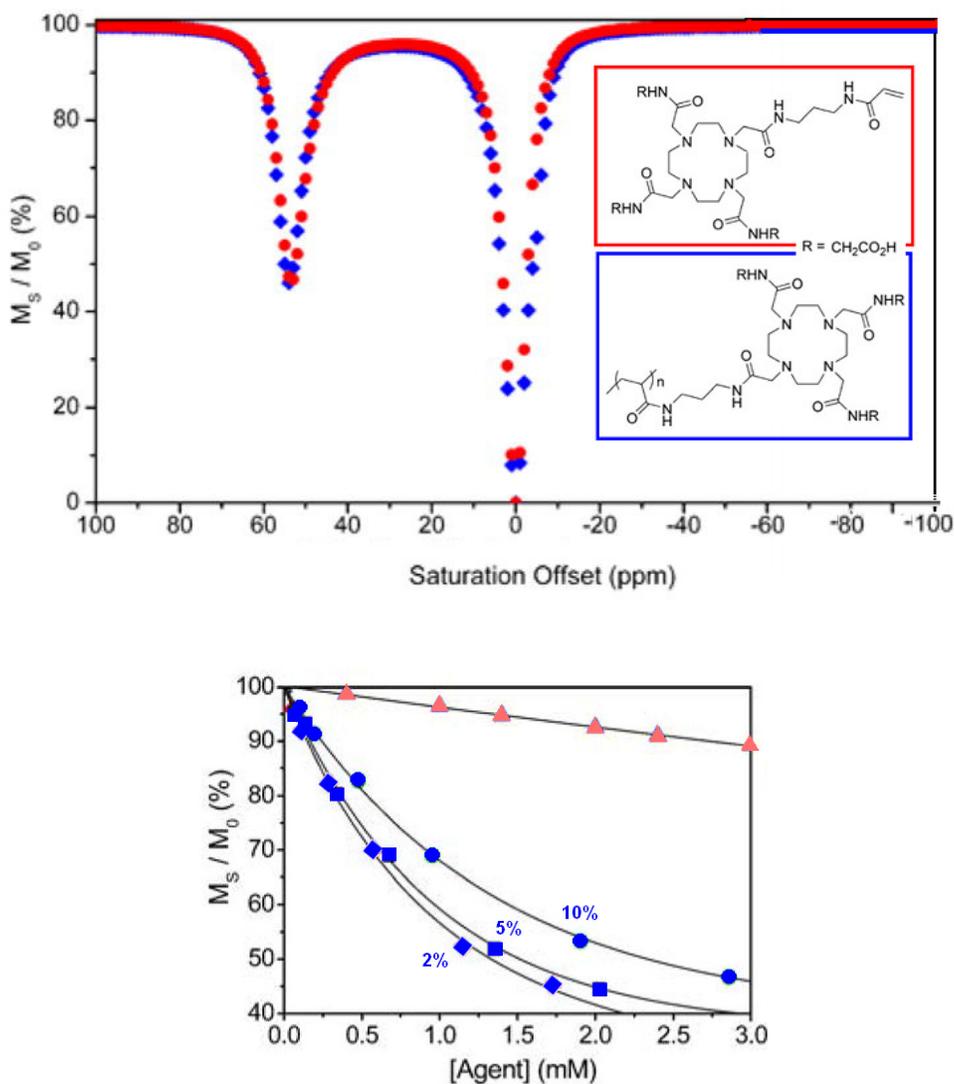


Figure 36: Spectres CEST comparés d'un complexe d'europium monomère et de son homologue polymère à 30 mM (11.75 T, 298 K, $B_1 = 14.1 \mu T$) et rendements CEST (M_S/M_0 %) obtenus en fonction de la concentration en agent ParaCEST et le degré de polymérisation (%) [adapté de Wu et al. 2008].

Pour aller plus loin, l'encapsulation dans des systèmes particulières a été envisagée. Ainsi, Winter et al ont utilisé des nanoparticules de perfluorocarbone ciblées de diamètre voisin de 300 nm pour la détection de fibrines [Winter et al. 2006]. Le complexe, un dérivé méthoxy-DOTA-benzyle du ligand Eu-Tétra-amide a été substitué par un phospholipide avant de l'incorporer aux nanoparticules. L'effet de déplacement chimique de ce système ($\Delta\omega=52ppm$)

est particulièrement intéressant. Les auteurs ont mis en évidence la faisabilité d'une imagerie CEST ciblée sur des caillots sanguins riches en fibrine (Figure 38).

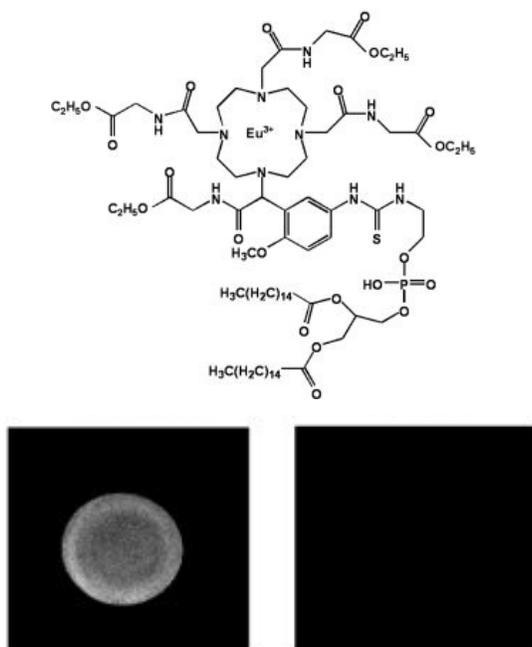


Figure 37: Structure chimique d'un complexe [Eu (methoxy-benzyl-DOTA)] sur lequel est greffé un phospholipide pour l'incorporation dans des nanoparticules de perfluorocarbone. Images IRM-CEST (4,7T, $B_1=19\mu\text{T}$, température ambiante) de suspensions à 2,5 mM Eu(III) de nanoparticules ParaCEST (à gauche) et de nanoparticules contrôle (à droite) dans du tampon aqueux PBS [Winter et al. 2006].

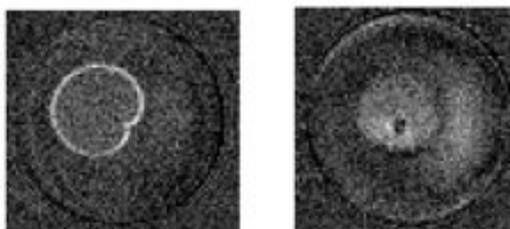


Figure 38: Images IRM-CEST (4,7T, $B_1=19\mu\text{T}$, température ambiante) de caillots sanguins en présence (à gauche) ou en absence de nanoparticules ParaCEST de perfluorocarbone chargées en complexe lipidique dérivé de [Eu (methoxy-benzyl-DOTA)] [Winter et al. 2006].

De façon similaire aux nanoparticules, l'encapsulation d'agents CEST dans des vésicules lipidiques a été proposée par le groupe de S. Aime. Ces agents ParaCEST particuliers font l'objet du chapitre suivant.

IV. Les agents de contraste de type LipoCEST

L'utilisation de systèmes lipidiques colloïdaux, notamment de liposomes, comme outils pour renforcer les performances des agents de contraste en imagerie par résonance magnétique, s'est tout d'abord développée en raison des mêmes avantages que ceux reconnus pour le transport et la délivrance de principes actifs thérapeutiques, à savoir la possibilité d'une délivrance systémique avec amélioration des paramètres pharmacocinétiques de la molécule véhiculée et de sa biodisponibilité ainsi que l'aptitude de ces systèmes à pouvoir être modifiés en surface pour le ciblage spécifique de tissus d'intérêt jusqu'au niveau intracellulaire [Ayyagari et al. 2006 ; Ghaghada et al. 2008]. Le deuxième moteur d'intérêt repose sur le fait que la structure même des assemblages lipidiques peut être exploitée pour amplifier l'efficacité de l'agent de contraste qu'il transporte, voire pour contribuer directement au mécanisme impliqué dans l'obtention du contraste [Mulder et al ; 2006]. Les agents de contraste de type LipoCEST, issus de l'incorporation d'un composé paramagnétique se comportant intrinsèquement comme un agent CEST au sein de vésicules lipidiques submicroniques capables de contrôler les paramètres cinétiques de l'échange chimique mis en jeu, illustrent parfaitement l'ensemble de la démarche. Silvio Aime et ses collaborateurs sont les pionniers dans ce domaine pour avoir publié la première preuve de concept de cette nouvelle famille d'agents de contraste [Aime et al. 2005]. La suite de ce chapitre reprend l'ensemble de leurs travaux dont la contribution au développement de ces systèmes est assez impressionnante, ainsi que certaines études réalisées parallèlement par d'autres auteurs.

IV-1. Liposomes et perméabilité membranaire

Le but de ce paragraphe est de définir ce que l'on entend par liposome, en donner les caractéristiques physiques essentielles et traiter explicitement deux aspects importants pour comprendre leur rôle dans l'effet CEST : d'une part le phénomène de perméabilité passive aux petites molécules et en particulier aux molécules d'eau, d'autre part la notion de pression osmotique et les conséquences de ce paramètre sur la structure et la stabilité des vésicules.

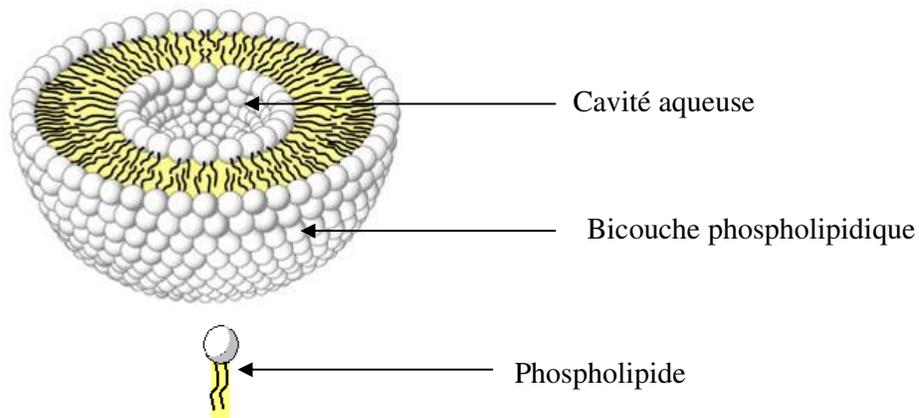


Figure 1: représentation schématique d'un liposome formé d'une double couche de phospholipides renfermant en son cœur une cavité aqueuse.

Découverts il y a près de 50 ans [Bangham et al 1965], les liposomes sont des vésicules délimitées par une membrane, constituée d'une (liposomes unilamellaires) ou de plusieurs (liposomes oligo-ou multilamellaires) bicouches de lipides refermées sur elles-mêmes, qui encapsulent une petite partie du volume aqueux dans lequel elles ont été formées. Le plus souvent, les liposomes sont de dimensions submicroniques, de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres selon la méthode de préparation, et les lipides composant leur enveloppe sont majoritairement des phospholipides d'origine naturelle ou synthétique. De par leur structure, ces objets représentent des modèles cellulaires primaires et peuvent admettre des substances hôtes soit hydrosolubles, au sein de leur cavité aqueuse interne, soit amphiphiles ou hydrophobes, au sein de leur membrane (Figure 1). Les applications des liposomes sont très nombreuses et touchent différents secteurs. En particulier, leurs propriétés structurales ajoutées à l'innocuité de leur composition justifient amplement leur utilisation dans les domaines pharmaceutique et biomédical. Concernant la vectorisation de principes actifs pour le diagnostic ou la thérapie, on distingue :

- (1) les liposomes conventionnels, dits de première génération, composés de mélanges simples de phospholipides non modifiés
- (2) les liposomes de seconde génération stabilisés stériquement par un revêtement de chaînes d'un polymère hydrophile tel que le poly(éthylène glycol) ou PEG. Le rôle de ce revêtement est double. Tout d'abord, les vésicules, assemblages très souvent métastables, ont tendance à s'agréger puis à fusionner pour diminuer la courbure énergétiquement défavorable des bicouches formant leur membrane. La présence de chaînes de PEG en surface des liposomes empêchent le phénomène d'agrégation par

- effet de répulsion stérique et apporte donc une excellente stabilité physique des objets. Ensuite, au sein des milieux biologiques et notamment du plasma sanguin, les vésicules injectées par voie intraveineuse doivent être résistantes face à l'adsorption des opsonines, protéines servant de reconnaissance aux macrophages du système immunitaire. Ce phénomène prolonge ainsi le temps de circulation des liposomes. Le revêtement de PEG inhibe, tout au moins partiellement. Ces liposomes de seconde génération sont dit «furtifs» (de l'anglais «*stealth® liposomes*») [Allen et al. 1991 & 1995]. Les études dans ce domaine ont démontré que la stabilité optimale est obtenue pour une proportion molaire de 5% de phospholipides porteurs de chaînes de PEG ayant pour masse moléculaire 2000 g/mole [Needham et al. 1992; Beugin et al. 1998].
- (3) les liposomes dits de troisième génération, stabilisés stériquement et dont la surface a été fonctionnalisée pour leur associer un facteur de reconnaissance spécifique d'une cible biologique donnée [Sapra et al. 2003 ; Gabizon et al. 2004 ; Jaracz et al. 2005].

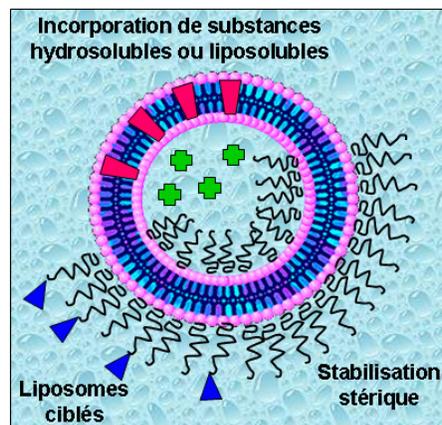


Figure 2 : schéma représentatif d'un liposome unilamellaire et des principales propriétés exploitées pour la vectorisation de principes actifs.

Du point de vue des applications en imagerie et notamment en IRM, l'un des avantages de l'utilisation des liposomes vient du fait que leur membrane et surtout leur cavité aqueuse peuvent transporter des molécules d'agents de contraste en quantité assez élevées, augmentant sensiblement la concentration locale de ces composés tout en assurant leur stabilité dans les milieux physiologiques. De plus, le volume interne des liposomes représente un réservoir d'eau directement en contact avec l'agent de contraste et dont l'échange relativement lent avec le milieu environnant est régulé par les propriétés de perméabilité de la membrane

délimitant la structure vésiculaire des liposomes. Comme nous le détaillerons plus loin dans le texte, c'est sur cette seconde propriété que repose le fonctionnement d'un agent LipoCEST.

Perméabilité membranaire

Les membranes lipidiques sont peu perméables aux substances polaires ou ionisées. L'eau, de par sa petite masse molaire fait exception (Figure 3). La perméabilité d'un matériau se définit comme son aptitude à se laisser traverser par un fluide sous l'effet d'un gradient de pression. Cette capacité à transporter un liquide ou un gaz est définie par le coefficient de perméabilité P ($\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$). P est une propriété intrinsèque du matériau. Il est indépendant de l'épaisseur du film et de la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du liposome (force motrice). Le transport au travers de la membrane se déroule en trois étapes: l'absorption de la molécule en surface de la membrane; sa dissolution et sa diffusion à travers la membrane et sa désorption de la surface opposée. En général, l'étape de dissolution-diffusion est la plus lente, et elle est donc cinétiquement déterminante.

Dans le cas d'un mécanisme de diffusion simple, la perméabilité P d'une membrane à une substance donnée dépend du coefficient de partage K à l'équilibre de cette substance entre la bicouche de lipides et le continuum aqueux, de son coefficient de diffusion D et de l'épaisseur e_C des chaînes hydrocarbonées des lipides au sein de la bicouche [Finkelstein 1976, Nagel et al 2008, Mathal et al 2008]:

$$P = K.D/e_C \quad [1]$$

Le coefficient de diffusion D (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) décrit la mobilité de la molécule qui diffuse à travers la membrane et dépend principalement de la taille de cette molécule, des mouvements des chaînes et du volume libre des lipides. La diffusion simple est un phénomène physique passif qui n'intervient que pour les molécules qui peuvent traverser spontanément la bicouche de phospholipides. La molécule doit donc être hydrophobe ou être suffisamment petite si elle est hydrophile (l'eau par exemple) pour traverser la membrane. Il s'agit d'un mécanisme non spécifique relativement lent.

A l'état stationnaire, le flux de matière diffusant à travers la membrane peut être exprimé en fonction du gradient de potentiel chimique ($\mu_{i,x}^m$) à travers la membrane par la 1^{ère} loi de Fick dans le cas d'une solution binaire composée d'un soluté et d'un solvant aqueux:

$$J_{i,x} = \frac{D_i^m C_{i,0}^m}{RT} \times \frac{\partial \mu_{i,x}^m}{\partial x} \quad [2]$$

Où $J_{i,x}$ est le flux transféré de l'espèce i, eau ou soluté

D_i^m est le coefficient de diffusion moyen à travers la membrane m,

$C_{i,0}^m$ est la concentration molaire de l'espèce i en entrée de la membrane,

R est la constante des gaz parfaits

T est la température absolue

Cette relation met en évidence que le gradient de concentration de l'espèce diffusante de part et d'autre de la membrane est à l'origine de la mobilité des molécules qui se déplacent pour tendre à égaliser leur potentiel chimique au sein de la phase solvant. Le signe négatif permet de tenir compte du fait que le flux et le gradient de concentration sont de signes opposés, le flux s'établissant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.

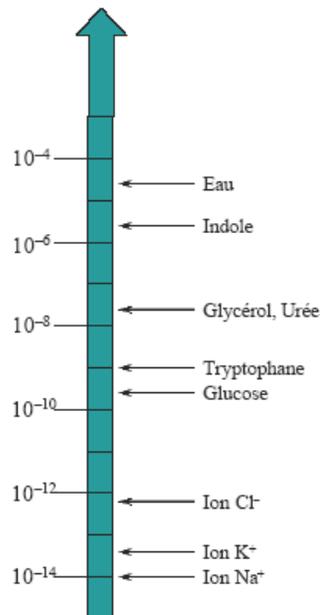


Figure 3 : Ordres de grandeur des coefficients de diffusion de solutés au travers une membrane phospholipidique.

Pression osmotique

Le fait que les membranes lipidiques soient semi-perméables, c'est-à-dire que les molécules d'eau peuvent diffuser plus rapidement que la plupart des solutés, explique la sensibilité des

liposomes aux variations de pression osmotique. La pression osmotique Π désigne la pression minimale qu'il faut exercer pour empêcher le passage d'un solvant d'une solution moins concentrée à une solution plus concentrée au travers d'une membrane semi-perméable, autrement dit, selon la loi de Van t'Hoff :

$$\Pi = RT \sum x_i [S]_i \quad [3]$$

Où R est la constante des gaz parfaits, T la température, $[S]_i$ la concentration du soluté i et x_i le nombre d'espèces dissociées pour le soluté i . La pression osmotique est à l'origine d'une force mécanique qui s'applique à la membrane du liposome et qui, dans certaines conditions, peut causer sa déformation voire sa rupture. Lorsque la concentration en solutés est différente entre l'intérieur et l'extérieur du liposome, l'eau va diffuser d'un compartiment à l'autre pour tenter d'équilibrer le potentiel chimique de part et d'autre de la membrane. Selon que la pression osmotique interne est inférieure (régime hyper-osmotique) ou supérieure (régime hypo-osmotique) à la pression osmotique externe, le flux de molécules d'eau va être dirigé vers l'extérieur ou l'intérieur du liposome provoquant respectivement une perte de volume et donc une perte de sphéricité du liposome ou au contraire son gonflement voire sa rupture. La pression osmotique Π peut s'exprimer en fonction de l'activité de l'eau a_{eau} , comme suit:

$$RT \ln(a_{\text{eau}}) = -\Pi V \quad [4]$$

Où V est le volume molaire de l'eau.

Il convient donc lors de la préparation de liposomes de s'assurer que les milieux internes et externes sont à la même pression osmotique ou osmolarité (concentration totale en espèces solubilisées, l'unité étant la mOsm pour mM d'espèces) La Figure 4 illustre l'évolution de liposomes soumis à un régime hyper-osmotique ou hypo-osmotique.

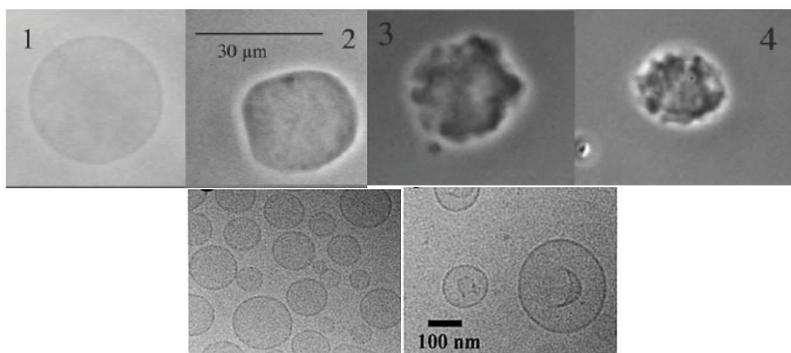


Figure 4 : En haut (images 1, 2, 3 et 4) Images de microscopie optique d'un liposome géant de dioléylphostatidylcholine DOPC soumis à un stress hyperosmotique [Viallat et al. 2004]

En bas: Images de microscopie Cryo-MET de liposomes de dioléylphostatidyl-choline (DOPC), ethanoamine (DOPE), -glycérol (DOPG) (1:4:3 ratio molaire) en milieu iso-osmotique (à gauche) et hypo-osmotique (à droite) [Van der Heide et al. 2001].

Pour résumer, la stabilité physique d'une préparation de liposomes au sein desquels a été encapsulée une substance sera plus importante si la pression osmotique de part et d'autre de la membrane est équilibrée. En effet, cette situation limite fortement le flux d'eau puisque son potentiel chimique est équilibré. Néanmoins, si l'équilibre de pression osmotique est obtenu à l'aide d'un soluté de nature différente, les liposomes « fuient » sous influence du gradient d'espèces jusqu'à égalité des concentrations interne et externe de la substance (et en théorie du soluté). Ce phénomène est plus ou moins lent, selon son aptitude à diffuser au travers de la bicouche lipidique et *vice versa* selon l'imperméabilité de la bicouche.

La Figure 6 montre l'exemple de la fuite d'une petite molécule, ici la carboxy-fluorescéine, encapsulée dans des liposomes en condition initialement iso-osmotique. La mesure de fuite est effectuée par spectroscopie de fluorescence. La sonde est encapsulée à une concentration entraînant l'extinction de son émission de fluorescence. La dilution apportée lors de la fuite produit un signal proportionnel à la quantité libérée. Dans cet exemple, le mélange lipidique composant la membrane des liposomes présente une température de transition de phase solide-liquide des chaînes, de sorte qu'en-dessous de cette température la membrane est peu très perméable, expliquant la cinétique lente de fuite.

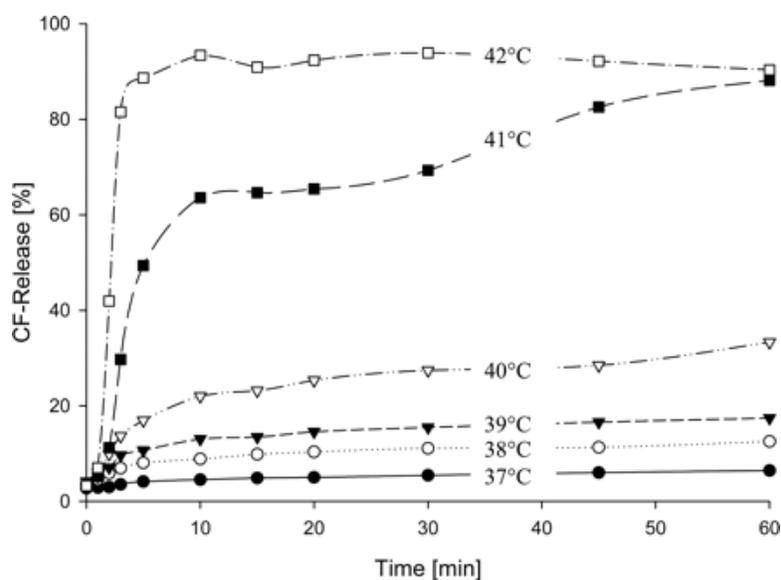


Figure 5 : Fuite passive de carboxyfluorescéine (CF) encapsulée dans des liposomes de dipalmitoyl (DPPC) / distearoyl (DSPC) phosphatidylcholine et de dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) (5 :5 :3 ratio molaire) mesurée par spectrométrie de fluorescence en fonction de la température. La fuite est provoquée par le gradient de concentration de la sonde de fluorescence entre l'intérieur des liposomes et l'extérieur. L'accélération de la fuite au cours du temps rend compte du changement de perméabilité de la membrane lorsque le système est porté à la température de transition de phase solide-liquide des chaînes des lipides [Lindner et al. 2004].

L'utilisation de lipides possédant une température de transition de phase élevée est donc un moyen de stabiliser les taux d'encapsulation. Une autre stratégie consiste à incorporer du cholestérol dans la bicouche des liposomes et exploiter l'effet condensant de ce lipide qui réduit notablement les échanges d'eau et de petites molécules au travers de leur membrane [Robinson et al. 1995 ; Reginald et al 1995 ; Arsov et Quaroni, 2007]. La composition molaire généralement optimale en association avec des phospholipides est comprise entre 15 et 30 % [Parasassi et al 1995].

Dans le domaine de l'imagerie médicale par résonance magnétique, les liposomes ont été utilisés pour stabiliser des agents de contraste pour une administration par voie intraveineuse. Un exemple particulier très proche des systèmes LipoCEST concerne des liposomes chargés de complexes paramagnétiques de gadolinium et utilisés pour un contraste de relaxivité [Tilcock et al. 1989]. L'influence de la composition lipidique [Tilcock et al. 1990], de la taille des vésicules [Ghaghada et al. 2008] et de la stabilisation stérique par du PEG [Unger et al. 1989 ; Ayyagari et al. 2006] a été étudiée. Le rôle du cholestérol a été clairement mis en évidence comme stabilisateur des taux d'encapsulation du complexe [Tilcock et al. 1999] ainsi que celui de phospholipides à chaînes saturées ayant une température de transition de phase supérieure à 37°C [Fossheim et al. 1999].

Méthodes de mesure de la perméabilité membranaire à l'eau

Le contrôle des propriétés de perméabilité des liposomes est critique pour des applications en IRM-CEST dont l'efficacité dépend en effet non seulement de la stabilité des systèmes amis également de la cinétique d'échange des molécules d'eau entre l'espèce paramagnétique (agent de déplacement chimique) et le réservoir d'eau libre extérieur aux liposomes. Différentes méthodes existent pour déterminer les coefficients de perméabilité. On peut citer tout d'abord la mesure de la perméabilité osmotique par la méthode « stop flow » mis au point par Colowick et Kaplan (1960) qui fonctionne par changement brutal de la pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur du liposome par ajout d'un sel dans le milieu. Le choc hyper-osmotique crée un départ d'eau modifiant le volume du liposome qui peut être mesuré en fonction du temps par exemple par diffusion quasi élastique de la lumière [Tonomara et al. 1978]. Le même principe peut être appliqué cette fois en suivant la réponse d'une sonde de fluorescence comme la fluorescéine dont l'émission de fluorescence rend compte des variations de volume [Lande et al 1995].

Il est possible de suivre la diffusion passive de molécules d'eau entre le compartiment interne de structures vésiculaires et le milieu extérieur par RMN du ^1H ou de l'oxygène 17, les deux atomes constitutifs de l'eau. Une méthode utilisant la RMN du ^1H appelée RMN PFG pour « pulsed Magnetic Field Gradient » a été proposée pour permettre d'étudier les effets du cholestérol sur la diffusion transmembranaire de l'eau dans un érythrocyte [Reginald et al 1995] sans avoir besoin de marquer ni la membrane ni les molécules d'eau, ce qui permet d'étudier des systèmes biologiques sans avoir besoin de les modifier et donc de les perturber [Reginald et al 1995 ; Cho et al 2003]. La méthode est également utilisable sur des systèmes artificiels, vésicules phospholipidiques [Wasterby et al 2002] ou vésicules d'autres lipides tels que les dialkyl ester d'ammonium [Groth et al 2003].

Une autre méthode repose sur des mesures de relaxivité pour distinguer l'eau interne de l'eau externe lors du processus de diffusion à travers la membrane de liposomes en utilisant des agents de déplacement chimique. La Figure 6 schématise le principe de la méthode dans le cas d'un agent de déplacement chimique qui accélère la relaxation T_2 des protons de l'eau, en l'occurrence des ions Mn (II) [Huster et al. 1997]. L'expérience consiste à encapsuler les ions Mn(II) dans les liposomes en conditions iso-osmotiques (par compensation de la quantité d'espèces en solution de part et d'autre de la membrane des liposomes, à l'aide d'un sel simple), puis de mesurer le temps de relaxation T_2 de la dispersion. L'eau externe correspond au compartiment A (volume V_A) et l'eau interne correspond au compartiment B (volume V_B). Le temps de résidence τ_B de l'eau dans le compartiment interne des liposomes est donné par la relation suivante:

$$1/T_2 = f/(T_{2B} + \tau_B) + 1/T_{2A} \quad [5]$$

Où T_{2A} et T_{2B} sont les temps de relaxation transversale mesurés indépendamment pour le milieu extérieur (sans agent de déplacement chimique) et l'eau interne à une concentration identique en agent de déplacement chimique mais sans liposomes. Le facteur f correspond à la fraction volumique occupée par les liposomes dans l'échantillon ($f = V_B/V_A$). Le coefficient de perméabilité est alors calculé en tenant compte de l'aire de la surface des liposomes (A) :

$$P = V_B/A\tau_B \quad [6]$$

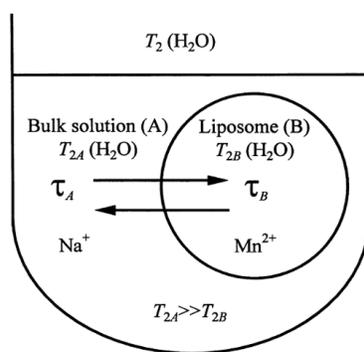


Figure 6: Expérience de mesure de relaxivité pour la détermination de la perméabilité à l'eau de Liposomes. Un agent de déplacement chimique de type T_2 (ions $Mn(II)$) est encapsulé dans les liposomes en conditions iso-osmotiques (à l'aide d'ions $Na(I)$) pour induire sur l'eau interne (B) un temps de relaxation T_{2B} de ses protons plus court que le temps de relaxation à l'extérieur des liposomes (eau A, T_{2A}). τ_B désigne le temps de résidence de l'eau dans le compartiment interne des liposomes [Huster et al. 1997].

La méthode de relaxivité a été reprise en utilisant des agents de type T_1 [Fossheim et al 1999; Terreno et al. 2008], notamment le prohance® [$Gd(HDO3A)$] pour déterminer le coefficient de perméabilité à l'eau de membranes de compositions différentes (Figure 7). Les relations [5] et [6] ont été appliquées aux temps de relaxation longitudinale T_1 , T_{1A} et T_{1B} . Le Tableau 1 reporte les perméabilités membranaires à l'eau déterminées pour différentes membranes. On peut constater l'influence du cholestérol ou de lipides à chaînes saturées sur l'imperméabilisation des membranes.

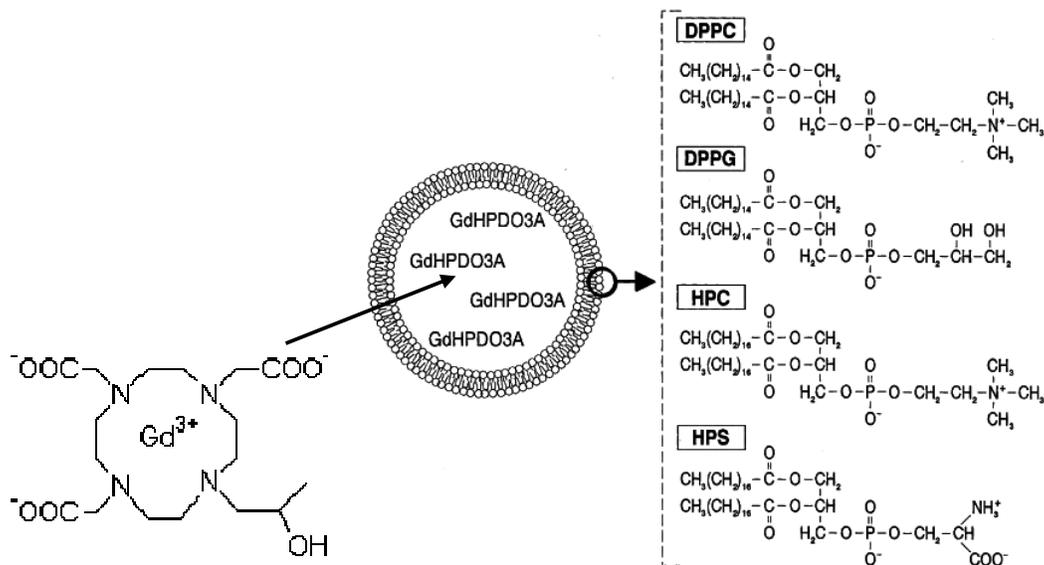


Figure 7: Membranes étudiées par la méthode de relaxivité. La perméabilité des liposomes a été déterminée par encapsulation de [$Gd(HPDO3A)$] [Fossheim et al 1999].

Tableau 1 : perméabilités membranaires à l'eau de liposomes de compositions différentes dans des conditions de pH physiologique et à différentes températures.

Composition de la membrane ^a (diamètre des liposomes)	Perméabilité membranaire à l'eau P (cm. s ⁻¹)	T	référence
PC (200 nm)	3,5 ± 0,5 × 10 ⁻³	25°C	[Dordas et Brown, 2000]
DLPE	2,14 ± 0,41 × 10 ⁻³	35°C	d'après [Mathai et al. 2008]
DOPS	1,5 ± 0,50 × 10 ⁻³	30°C	id
DMPC	8,3 ± 0,76 × 10 ⁻³	30°C	id
DLPC	10,4 ± 0,50 × 10 ⁻³	30°C	id
POPC	13,0 ± 0,44 × 10 ⁻³	30°C	id
diC22:1PC	11,7 ± 1,15 × 10 ⁻³	30°C	id
DOPC	15,8 ± 0,58 × 10 ⁻³	30°C	id
DOPC /CHOL (90/10)	14,5 ± 0,57 × 10 ⁻³	30°C	id
DOPC /CHOL (80/20)	11,5 ± 0,58 × 10 ⁻³	30°C	id
DOPC /CHOL (60/40)	6,8 ± 0,57 × 10 ⁻³	30°C	id
DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (95/5) (129 ± 33 nm)	2,6 ± 0,6 × 10 ⁻⁵	25°C	[Terreno et al. 2008]
POPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (75/20/5) (105 ± 35 nm)	720 ± 210 × 10 ⁻⁵	25°C	id
POPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (55/40/5) (130 ± 31 nm)	253,4 ± 60,4 × 10 ⁻⁵	25°C	id
DPPC/DPPG (103nm)	6,40 × 10 ⁻⁵	20°C	[Fossheim et al. 1999]
id	9,39 × 10 ⁻⁵	25°C	id
id	13,0 × 10 ⁻⁵	30°C	id
id	32,8 × 10 ⁻⁵	37°C	id
HPC/HPS (130nm)	3,03 × 10 ⁻⁵	20°C	id
id	4,07 × 10 ⁻⁵	25°C	id
id	6,18 × 10 ⁻⁵	30°C	id
id	11,1 × 10 ⁻⁵	37°C	id

^a PC : phosphatidylcholine

CHOL : cholestérol

DLPE : 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DOPS : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DLPC : 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSPE-PEG₂₀₀₀ : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]

DPPG : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

HPC : hydrogenated phosphatidylcholine

HPS : hydrogenated phosphatidylserine

La membrane EPC consiste en un mélange de divers PC, dont l'hétérogénéité joue sur la perméabilité membranaire. En effet, un mélange de différents lipides de tête polaire identique mais de chaînes carbonées plus ou moins longues et plus ou moins insaturées permet d'abaisser la température critique de transition de phase, et d'avoir des chaînes fluides à température ambiante. Un mélange de phospholipides identiques quant à lui risque d'avoir une température critique plus élevée, et donc les chaînes risquent de s'ordonner dans un état cristallin. Cet état cristallin peut jouer en faveur de l'imperméabilité de la membrane.

Tableau 2 : température critique de transition de phase des lipides constitutifs des liposomes précités.

Lipides	T_c (°C)
DLPE	29
DOPS	-11
DMPC	-20
DLPC	-1
POPC	-2
DOPC	-20
DPPC	41
DPPG	41

Les expériences de mesures de perméabilités effectuées par Dordas et Brown, ainsi que Mathai sont effectuées à des températures telles que les chaînes de phospholipides en présence sont au dessus de leur température critique de transition de phase. Aussi, les chaînes sont fluides, et comme observé, la perméabilité mesurée pour chaque membrane est relativement élevée. L'ajout de cholestérol à la DOPC ou à la POPC-DSPE PEG₂₀₀₀ [Terreno et al. 2008] permet de gagner en imperméabilité.

Concernant les phospholipides dont la température de transition de phase est supérieure à la température de l'expérience (DPPC et DPPG dans les expériences de Terreno et Fossheim), les perméabilités mesurées sont effectivement plus faibles, plus faibles encore que dans le cas de chaînes fluides supplées en cholestérol. L'état de cristallinité des chaînes semble donc être un meilleur imperméabilisant que l'ajout de cholestérol à des chaînes fluides.

IV-2. Agents LipoCEST : principe et preuve de concept

Un agent LipoCEST est un cas particulier des agents ParaCEST. Pour rappel, les agents ParaCEST sont des agents de déplacement chimique paramagnétiques qui échangent des protons, le plus souvent via des molécules d'eau, suffisamment lentement avec l'eau libre pour permettre un transfert d'aimantation. Une irradiation sélective à la fréquence de déplacement chimique des protons liés transitoirement à l'agent ParaCEST permet par ce même échange chimique d'affecter le signal de l'eau libre.

Pour que ce phénomène puisse se produire, la vitesse d'échange des protons doit respecter l'échelle de temps de la RMN. La constante d'échange $k_{ex} = 1/\tau$ (où τ est le temps de résidence de l'eau sur l'agent CEST) fixe les limites du temps d'irradiation et tel que la relation $\Delta\omega \geq k_{ex}$ soit vérifiée (où $\Delta\omega$ est la différence entre la fréquence de résonance des protons de l'eau libre et la fréquence de résonance des protons de l'eau déplacée chimiquement par l'agent ParaCEST) (Figure 8). L'efficacité de l'agent CEST dépend donc

de k_{ex} . Quand $k_{ex} > \Delta\omega$, l'échange est trop rapide pour observer un effet CEST. Si $k_{ex} \ll \Delta\omega$, trop peu de protons participeront à l'échange chimique, atténuant l'effet CEST. De fait, il faut considérer que la sensibilité d'un composé paramagnétique utilisé en IRM comme agent CEST dépend du nombre de protons pouvant être échangés entre le site de liaison à l'agent CEST et l'eau libre des tissus pendant l'application de l'impulsion radiofréquence. Cette double exigence est illustrée par la Figure 9 qui rappelle que la constante d'échange conduisant au nombre optimal de protons échangeables pour une impulsion radiofréquence donnée B_1 est $k_{ex} = 2\pi B_1$ (cf chapitre III). Un autre facteur agissant sur la sensibilité CEST est le nombre effectif de sites échangeables, c'est-à-dire le nombre de protons labiles par entité d'agent CEST. La Figure 10 montre en effet l'augmentation de la réponse CEST en fonction du nombre de protons liés.

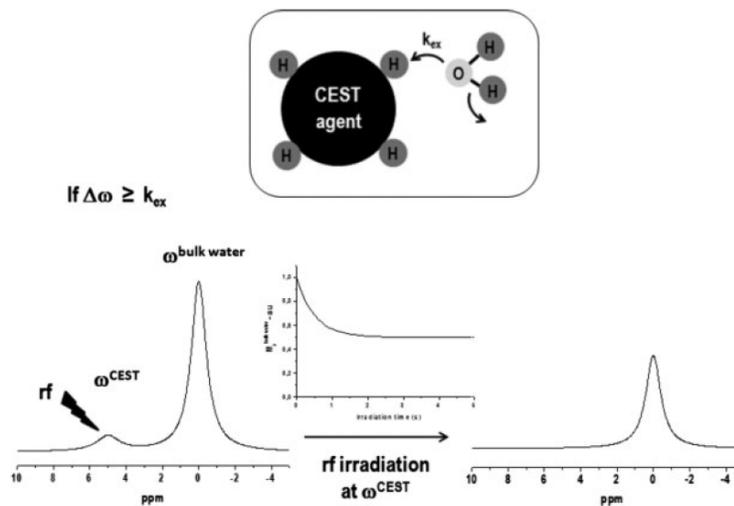


Figure 8 : Principe du transfert de saturation par l'intermédiaire de l'échange chimique de protons (rf = impulsion radio-fréquence de saturation du signal des protons liés à l'agent CEST) D'après [Terreno et al. 2009].

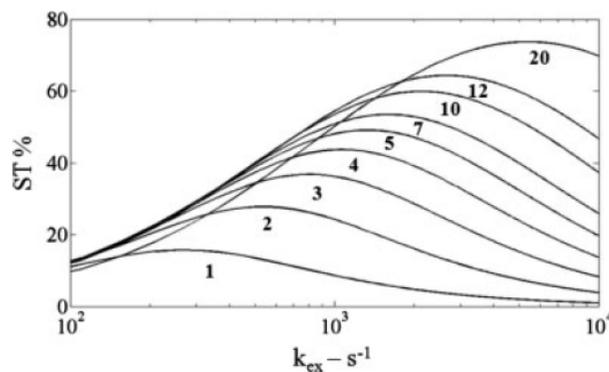


Figure 9 : Dépendance de l'efficacité CEST (ST%) à différentes valeurs d'impulsion radiofréquence B_1 (μT) en fonction de la constante d'échange k_{ex} des protons entre l'eau libre et le site de liaison à l'agent CEST ($B_0 = 300\text{Mhz}$, $\Delta\omega=50\text{ ppm}$). [Aime et al. 2006]

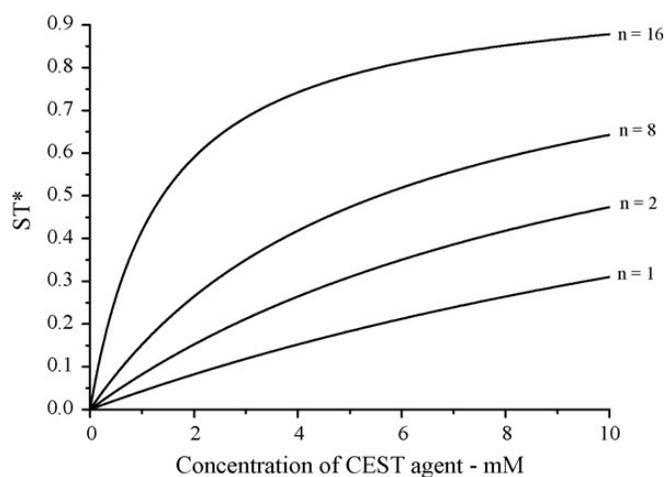


Figure 10 : Effet CEST (ST%) en fonction de la concentration en agent CEST possédant un nombre n de protons mobiles par unité [Delli Castelli 2008b].

A partir de ces éléments, le principe d'un agent LipoCEST est d'utiliser les molécules d'eau contenues dans le volume interne d'un liposome comme la source de protons échangeables pour le transfert d'aimantation, ce qui augmente considérablement le nombre de protons labiles par unité comparativement à un agent CEST classique. Pour cela, un composé paramagnétique capable de lier réversiblement une ou plusieurs molécules d'eau est encapsulé dans la cavité du liposome. Son rôle est d'induire une grande différence de fréquence de résonance entre les protons de l'eau interne au liposome et ceux appartenant à l'eau libre externe. Ce composé joue le rôle d'agent de déplacement chimique ou agent de shift (de l'anglais « *shift reagent* » SR). De plus, la cinétique d'échange entre eau liée et eau non liée doit être très rapide pour permettre d'induire le déplacement en fréquence à un maximum de molécules d'eau interne, avant qu'elles ne diffusent vers l'extérieur du liposome. Ainsi, dans des conditions optimales, un liposome de rayon interne 100 nm fournit un réservoir d'eau échangeable pour le transfert d'aimantation voisin de 10^9 molécules. Le transfert d'aimantation se fait alors depuis le réservoir intra-liposome vers le continuum aqueux externe à condition que la vitesse d'échange de l'eau, cette fois au travers de la membrane délimitant le liposome, soit lente à l'échelle de la RMN, autrement dit si la perméabilité de la bicouche lipidique formant le liposome est suffisamment faible. Les complexes de lanthanides et plus particulièrement de Tm(III) et de Dy(III) sont des agents de déplacement chimique parmi les plus efficaces [Aime et al 2006]. La Figure 11 résume le principe d'un agent LipoCEST.

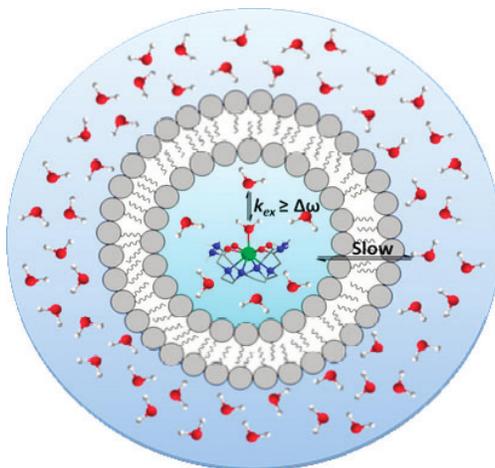


Figure 11: Schéma représentatif de la structure d'un agent LipoCEST [Viswanathan et al. 2009]. Ici, la constante d'échange d'eau sur le site du complexe servant d'agent de déplacement chimique doit être grande devant la différence de fréquence de résonance entre eau libre et eau liée pour permettre à toute l'eau interne du liposome d'être échangée avant de fuir. Par contre la constante d'échange eau interne/eau externe doit lui être inférieure pour permettre le transfert d'aimantation pendant la saturation du signal sous impulsion radiofréquence.

Le premier système apportant la preuve de concept LipoCEST a été étudié par le groupe de Sylvio Aime [Aime et al. 2005]. L'agent de déplacement chimique (agent de shift) utilisé était le [Tm(III)-DOTMA, H₂O], encapsulé dans des liposomes composés d'un mélange ternaire de deux phospholipides (la palmitoyloleoyl phosphatidylcholine POPC et le dipalmitoyl phosphatidylglycérol DPPG) et de cholestérol dans les proportions molaires POPC/DPPG/Cholestérol de 40:3,5:56,5 mol%. Le spectre de RMN du ¹H des liposomes encapsulant une solution de complexe à une concentration de 100 mM montre un signal décalé de 3,1 ppm par rapport à celui obtenu pour l'eau libre du continuum aqueux, pris comme référence à 0 ppm (Figure 12). Ce signal correspond aux protons des molécules d'eau interne au liposome et transitoirement liée à l'agent de shift. Le spectre CEST (Figure 12) confirme qu'après pré-saturation de l'aimantation des protons de l'eau interne, il y a bien transfert de saturation du signal et avec une efficacité de 40%. Cette efficacité dépend de la concentration en liposomes comme l'indique la Figure 13 qui par ailleurs met en évidence la grande sensibilité de l'agent LipoCEST puisqu'un effet CEST est encore mesuré pour une concentration de 90 pM en liposomes. Les images obtenues en IRM CEST confirment ce résultat montrant un hypo-signal à cette même concentration limite (Figure 13).

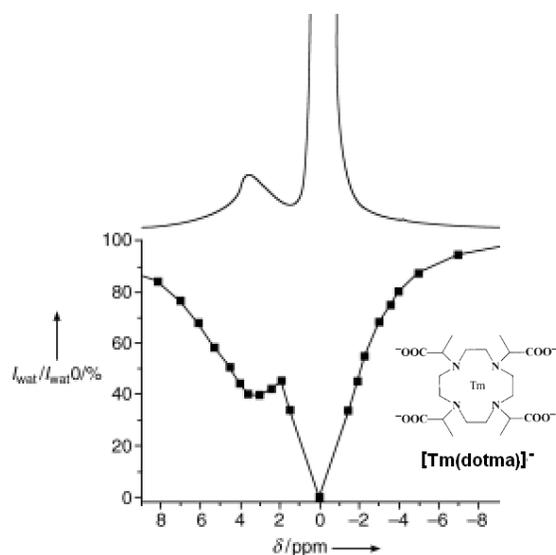


Figure 12 : Spectre RMN du ^1H (14,1 T ; 312 K) d'une préparation d'agent LipoCEST (2,88 nanomoles de liposomes) encapsulant le complexe $[\text{Tm(III)-DOTMA, H}_2\text{O}]^-$ (100 mM). Le signal à 3,1 ppm correspond aux protons de l'eau contenue dans les liposomes (référence protons de l'eau libre à 0 ppm). Le spectre CEST (en-dessous) (7 T, 312 K, $B_1 = 12 \mu\text{T}$) révèle une efficacité de signal de 40 % adapté de [Aime et al. 2005].

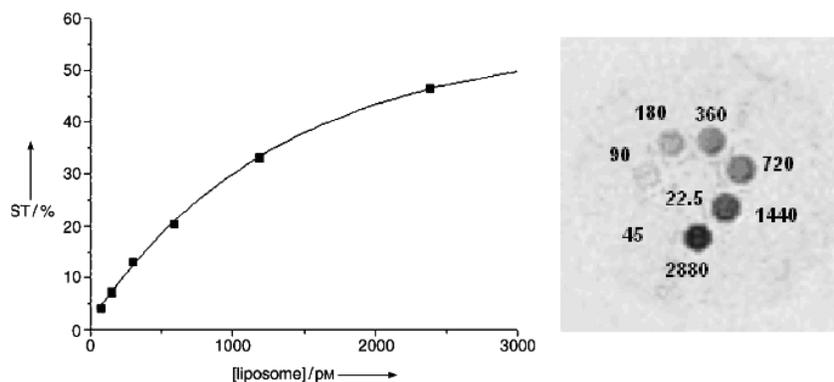


Figure 13 : Efficacité CEST (ST%) en fonction de la concentration en LipoCEST de $[\text{Tm(III)-DOTMA, H}_2\text{O}]^-$ (7 T ; 312 K ; $B_1 = 12 \mu\text{T}$) (à gauche). A droite Images IRM-CEST de fantômes (8 capillaires, à droite) contenant des dispersions des mêmes liposomes à différentes concentrations (de 22.5 à 2880 pM) (7 T ; 312 K, $B_1 = 12 \mu\text{T}$) adapté de [Aime et al. 2005].

Sur ce premier exemple, d'autres systèmes LipoCEST ont été mis au point à partir de complexes neutres de manière à pouvoir augmenter la quantité d'agent de shift encapsulée tout en respectant des conditions isotoniques (équivalentes à une osmolarité de 300 mOsm, soit 150 mM NaCl, conditions rencontrées pour le plasma sanguin) [Aime et al. 2006 ; Delli Castelli et al. 2008]. La membrane des liposomes était constituée de dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et de distéaroyl phosphatidyléthanolamine-poly(éthylène glycol) DSPE-PEG₂₀₀₀ (95 :5 % molaire) et trois complexes ont été comparés : $[\text{Gd(III)-HPDO3A}$,

H₂O], [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] et [Dy(III)-HPDO3A, H₂O]. Comme attendu, les complexes à base de Tm(III) et de Dy(III) sont des agents de shift convenables alors que celui à base de Gd(III) ne modifie pas la fréquence de résonance des protons de l'eau (Tableau 3).

Tableau 3 : Déplacements chimiques mesurés pour des agents LipoCEST (DPPC/DPSE-PEG 2000; 95.5 mol%) préparés en conditions iso-osmolaires et chargés en complexes neutres de Gd(III), Tm(III) ou Dy(III) associé au ligand HPDO3A (éq. 300 mOsm). Adapté de [Delli Castelli et al. 2008].

[Ln-HPDO3A, H ₂ O]	$\Delta\omega$ des protons de l'eau intra-liposome (ppm)
Dy (III)	- 4,0
Tm (III)	3,5
Gd (III)	0

On remarque que les variations de déplacement chimique obtenues dans le cas des LipoCEST de complexes de Tm(III) sont très voisines dans cette étude et la précédente bien que la concentration interne ait pu être multipliée par un facteur 2. Toujours avec l'idée d'accroître le déplacement chimique des protons échangés sans quitter les conditions iso-osmolaires compatible avec un milieu physiologique, la proportion d'agent de shift a été augmentée en incorporant un complexe de lanthanide hydrophobe (Figure 14) dans la membrane du liposome en plus du complexe hydrophile neutre présent dans le volume interne [Terreno et al. 2009]. Toutefois, bien que la concentration en Tm(III) ait été augmentée, aucun gain significatif n'a été obtenu.

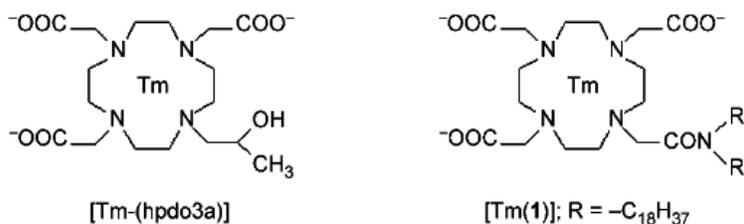


Figure 14: Structure chimique des complexes de Tm(III) incorporés dans des liposomes de DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀. Le complexe hydrophile à gauche est encapsulé dans la cavité interne des liposomes (éq 300 mOsm) alors que le complexe hydrophobe à droite est introduit dans la bicouche (20% molaire) [Terreno et al. 2009].

D'autres travaux sont arrivés aux mêmes conclusions expérimentales que les agents LipoCEST à base de complexes de Tm(III) ou de Dy(III), parmi les agents de shift les plus efficaces [], ne pouvaient conduire qu'à des écarts de fréquence de résonance entre protons liés et libres n'excédant pas en valeur absolue 4 ppm, même en conditions légèrement hyperosmotiques [Terreno et al. 2007]. Cette limite sur laquelle nous allons revenir plus loin dans ce chapitre, est une difficulté importante vis-à-vis de la réalisation d'images IRM CEST *in vivo* car un certain nombre de molécules biologiques sont des agents DiaCEST shiftant l'eau des tissus autour de 3 ppm (cf chapitre III).

A côté des tentatives pour améliorer le déplacement chimique, des études ont porté sur l'efficacité CEST. Cette fois c'est la modulation de la cinétique d'échange de l'eau de part et d'autre de la membrane des liposomes qui a été examinée pour ajuster la constante d'échange membranaire. Ainsi, la perméabilité à l'eau de la bicouche lipidique a été diminuée par insertion de cholestérol [Aime et al. 2005 & 2006]. Les résultats reportés Figure 15 montrent en effet le bénéfice apporté à concentration équivalente en liposomes.

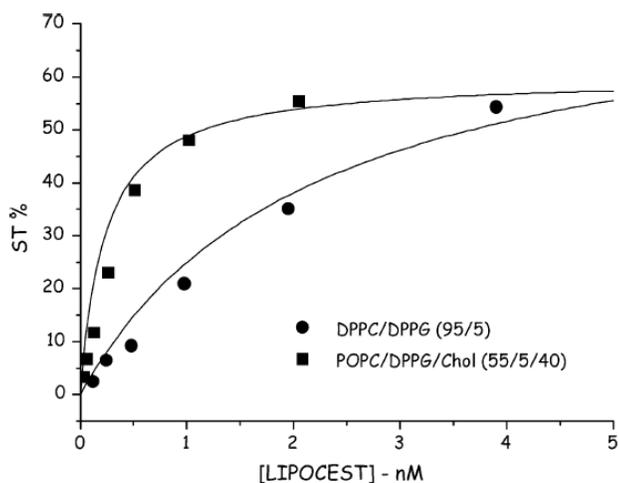


Figure 15: Effet CEST (ST%, 7 T ; 39°C) d'agents LipoCEST en fonction de la concentration en liposomes et de la composition montrant une meilleure efficacité pour une membrane contenant du cholestérol [Aime et al. 2005 & 2006].

Le diamètre des agents LipoCEST influence également l'effet CEST qui augmente quand la taille des liposomes diminue [Zhao et al. 2008]. Ce comportement peut s'expliquer à l'aide de l'équation [6] introduite plus haut exprimant la perméabilité P en fonction du rapport volume V_B sur surface A des liposomes et du temps de résidence de l'eau dans la cavité interne τ_B :

$$P = V_B/A\tau_B, \text{ soit } \tau_B = P/r \text{ (r rayon des liposomes).}$$

Ainsi, à membrane constante (perméabilité égale), le temps d'échange d'eau et donc l'effet CEST est d'autant plus grand que le rayon du liposome est petit. Ceci s'ajoute au fait que la perméabilité intrinsèque des liposomes est plus importante pour un rapport surface/volume important, donc un rayon plus faible. Ceci a été vérifié sur des agents LipoCEST de composition de membrane PC/cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ et chargés de [Tm(III)-DOTA, H₂O] à 200mM (Figure 14).

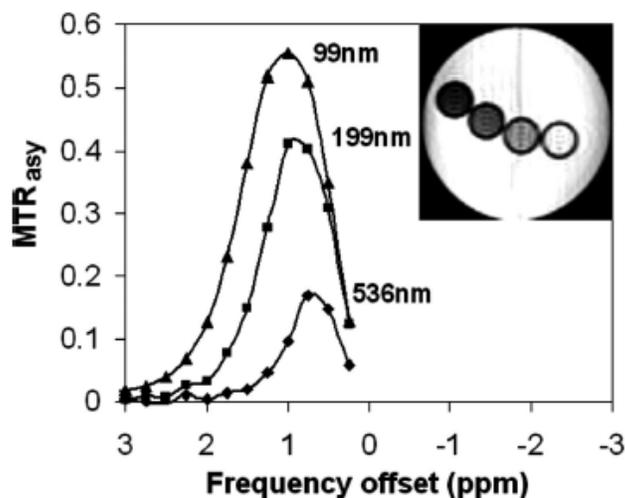


Figure 14: Spectres CEST et images IRM CEST de trois agents LipoCEST (PC/cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 200mM [Tm(III)-DOTA, H₂O]), préparés par extrusion séquentielle et de diamètres moyens différents. Les images IRM CEST présentées dans l'inset correspondent de droite à gauche, au milieu aqueux témoin (sans liposomes), et aux liposomes de 536, 199 et 99 nm [Zhao et al. 2008].

IV-3. Agents LipoCEST non sphériques

Principe

Les premières études évoquées ci-dessus placent les liposomes parmi les systèmes les plus intéressants pour l'IRM CEST, en raison de leur sensibilité. Néanmoins, si le choix de la membrane des liposomes, compatible avec un échange d'eau suffisamment lent ($k_{ex} \leq \Delta\omega$) peut être relativement bien affiné, la différence de déplacement chimique, proche de 4 ppm (soit du même ordre de grandeur que celle observée avec des agents DiaCEST), entre les protons de l'eau intra-cavité et ceux de l'eau du continuum aqueux externe obtenue avec les premiers agents LipoCEST classiques [Terreno et al. 2007] présente un inconvénient majeur pour une utilisation *in vivo*. En effet, la discrimination entre le contraste apporté par les liposomes et le contraste inhérent aux agents CEST endogènes, notamment les protéines (cf Chapitre III), devient difficile.

L'origine de la différence de déplacement chimique des protons de l'eau interne aux liposomes induite par l'agent de shift encapsulé (notée $\Delta\omega_{\text{intra-lipo}}$) résulte de deux contributions : (1) l'interaction chimique par laquelle une molécule d'eau se lie réversiblement au cation lanthanide ou centre paramagnétique du complexe (déplacement chimique de pseudo-contact ou de contribution hyperfine, noté $\Delta\omega_{\text{hyp}}$) ; (2) le changement de susceptibilité magnétique ou effet BMS (de l'anglais « *bulk magnetic susceptibility* ») dû à la séquestration du composé paramagnétique à l'intérieur des liposomes (contribution $\Delta\omega_{\text{BMS}}$) [Terreno et al. 2007 ; Terreno et al 2008a ; Terreno et al 2008b ; Delli Castelli et al. 2008a]. Ainsi :

$$\Delta\omega_{\text{intra-lipo}} = \omega_{\text{intra-lipo}} - \omega_{\text{eau libre}} = \Delta\omega_{\text{hyp}} + \Delta\omega_{\text{BMS}} \quad [7]$$

La contribution $\Delta\omega_{\text{hyp}}$ dépend de l'efficacité de l'agent de déplacement chimique pondérée par sa concentration au sein de la cavité intra-liposome. Or pour assurer la compatibilité des liposomes avec les milieux biologiques, cette concentration doit respecter l'isotonie c'est-à-dire une pression osmotique interne des liposomes équivalente à 300 mM d'espèces chimiques unitaires (300 mOsm). Dans le cas des complexes de Tm(III) étudiés qui possèdent un site de coordination à échange rapide pour une seule molécule d'eau, il a été estimé que Δ_{hyp} ne pouvait être supérieure à 4 ppm [Aime et al 2006 ; Terreno et al 2008a].

La contribution $\Delta\omega_{\text{BMS}}$ découle de la réorientation partielle des moments magnétiques relatifs à l'agent de déplacement chimique paramagnétique lorsqu'il est soumis au champ magnétique uniforme B_0 . Cette contribution, également proportionnelle à la concentration d'agent encapsulé, est négligeable pour un liposome sphérique mais peut être considérablement augmentée lorsque la géométrie du compartiment intra-liposome est modifiée [Terreno et al. 2007].

Les stratégies ont donc été élaborées de manière à augmenter l'une ou l'autre de ces contributions et améliorer ainsi l'effet de déplacement chimique apporté par les agents LipoCEST. Globalement on distingue la modification de la forme des liposomes et l'augmentation du nombre de centres paramagnétiques par agent de shift. Parallèlement, l'avantage de la structure vésiculaire des liposomes de pouvoir encapsuler plusieurs substances, en particulier simultanément dans leur enveloppe hydrophobe et dans leur volume aqueux interne a été exploité pour envisager une imagerie multi-détection. Enfin, certains travaux concernent des tentatives de ciblage spécifique.

L'amélioration de l'effet de shift en utilisant des liposomes de géométrie non sphérique a été mise en évidence en faisant subir un stress hyper-osmotique à des systèmes LipoCEST qui entraîne une diminution de leur volume interne à membrane constante et donc une perte de sphéricité. Plus le liposome est déformé, plus la contribution de susceptibilité magnétique est importante ce qui conduit à une augmentation impressionnante du déplacement chimique mesuré par rapport à des liposomes sphériques (Figure 15) [Terreno et al. 2009].

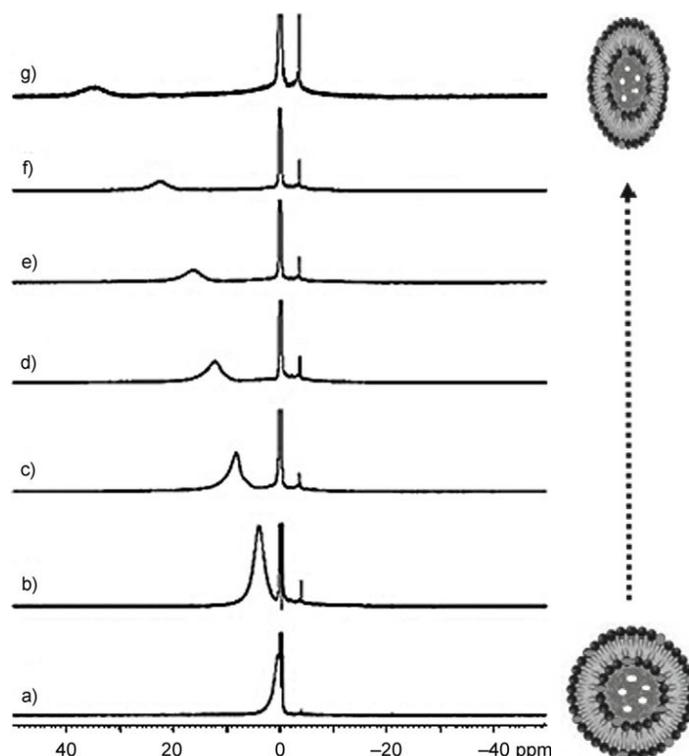
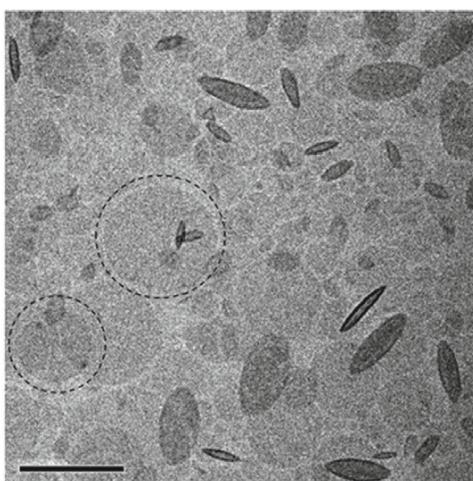


Figure 15: Spectres RMN du ^1H (14 T ; 25°C) de liposomes encapsulant 40 mM (40mOsm) de complexe neutre [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] en milieu tamponné (pH 7,4) et placés dans des conditions osmotiques différentes [a) 40, b) 80, c) 110, d) 160, e) 230, f) 300, et g) 600 mOsm] [Aime et al. 2009 ; Terreno et al. 2009].

Comme dans l'exemple précédent (Figure 15), des liposomes de géométrie non sphérique peuvent être préparés grâce à un stress osmotique en régime hyper-osmotique [Boroske et al. 1981; Benachir et Lafleur 1996; Menager et al. 2002]. Le groupe de Sylvio Aime a pour habitude d'hydrater un film lipidique de composition donnée avec une solution aqueuse contenant l'agent de déplacement chimique (complexe de Ln(III)) à une concentration hypo-osmotique (ex : 40-65 mOsm) par rapport à l'osmolarité finale du milieu (typiquement limitée à 300mOsm si l'on respecte des conditions compatibles avec une utilisation *in vivo*). La phase

lamellaire hydratée est ensuite extrudée plusieurs fois à travers des filtres de polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 200 nm. Les liposomes unilamellaires ainsi obtenus sont ensuite dialysés contre une solution hyper-osmotique par rapport à l'intérieur du liposome. Cette méthode a été reprise par d'autres équipes [Delli Castelli et al. 2008a; Burdinski et al. 2010; Langereis et al. 2009]. La Figure 16 montre une image de microscopie électronique par cryo-transmission (Cryo-MET) d'agents LipoCEST sous stress hyper-osmotique [Terreno et al. 2009].



200 nm

Figure 16 : Image Cryo-MET montrant des liposomes sous stress osmotique encapsulant 40 mM de complexe [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] [Terreno et al. 2009].

L'effet BMS a également été montré sur une série de liposomes chargés de la même concentration de complexes du ligand HPDO3A avec différents centres lanthanide (Gd(III), Dy(III) et Tm (III)) [Delli Castelli et al. 2008a]. Il est intéressant de noter l'augmentation importante de la valeur de $\Delta\omega_{\text{intralipo}}$ lorsque les liposomes sont déformés par le stress osmotique. En particulier la contribution de la susceptibilité magnétique (effet BMS) est bien mise en évidence dans le cas du complexe de Gd(III). Dans le cas du dysprosium, à nouveau l'effet BMS l'emporte puisque la variation de shift induite est non seulement conséquente mais devient positive traduisant l'alignement majoritaire des liposomes parallèlement au champ magnétique appliqué B_0 .

Tableau 4: Valeurs des déplacements chimiques des protons de l'eau mesurés pour des agents LipoCEST (DPPC/DPSE-PEG 2000; 95 5 mol%) sphériques et non sphériques chargés en complexe Gd(III), Dy(III) ou Tm (III) [Delli Castelli et al. 2008a].

[Ln(III)-HPDO3A] nature du cation	$\Delta\omega_{\text{intra}}(\text{ppm})$ liposomes en régime iso- osmotique	$\Delta\omega_{\text{intra}}(\text{ppm})$ liposomes soumis à un régime hyper-osmotique
Dy (III)	- 4,0	14,1
Tm (III)	3,5	10
Gd (III)	0	7,2

Langereis et ses collaborateurs ont étudié le premier agent LipoCEST non sphérique sensible à la température. Il s'agit d'un double agent de contraste à la fois fluoré ($^{19}\text{F-NH}_4\text{PF}_6$) et paramagnétique par encapsulation de [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] [Langereis et al. 2009]. La membrane des liposomes est composée de monopalmitoyl phosphatidylcholine (MPPC), de dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et de DPPE-PEG₂₀₀₀ (10:90:4 mol%) et présente une température de fusion des chaînes lipidiques dans l'intervalle 39-42°C. Cette propriété permet un saut de perméabilité des liposomes par élévation de température. Deux fréquences de résonance distinctes ont été observées pour les protons de l'eau interne, l'une de +11ppm et l'autre de -17ppm par rapport à l'eau libre (Figure 17). Ceci est probablement le reflet de deux orientations possibles des liposomes par rapport au champ magnétique. A 42°C, température de perméabilisation des liposomes, ces derniers fuient, libérant le matériel encapsulé ce qui entraîne la perte de l'effet CEST (Figure 17). Simultanément, les molécules fluorées sont libérées et leur signal en RMN du ^{19}F , initialement très large par effet de confinement devient plus fin et plus intense et donc exploitable en imagerie du fluor (Figure 18). D'un autre point de vue, ce type de système pourrait être envisagé pour la délivrance programmée de médicaments assistée par imagerie CEST, en remplaçant le produit fluoré par une substance active.

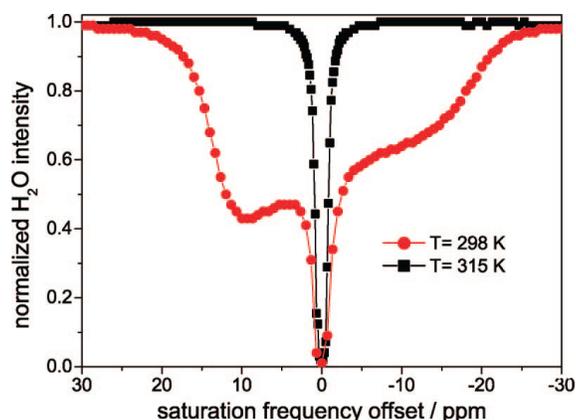


Figure 17: Spectre CEST (7 T; B₁ = 4.5 µT) de liposomes contenant le complexe [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] et du $^{19}\text{F-NH}_4\text{PF}_6$ à 25°C (courbe rouge) et 42°C (courbe noire) [Langereis et al. 2009].

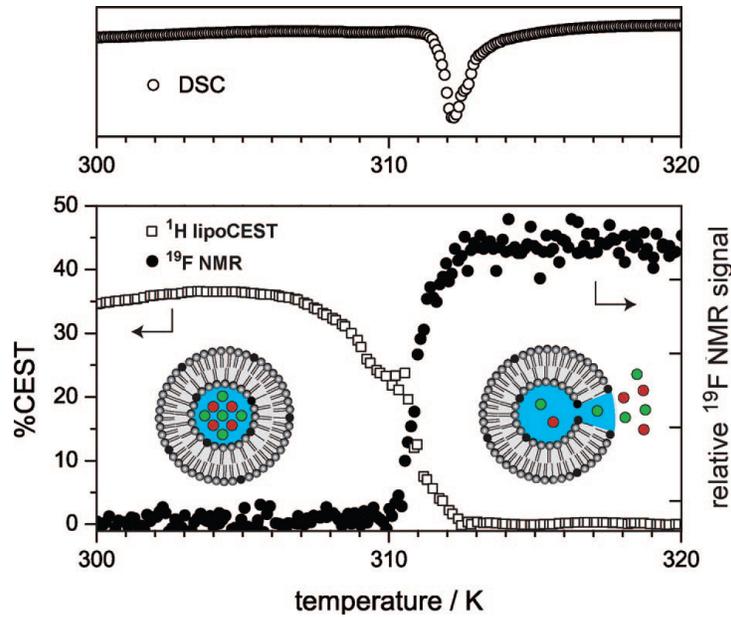


Figure 18: Caractérisation du même agent LipoCEST fluoré que celui présenté Figure 17. En haut, le profil DSC indique la température de fusion de la membrane lipidique. En dessous : effet CEST (7 T ; $B_1 = 4.5 \mu\text{T}$) et intensité du signal RMN du ^{19}F en fonction de la température. [Langereis et al. 2009].

Certains nanosystèmes lipidiques tels que bicelles et nanotubes ont démontré des propriétés magnétiques particulières qui leur permettent d'être orientés dans un champ magnétique [Karp et al. 2006; Prosser et al. 2006]. La force motrice de ce phénomène est l'interaction entre l'anisotropie du tenseur de susceptibilité magnétique de la particule ($\Delta\chi$) et le champ magnétique appliqué [Prosser et Shyianovskaya, 2001], l'orientation ne pouvant se produire que lorsque la forme des particules n'est pas isotrope. Les systèmes phospholipidiques s'orientent en fonction du signe de $\Delta\chi$, généralement négatif pour des liposomes diamagnétiques non sphériques de sorte que l'orientation est parallèle au champ appliqué. Cette orientation peut être basculée de 90° en incorporant dans la membrane des liposomes des espèces diamagnétiques ou paramagnétiques qui modifient le signe de $\Delta\chi$ (Figure 19). Ainsi des composés amphiphiles diamagnétiques [Park et al, 2008] ou des complexes hydrophobes à base de lanthanide [Crowell et Macdonald 2001; Marcotte et al. 2006; Prosser et al. 1999] ayant une anisotropie magnétique positive ont été incorporés dans les bicouches de liposomes. L'ajout de complexe de lanthanide dans la membrane des lipoCEST, en plus de permettre le choix de l'orientation du lipoCEST non sphérique, permet également d'augmenter la valeur du déplacement chimique $\Delta\omega_{\text{intralipo}}$ en augmentant la concentration en complexe, tout en conservant la forme non sphérique.

En effet, le complexe étant à l'interface entre eau interne et eau externe, il paraît logique qu'il ne participe pas à la différence de pression osmotique entre les deux milieux [Terreno et al. 2009].

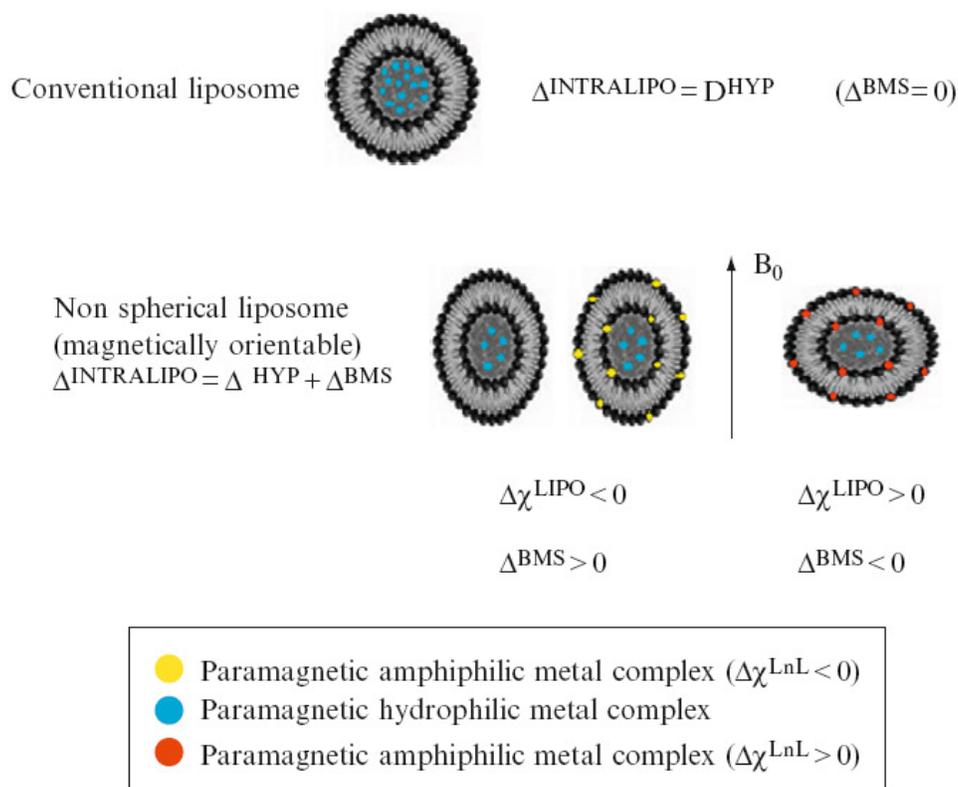
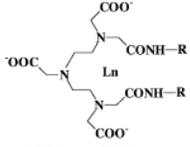
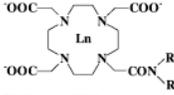
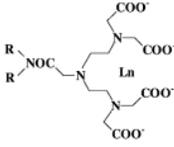
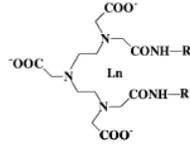
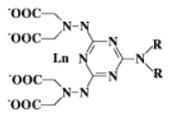


Figure 19: Corrélations entre les paramètres physico-chimiques impliqués dans l'orientation magnétique et le déplacement chimique des protons de l'eau intra-liposome pour des liposomes de type LipoCEST [Aime et al. 2009].

Expérimentalement, l'incorporation de complexes de lanthanide amphiphiles dans la membrane de liposomes non sphériques a été réalisée et l'orientation des vésicules, parallèlement ou perpendiculairement au champ magnétique appliqué, a pu être montrée selon la valeur (positive ou négative) de $\Delta\chi$ [Delli Castelli et al. 2008]. En théorie, une orientation parallèle au champ doit conduire à un déplacement en fréquence ($\Delta\omega_{\text{BMS}}$) des protons de l'eau interne positif par rapport à l'eau libre de référence, alors qu'une orientation perpendiculaire au champ doit entraîner un déplacement négatif. Cette prédiction n'a pas toujours été vérifiée sur différents exemples de complexes de Tm(III), Dy(III) ou de Gd(III) ayant respectivement des valeurs de $\Delta\chi$ positive, négative ou nulle et devant conduire à une orientation respectivement parallèle, perpendiculaire ou parallèle (effet propre lié aux phospholipides eux-mêmes) [Aime et al. 2006], donc à un $\Delta\omega_{\text{BMS}}$ positif, négatif ou positif.

Le Tableau 5 rend compte de ces observations. Il semble donc que l'orientation du liposome non sphérique dépend aussi de la structure moléculaire du complexe et de la configuration du ligand (à chaîne ouverte ou macrocyclique) et du choix des chaînes latérales hydrophobes. De manière à contrôler l'orientation des liposomes dans le champ magnétique, des systèmes LipoCEST ont été synthétisés en fixant à la surface des liposomes des unités d'encrage spécifique. Un exemple concerne des liposomes chargés en [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] et incorporant un complexe amphiphile de Dy(III) ou de Tm(III) dans la membrane (Figure 20) [Burdinski et al. 2010]. Le couple β -cyclodextrine/adamantane a été utilisé pour fixer les liposomes conjugués en surface à des molécules d'adamantane sur un support (capillaire en verre ayant des molécules de cyclodextrine greffées sur leur paroi) pré-orienté parallèlement à la direction du champ magnétique appliqué (Figure 21). Ainsi, les liposomes fixés à la paroi sont alignés parallèlement au champ quel que soit le signe de $\Delta\chi$ alors que les liposomes libres s'alignent selon le signe de $\Delta\chi$ global qui résulte de la combinaison de l'apport du complexe hydrophile et du complexe hydrophobe et qui dépend de la structure des complexes amphiphiles et de leur mode d'insertion dans la membrane des liposomes. Ainsi, pour les liposomes avec Tm(III) dans la cavité aqueuse et Dy(III) dans la membrane, une orientation parallèle aux liposomes fixés a été observée et pour les liposomes avec Dy(III) dans la cavité aqueuse et Tm(III) dans la membrane, l'orientation était perpendiculaire. Ce double comportement présente une incidence notable sur l'effet CEST résultant (Figure 22).

Tableau 5 : valeurs mesurées de $\Delta\omega_{\text{intra-lipo}}$ (14,1T ; 298K) pour des agents LipoCEST non sphériques encapsulant un complexe hydrosoluble [Ln(III)-HPDO3A,H₂O] et incorporant un complexe lipophile dans leur membrane dont le centre est de même nature [adapté de Delli Castelli et al. 2008].

Complexe amphiphile incorporé dans la membrane	Centre lanthanide	$\Delta\omega_{\text{intra-lipo}}$ (ppm)
 R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Gd(III)	+5
	Dy(III)	+15,7
	Tm(III)	-18,3
 R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Gd(III)	+13,9
	Dy(III)	-45,0
	Tm(III)	+19,0
 R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Tm(III)	+12,0
 R' = (CH ₂) ₁₈ CH ₃	Tm(III)	-31,0
 R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Tm(III)	+10,5

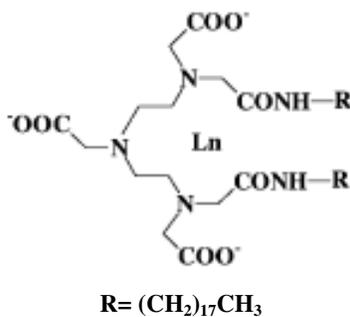


Figure 20: complexe amphiphile de Ln (III), Dy(III) ou Tm(III), incorporé dans la membrane de liposomes par [Delli Castelli et al. 2008].

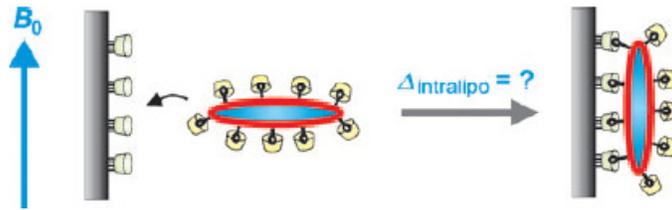


Figure 21 : Orientation contrôlée de liposomes agents LipoCEST parallèlement au champ magnétique externe B_0 par fixation sur une surface cible [Burdinski et al. 2010].

Ceci a une incidence sur les Z-spectra acquis :

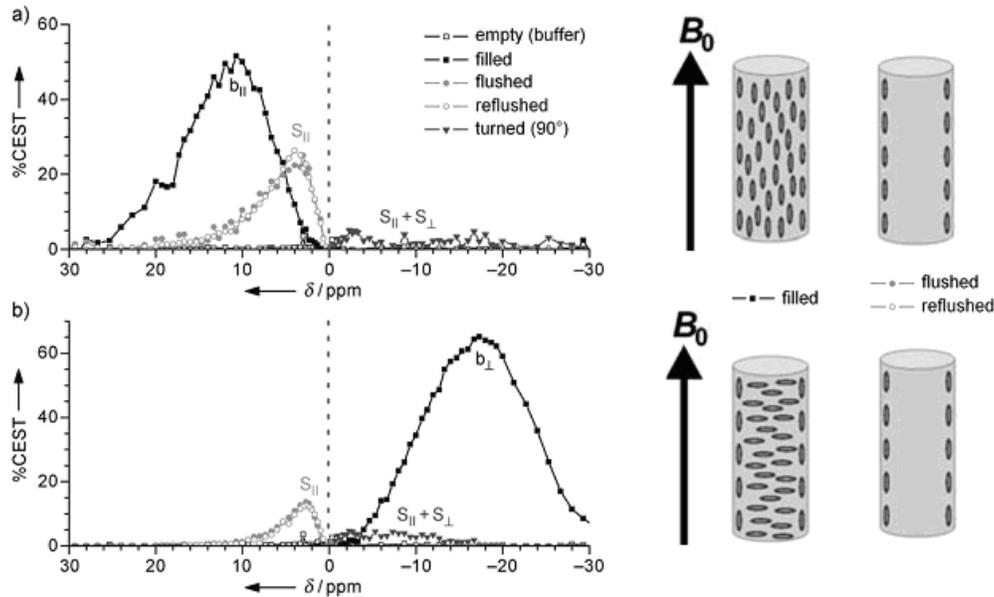


Figure 22: Spectres CEST de 2 formulations de liposomes : (a) LipoCEST contenant du [Tm(III)-HPDO3A, H₂O] dans la cavité aqueuse et du complexe amphiphile de Dy(III) dans la membrane (Figure 20); (b) LipoCEST contenant du [Dy(III)-HPDO3A, H₂O] dans la cavité aqueuse et du complexe amphiphile de Tm(III) dans la membrane (Figure 20); Les capillaires sont orientés parallèlement à B_0 et remplis de la préparation de lipoCEST, rincés deux fois puis inclinés à 90°. A chacune de ces étapes, des spectres CEST ont été effectués [adapté de Burdinski et al. 2010].

L'effet CEST maximal est obtenu à un shift en fréquence positif ou négatif en accord avec l'orientation majoritaire des liposomes. Cette étude met en évidence la possibilité de collecter différents types d'informations lors de futures applications *in vivo* lorsque les agents LipoCEST interagissent avec les membranes cellulaires, les parois de vaisseaux sanguins ou des nerfs. Selon l'intensité du signal, l'orientation de la surface ciblée dans le champ magnétique appliqué lors de l'IRM, pourrait être estimée. Egalement, selon l'effet de shift, il serait possible de savoir s'il y a stagnation de l'agent de contraste (dans le cas de thrombose par exemple) ou s'il circule librement.

Toujours dans la perspective d'augmenter davantage la variation de déplacement chimique et l'effet CEST, des systèmes LipoCEST non sphériques ont été proposés (Figure 23), qui contiennent des complexes de lanthanide amphiphiles incorporés dans la membrane et encapsulant dans la cavité interne des complexes de lanthanide solubles mais à plusieurs centres paramagnétiques [Terreno et al. 2008a]. Cette stratégie vise à augmenter la concentration de l'agent de déplacement chimique intra-liposome pour augmenter la contribution $\Delta\omega_{\text{hyp}}$. L'effet CEST s'est également vu augmentée au cours de ces expériences.

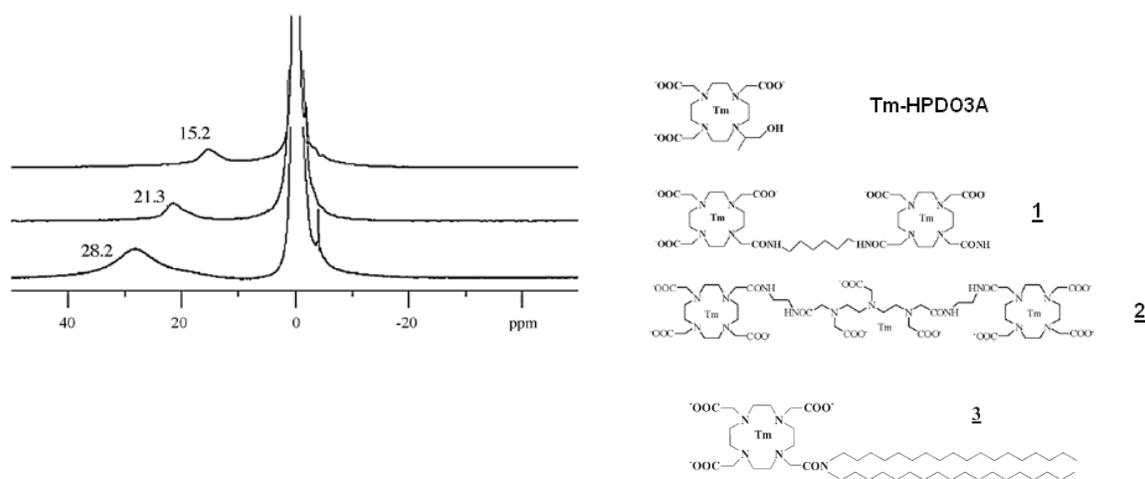


Figure 23: Structures chimiques des différents complexes de Tm (III) utilisés pour améliorer les performances d'agents LipoCEST par [Terreno et al. 2008a]. Spectre RMN du ^1H (14,1T ; 298 K) montrant l'effet de shift résultant selon la structure du complexe hydrophile encapsulé. Dans tous les cas, le complexe amphiphile 3 a été inséré dans la membrane des liposomes de composition DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀/complexe Tm 3 75:5:20 mol %

Contrairement aux études physico-chimiques visant à comprendre et améliorer les capacités des agents LipoCEST, peu de travaux existent dans des conditions *in vivo*.

L'une des rares tentatives concerne la comparaison d'images IRM-CEST obtenues après injection soit sous cutanée, soit intramusculaire chez la souris de liposomes sphériques ou non sphériques présentant des orientations différentes par rapport au champ magnétique appliqué [Terreno et al. 2008b]. Les résultats présentés Figure 24 montrent que les liposomes non sphériques s'orientent *in vivo* et par conséquent répondent sélectivement aux conditions d'acquisition.

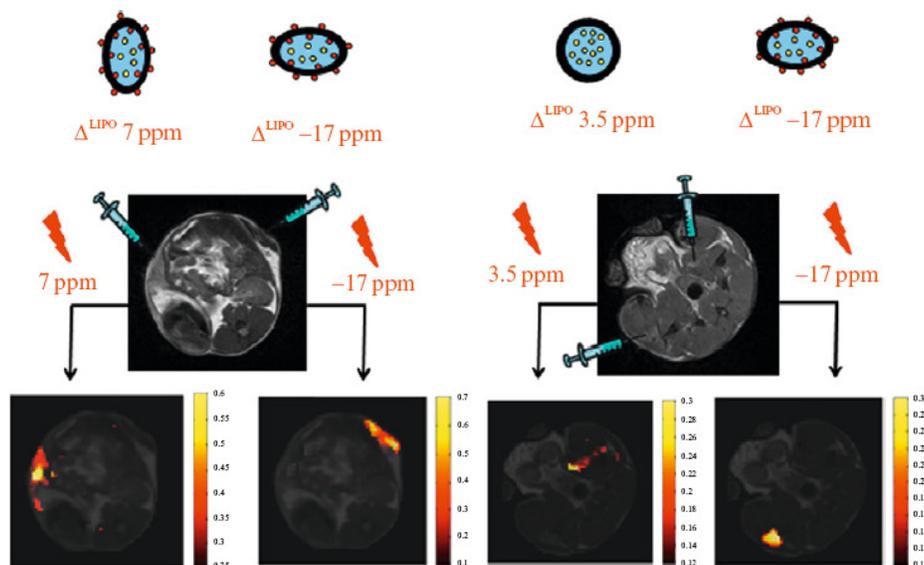


Figure24: image IRM CEST *in vivo* de souris (en bas, 37°C, 7T, $B_1 = 6\mu T$) ayant été injectées soit par voie sous-cutanée (à gauche) soit par voie intramusculaire (à droite) avec des agents lipoCEST non sphériques mais d'orientations différentes selon le champ magnétique appliqué (à gauche) ou d'agents lipoCEST sphériques ou non sphériques (à droite). Les images présentées en haut de la figure correspondent à des séquences de relaxivité en pondération T_2 acquises juste après injection [Aime et al. 2009].

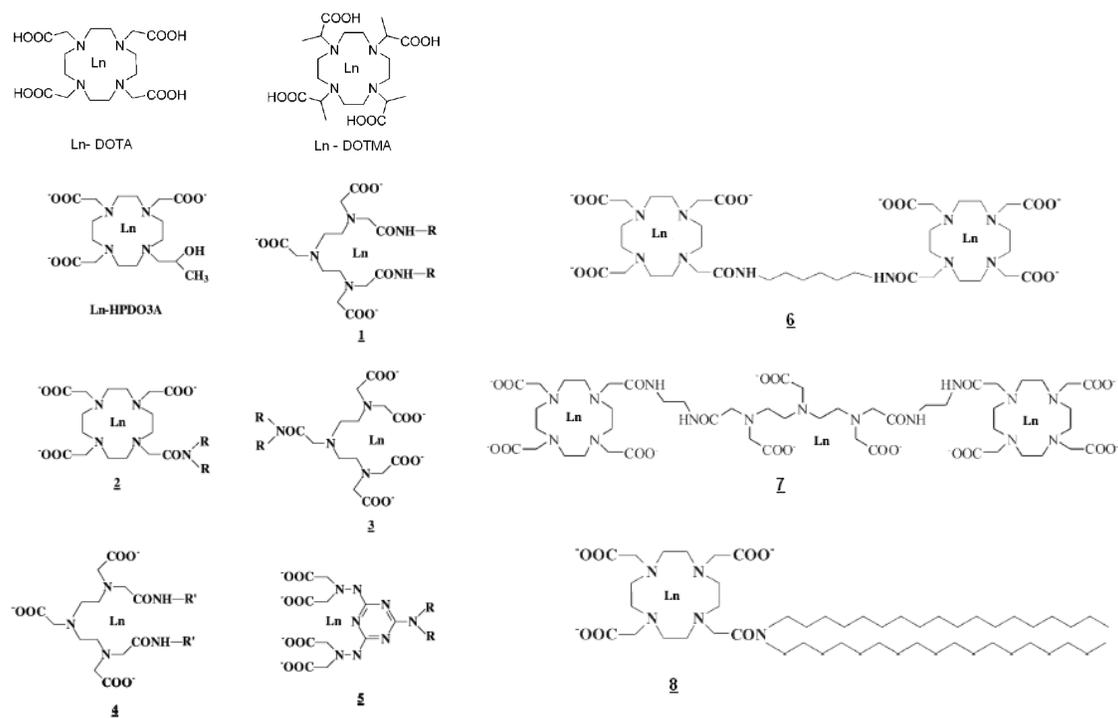
Le Tableau 6 récapitule les différents systèmes LipoCEST étudiés jusqu'à présent et la Figure 25 les structures des complexes utilisés.

Tableau 6 : Récapitulatif des différents agents LipoCEST étudiés et décrits dans la littérature depuis leur première mise au point en 2005

géométrie	composition de la membrane	Diamètre (nm)	Effet CEST (ST%)	complexe de Ln (mM)	Impulsion radiofréquence B_1 (B_0)	$\Delta\omega_{\text{intra lipo}}$ (ppm)	Ref
sphérique	POPC/DPPG/cholestérol 40 :3,5 :46,5 mol%	270+/-2,5 (PdI 32)	35	Tm(III)- DOTMA 19mM	12 μ T (7T)	3.2	[Aime et al. 2005]
sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol %	200nm	-	Tm(III)-6 25mM	-	6.1	[Terreno et al. 2008a]
sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol %	130 à 150	-	Tm(III)- HPDO3A 40mM	-	3.5	[Delli Castelli et al. 2008]
sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol %	130 à 150	-	Gd(III)- HPDO3A 40mM	-	0	[Delli Castelli et al. 2008]
sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol %	130 à 150	-	Dy(III)- HPDO3A 40mM	-	-4.0	[Delli Castelli et al. 2008]
Sphérique	DPPC/DSPE PEG ₂₀₀₀ 95 :5 mol %	200	-	Dy(III)- HPDO3A	6 μ T (7T)	-3	[Terreno et al. 2007]
Sphérique	PC/chol/DSPE- PEG ₂₀₀₀ /Rhodamine-PE 48,25/48,25/3/0,5 mol%	99	55	Tm(III)- DOTA 200mM	1,8 μ T (11,7T)	1	[Zhao et al. 2008]
Sphérique	PC/chol/DSPE- PEG ₂₀₀₀ /Rhodamine-PE 48,25/48,25/3/0,5 mol%	199	42	Tm(III)- DOTA 200mM	1,8 μ T (11,7T)	0.9	[Zhao et al. 2008]
Sphérique	PC/chol/DSPE- PEG ₂₀₀₀ /Rhodamine-PE 48,25/48,25/3/0,5 mol%	536	15	Tm(III)- DOTA 200mM	1,8 μ T (11,7T)	0.7	[Zhao et al. 2008]
Sphérique (hyperosmotique 350mOsm)	DPPC/DSPE PEG ₂₀₀₀ 95 :5 mol %	200	-	Tm(III)- HPDO3A ?	6 μ T (7T)	4	[Terreno et al. 2007]
Sphérique (hyperosmotique 350mOsm)	DPPC/DSPE PEG ₂₀₀₀ 95 :5 mol %	200	-	Dy(III)- HPDO3A -	6 μ T (7T)	-4	[Terreno et al. 2007]
Sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC / Tm-8/ DSPE- PEG ₂₀₀₀ 75:20 (40mM):5 mol%	-	-	Tm(III)- HPDO3A 40mM	6 μ T (7T)	3	[Terreno et al. 2009]

géométrie	composition de la membrane	Diamètre (nm)	Effet CEST (ST%)	complexe de Ln (mM)	Impulsion radiofréquence B ₁	$\Delta\omega_{\text{intra}}(\text{ppm})$	Ref
non sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95/5 mol %	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A (40mM)	-	10	[Delli Castelli et al. 2008]
non sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95/5 mol %	130-150	-	Gd(III)-HPDO3A (40mM)	-	7.2	[Delli Castelli et al. 2008]
non sphérique	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95/5 mol %	130-150	-	Dy(III)-HPDO3A (40mM)	-	14.1	[Delli Castelli et al. 2008]
non sphérique	MPPC/DPPC/DPPE-PEG ₂₀₀₀ 10:90:4 mol%	100	40	Tm(III)-HPDO3A (65 mM)	4,5 μ T (7T)	11	Langereis et al 2008
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DSPC/POPC /DSPE/Dy-1 40/20/20/20 mol%	200	65	Tm(III)-HPDO3A (65 mM)	-	11	Burdinski et al ; 2010
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DSPC:POPC :DSPE/ Tm - 1 40/20/20/20 mol%	200	55	Tm(III)-HPDO3A (65 mM)	-	-19	Burdinski et al ; 2010
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-1 -	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A 40mM	-	-18.3	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Dy-1 -	130-150	-	Dy(III)-HPDO3A 40mM	-	15.7	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Gd-1 -	130-150	-	Gd(III)-HPDO3A 40mM	-	5.0	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-2 -	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A 40mM	-	19.0	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Dy-2 -	130-150	-	Dy(III)-HPDO3A 40mM	-	-45	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Gd-2 -	130-150	-	Gd(III)-HPDO3A 40mM	-	13.9	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-3 -	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A 40mM	-	12.0	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-4 -	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A 40mM	-	-31.0	[Delli Castelli et al. 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-5 -	130-150	-	Tm(III)-HPDO3A 40mM	-	10.5	[Delli Castelli et al.

							2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ / Tm-8 75:5:20 mol %	-	-	Tm(III)- HPDO3A	-	18	[Terreno et al2007]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ / Dy-8 75:5:20 mol %	-	-	Dy(III)- HPDO3A	-	-45	[Terreno et al2007]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-8 75:5:20 mol %	-	-	Tm(III)- HPDO3A	-	15.2	[Terreno et al 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-8 75:5:20 mol %	-	-	Tm(III)-6	-	21.3	[Terreno et al 2008]
Non sphérique + complexe Ln lipophile	DPPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Tm-8 75:5:20 mol %	-	-	Tm(III)-7	-	28.2	[Terreno et al 2008]



R = (CH₂)₁₇CH₃
R' = (CH₂)₁₈CH₃

Figure25: Récapitulatif des structures chimiques des différents complexes de Ln (III) utilisés pour la conception d'agents LipoCEST, soit encapsulés dans le compartiment aqueux interne des liposomes (Ln-HPDO3A, Ln-DOTA, Ln-DOTMA et 6), soit incorporés dans la membrane lipidique (1-5,8). [adapté de Delli Castelli et al. 2008 ; Terreno et al. 2008]

PARTIE II : Méthodologie

Les liposomes lipoCEST étant constitués d'une membrane lipidique encapsulant des agents de déplacement chimique, il est possible de moduler la membrane afin de la rendre plus ou moins perméable, mais aussi de moduler l'agent de déplacement chimique afin de le rendre plus efficace. Ceci implique l'utilisation de différentes techniques de synthèse mais aussi la mise au point de procédures de préparation adaptées. Les propriétés des systèmes sont évaluées à la fois par rapport à la structure vésiculaire et par rapport à la réponse magnétique. Cette partie recense l'ensemble des matériaux employés et précise notre approche méthodologique tant d'un point de vue des aspects pratiques et expérimentaux que de certains outils théoriques.

I. Matières premières

I-1. Les lipides

Les lipides proviennent des laboratoires Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) sous la forme de solutions dans du chloroforme, à l'exception du cholestérol fourni en poudre par les laboratoires Sigma (Saint Louis MO). Pour la préparation des films de lipides, ces derniers ont été repris dans des volumes définis de chloroforme ou de mélange chloroforme/méthanol (50 :50 v/v) lorsque la composition lipidique contenait du cholestérol.

➤ **L- α -phosphatidylcholine extrait de jaune d'œuf ou EPC**

Les membranes des liposomes étudiés sont majoritairement constituées de L- α -phosphatidylcholine extrait de jaune d'œuf ou Egg PC (EPC, M=760,08 g/mol, >99%). Il s'agit d'un mélange de lipides naturels, fréquemment utilisé pour la synthèse de liposomes.

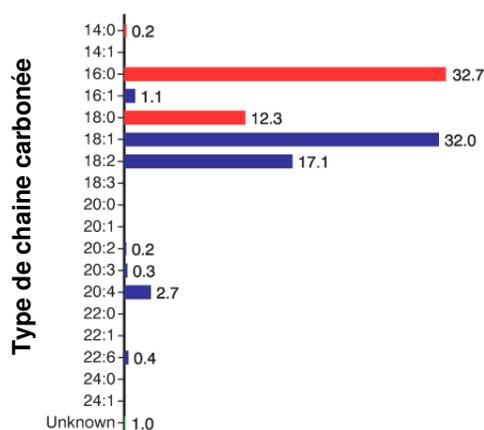


Figure 17 : Longueur, insaturation et proportion des chaînes hydrocarbonées de la phosphatidylcholine extraite de jaune d'œuf EPC (source : laboratoires avanti polar lipids)

➤ **2-diacyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[méthoxy-poly(éthylène glycol)₂₀₀₀] ou DSPE-PEG₂₀₀₀**

Afin de stabiliser stériquement les liposomes, 5% en mole de 2-diacyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[méthoxy-poly(éthylène glycol)₂₀₀₀] (DSPE-PEG₂₀₀₀, M=2805,497 g/mol, >99%) a été introduit dans la membrane.

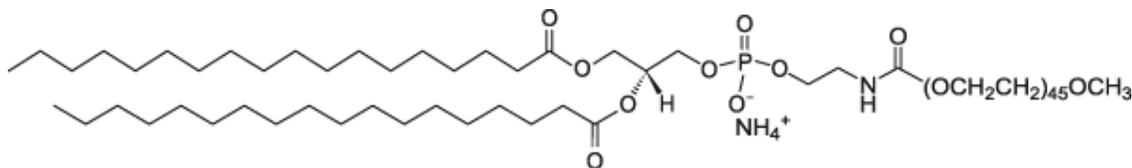


Figure 18 : structure chimique du DSPE-PEG₂₀₀₀ (C₁₃₃H₂₆₇N₂O₅₅P).

Le rôle des chaînes de PEG est d'apporter d'une part une stabilité physique des liposomes (agrégation inhibée) et d'autre part d'éviter, tout au moins partiellement, l'adsorption des protéines plasmatiques et donc une élimination trop rapide du compartiment sanguin (stabilisation biologique).

➤ **acide phosphatidique ou EPA**

Une préparation de liposomes stabilisés électrostatiquement a été réalisée en introduisant 5 % solution en mole d'acide ethyl-eicosapentaénoïque (acide phosphatidique, EPA , M=302,45 g/mol, >99%), lipide chargé négativement.



Figure 19 : structure chimique de l'EPA (C₂₀H₃₀O₂).

➤ **Cholestérol ou CHOL**

Afin de moduler la perméabilité membranaire, différents taux de cholestérol (Chol, M=386,65 g/mol, ≥99%) ont été introduits dans la fabrication des liposomes, dans une gamme de composition 25-35 % en mole.

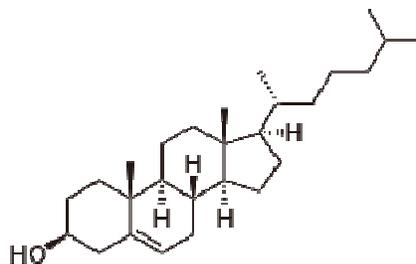


Figure 20 : structure chimique du cholestérol (C₂₇H₄₆O)

I-2. Les milieux aqueux

Des solutions tampon iso-osmotique avec les conditions plasmatiques du corps humain (pH 7,4; 300mOsm) ont été préparées. Ces solutions tampon ont été utilisées pour préparer des liposomes ne contenant pas de complexes, pour purifier et ajuster la concentration des systèmes LipoCEST.

➤ Tampon HEPES NaCl

Une première solution, la plus utilisée, contient du chlorure de sodium (145 mM NaCl, pour fixer l'osmolarité) et de la N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'-[2-éthane sulfonique] (HEPES, 10 mM, tampon pH 7,4 ajusté avec une solution de soude concentrée). qui ont été fournis par la société Sigma (St. Louis, MO). Le milieu aqueux final est filtré sur membrane 0,22µm afin d'éliminer toute pollution biologique, puis l'osmolarité est mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre cryoscopique (Bioblock Scientific, France).

➤ Tampon HEPES NaCl/citrate de sodium

Afin d'empêcher l'agrégation des liposomes non recouverts de PEG, une solution tampon HEPES (10 mM) pH 7,4, 300 mOsm, contenant du chlorure de sodium (108 mM) et du citrate de sodium (20 mM) a été utilisée et préparée comme ci-dessus.

➤ Solution de mannitol

Une solution de mannitol a été également préparée (52 g/L de mannitol pour 300mOsm) mais sans addition d'un tampon pour utiliser des conditions identiques à celles mises en place par la société Guerbet. Les liposomes préparés dans cette solution, plus visqueuse, ont été extrudés à 45°C (protocole Guerbet).

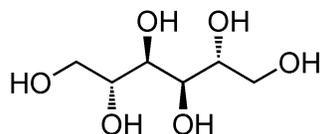


Figure 21 : structure chimique du mannitol

➤ Sérum physiologique

Enfin, un dernier milieu a été utilisé : Le sérum physiologique humain Seronorm™ commercialisé par Sero (Billingstad, Norvège) et qui permet de modéliser le comportement des systèmes LipoCEST en milieu sanguin.

I-3. Ligands

Les composés chélatants 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- acide tetraacétique (DOTA, M=404,4g/mol, pureté 98%), 1,4,7-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO3A, M= 346,4g/mol, pureté 98%) et a,a',a'',a'''-tetraméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- acide tetraacétique (DOTMA, M= 460,5g/mol, pureté 98%) ont été fournis par Chematech (Dijon, France).

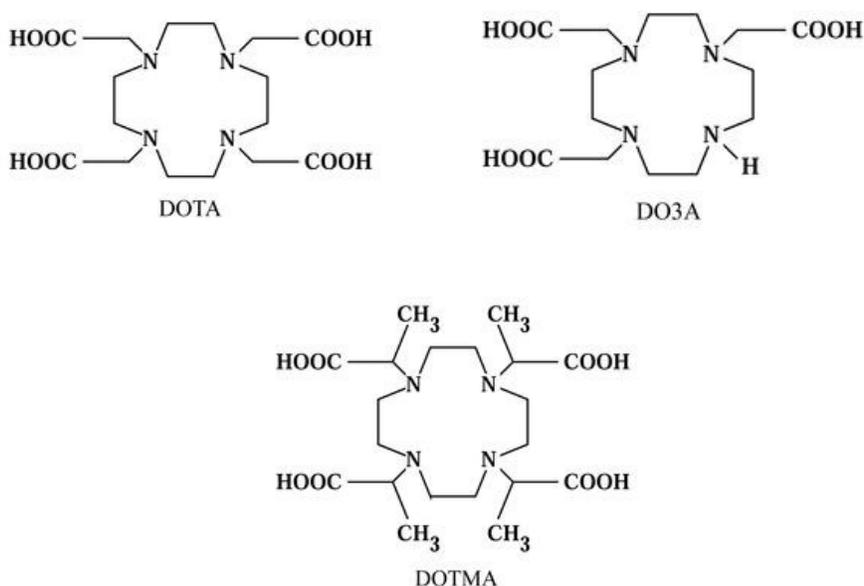


Figure 22 : Molécules de 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- acide tetraacétique (DOTA), 1,4,7-tris(carboxyméthyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO3A) et a,a',a'',a'''-tetraméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- acide tetraacétique (DOTMA).

Les cages DOTA et DTPA sont les deux complexes de bases à partir desquels sont déclinés les autres types de ligands. Pour notre étude, le ligand DOTA a été choisi en raison de sa meilleure stabilité sous forme de complexe. En effet, il a été prouvé, comme mentionné dans la partie bibliographique, que les ligands linéaire de type DTPA forment des complexes moins stables que les ligands cycliques. A partir du DOTA, deux dérivés ont été choisis: le ligand DOTMA dont les 4 groupes méthyle hydrophobes permettent un échange rapide des molécules d'eau sur le futur centre lanthanide, et le ligand DO3A qui, avec un groupe carboxylique en moins, permet au futur centre paramagnétique de lier 2 molécules d'eau au lieu d'une. De plus, ce ligand permet d'obtenir un complexe lanthanide non chargé, contrairement aux deux autres cages (1 charge nette négative). De plus amples détails seront donnés dans la partie traitant de la synthèse de ces complexes.

Les lanthanides, sous forme de chlorures ($\text{EuCl}_3 (\text{H}_2\text{O})_6$) et ($\text{TmCl}_3 (\text{H}_2\text{O})_6$), ont été fournis par la société Sigma (St. Louis, MO). L'ion thulium Tm(III) a été choisi pour son excellente efficacité en tant qu'agent de déplacement chimique. Quant à l'euporium, ses propriétés de fluorescence en font un lanthanide idéal pour toutes les études de caractérisation ou de suivi *in vitro*.

II. Synthèse et purification des complexes de lanthanides

II-1. Synthèse

Quatre complexes différents ont été synthétisés (Tableau 1). Les complexes Tm-DOTA, Tm-DOTMA et Tm-DO3A ont été synthétisés par complexation du chélate (DOTA, DOTMA ou DO3A) avec le sel de thulium $\text{TmCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$. Quant au complexe Eu-DOTA, la même procédure a été suivie par complexation d'une cage DOTA avec un sel d'euporium $\text{EuCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$

Tableau 3 : Complexes synthétisés

Dénomination usuelle	Dénomination complète	Nom complet
Eu DOTA	$[\text{Eu}(\text{III})\text{-DOTA}, \text{H}_2\text{O}]^+$	Euporium 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-acide tetraacétique
Tm DOTA	$[\text{Tm}(\text{III})\text{-DOTA}, \text{H}_2\text{O}^a]$	Thulium 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-acide tetraacétique
Tm DOTMA	$[\text{Tm}(\text{III})\text{-DOTMA}, \text{H}_2\text{O}]^+$	Thulium <i>a, a', a'', a'''</i> -tetramethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-acide tetraacétique
Tm DO3A	$[\text{Tm}(\text{III})\text{-DO3A}, (\text{H}_2\text{O})_2]$	Thulium 1,4,7-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

^a L'existence d'une molécule d'eau de coordination sera discutée dans la troisième partie.

10 g de chélate sont dissous dans 50mL d'eau déionisée et la solution est ajustée à pH 6 avec une solution de NaOH. Le mélange est chauffé à 70°C. Le chlorure de lanthanide est ensuite ajouté (13 g) et la solution continue de chauffer à 60°C sous agitation magnétique et reflux pendant toute une nuit pour permettre la complexation. Afin de vérifier l'avancement de la réaction, 5µL de la solution sont injectés dans un analyseur HPLC-UV (Agilent HP1100, longueur d'onde de détection 201nm, colonne HydroSynergy Polar RP80, Phenomenex; phase mobile suivant un gradient d'eau acidifiée (0,05% TFA)/méthanol) qui permet de suivre la quantité de chélate non complexé encore en solution. Le chélate ayant été ajouté en légère minorité, sa disparition indique la fin de la réaction. Pour terminer, le pH est ajusté à 4 par ajout de HCl. Comme le sel de thulium a été ajouté en léger excès, Les ions libres Tm(III) sont extraits de la solution par utilisation d'une résine échangeuse d'ions légèrement acide (Chelex 100, BioRad). La solution purifiée est alors lyophilisée, et le complexe est recristallisé dans 5 équivalents d'éthanol. La poudre ainsi formée est récupérée par filtration.

Le sel (NaCl) restant est éliminé sur colonne chromatographique en phase inverse (colonne de verre ouverte (D = 5cm, L = 30cm) ; gel de silice greffé C2 (Merck), eau pour phase mobile). Différentes fractions sont recueillies et quelques gouttes de chaque fraction est testée avec du nitrate d'argent AgNO₃. Les fractions sans NaCl sont alors réunies et lyophilisées. La pureté finale du complexe est déterminée par HPLC-UV-MS (Agilent HP1100, longueur d'onde de détection 201nm, colonne HydroSynergy Polar RP80, Phenomenex; phase mobile suivant un gradient d'eau acidifiée (0,05% TFA)/méthanol). Les résidus éventuels d'ions Tm(III) libres, de Na⁺ et Cl⁻ ont été dosés par électrophorèse capillaire comme décrit plus loin.

Tableau 4 : Puretés des composés synthétisés

Complexe	Masse molaire (g/mol)	Résidus Ln(III) libres sous forme de chlorure (% mol)	Résidus chélate non complexés (% mol)	Résidus NaCl (% mol)
Eu DOTA	556,4	0,11%	0%	0,36%
Tm DOTA	573,5	0%	0%	10 %
Tm DOTMA	626,5	0%	0%	0%
Tm DO3A	512,3	0,06%	0%	2,09%

II-2. Osmolarité des solutions de complexes

Pour chaque complexe, des abaques d'osmolarité en fonction de la concentration ont été tracés (Figure 7 pour les complexes de Tm(III) et Figure 8 pour le complexe d'Eu(III)), de façon à contrôler l'ajustement final lors de la purification des liposomes après encapsulation.

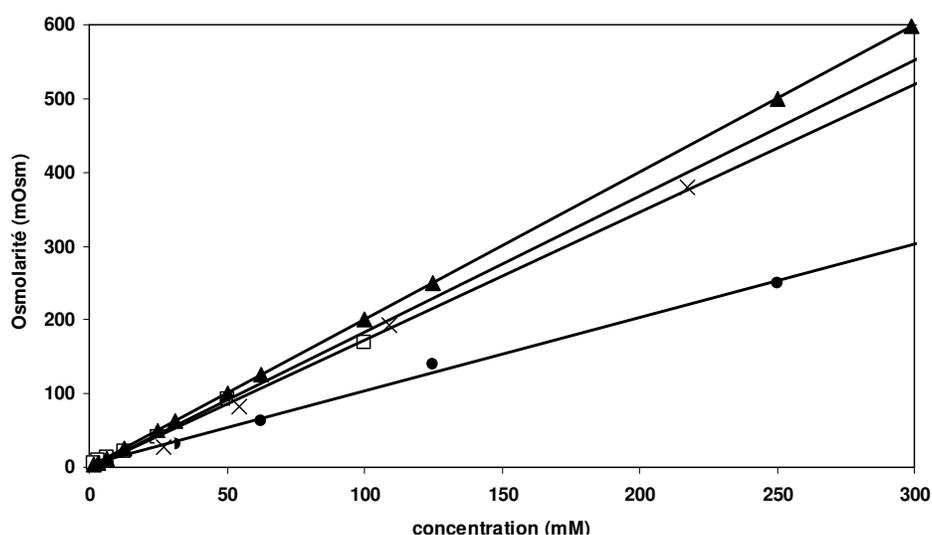


Figure 23 : Variation de l'osmolarité en fonction de la concentration de solutions aqueuses de NaCl (▲), Tm-DOTA (□), Tm-DO3A (●) et de Tm-DOTMA (x).

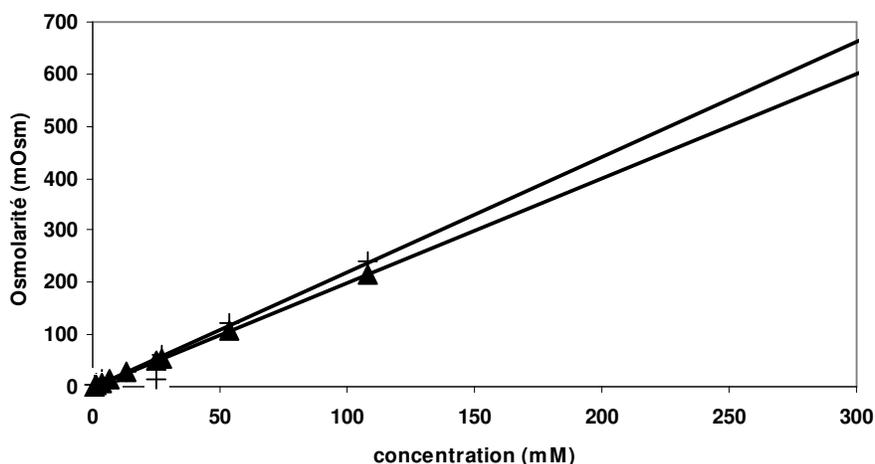


Figure 24 : Variation de l'osmolarité en fonction de la concentration de solutions de NaCl (▲) et d'Eu-DOTA (+).

Un complexe de gadolinium commercial PROHANCE® (gadoteridol, concentration 4189,5 mg/15 mL, Bracco SpA, Milan, Italy) ou Gd-HPDO3A (Gd(III) 10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-acide triacétique) a également été encapsulé dans des liposomes. Nous avons également vérifié l'osmolarité de ses solutions aqueuses en fonction de la concentration (Figures 9,10).

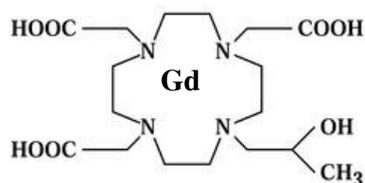


Figure 25 : Structure chimique du complexe de gadolinium Gd-HPDO3A, le Prohance®

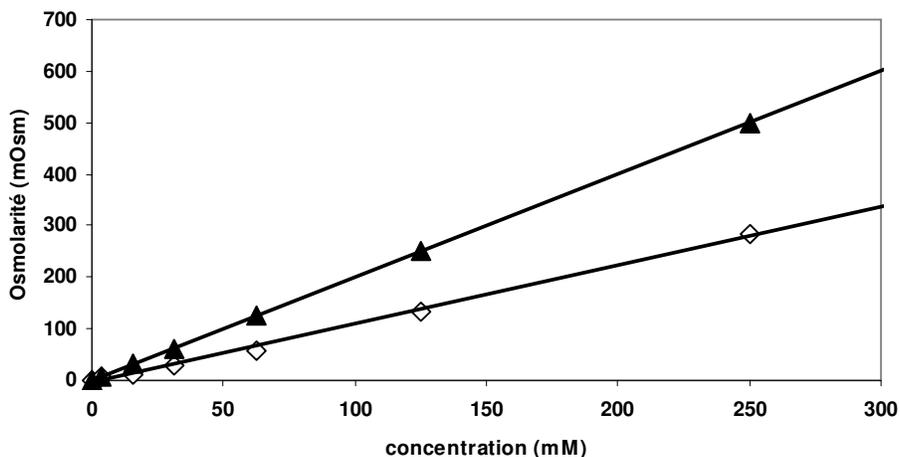


Figure 26 : Variation de l'osmolarité en fonction de la concentration de solutions de NaCl (▲) et de Gd-HPDO3A (◇).

II-3. Electrophorèse capillaire de zone

L'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) est une technique permettant la séparation des analytes selon leur différence de mobilité électrophorétique sous l'action d'un champ électrique. Pour mesurer la quantité d'ions sodium dans les complexes après synthèse, l'ECZ a été pratiquée à 25°C avec un instrument HP-CE (Agilent Technologies, Massy, France) équipé d'un détecteur UV-DAD (ultraviolet diode array detection). Cet appareil prend automatiquement en charge le conditionnement du capillaire (capillaire de silice de dimensions 50 µm x 58cm (Photonlines, Marly-le-Roi, France) rincé 15min avec une solution 1M puis 0,1M NaOH, puis de l'eau milliQ à une pression de 0,935 bar), l'introduction de l'échantillon d'analyse (60mg/mL), l'application du champ électrique (30kV) et la détection UV-DAD. L'électrolyte choisi est une solution d'imidazole de pH 4,5 injectée pendant 25 s à 50 mbar. Le calcul de la quantité de sel tiend compte du fait que les complexe de lanthanide DOTA et DOTMA sont assortis d'un ion Na⁺ tandis que le DO3A neutre une fois complexé au lanthanide n'en compte pas.

Le dosage des ions chlorure a été réalisé en prenant comme électrolyte le chromate de potassium injecté pendant 30 s à 20 mbar, le capillaire de silice ayant pour dimension 75 µm de diamètre pour 72cm de longueur, et le champ électrique étant de 20 kV.

III. Formation des liposomes et purification

III-1. Préparation

Les liposomes peuvent être préparés de plusieurs façons. Chaque technique va fournir au liposome des caractéristiques particulières (taille, lamellarité, capacité d'encapsulation différentes). Ici, nous avons privilégié la méthode d'hydratation d'un film lipidique suivie d'une extrusion séquentielle sur filtres calibrés pour la reproductibilité des distributions de taille des vésicules obtenues qui, à partir d'une filtration à 0,2 μm , est unimodale et relativement étroite et produit des objets unilamellaires. Les différentes compositions de membrane étudiées sont reportées dans le Tableau 3.

Tableau 5 : Compositions lipidiques des liposomes préparés dans la thèse. Les incertitudes correspondent à la reproductibilité des teneurs en chacun des lipides d'une préparation à l'autre.

EPC (% mol)	DSPE-PEG ₂₀₀₀ (% mol)	CHOL (% mol)
100		
95 \pm 0,1	5 \pm 0,1	
72 \pm 3	5 \pm 0,1	23 \pm 3
60 \pm 1	5 \pm 0,1	35 \pm 1

Avec une seringue de précision (Hamilton) en verre et aiguille en inox (pas de composés polymère pour éviter leur solubilisation), la solution chloroformique de lipides est prélevée et évaporée sous flux d'azote. Les traces de solvants résiduels sont éliminées par lyophilisation sous vide poussé pendant 12h (toute une nuit) puis le film lipidique est pesé précisément (à 0,00001 g près, balance Mettler AE 163). Si la membrane comporte plusieurs lipides distincts, l'opération est renouvelée d'autant. Chaque lipide ajouté est ainsi pesé précisément, et la quantité d'un lipide par rapport à un autre est ajustée au besoin. Le film final est hydraté par un volume bien défini de solution aqueuse pour avoir une concentration finale totale de 20 mM en lipides. Cette solution peut être une solution tampon, permettant d'obtenir des liposomes blancs (non chargés en complexe), ou bien une solution aqueuse contenant les complexes hydrophiles de lanthanides (à 300mOsm, comme le tampon) afin de les encapsuler dans la cavité interne des liposomes. Une dispersion fluide et opalescente est ainsi obtenue sous agitation douce puis extrudée par passages successifs sous pression à travers des filtres dont les pores présentent des diamètres décroissants (0.8 μm /0.4 μm /0.2 μm /0.2 μm). Les vésicules ainsi préparées sont de taille homogène et stable dans le temps.

Elles sont conservées à 4°C (sauf pour celles contenant du cholestérol qui sont maintenues dans l'obscurité à température ambiante).

Deux dispositifs ont été utilisés. Pour des volumes de 3 à 4 mL, une première extrudeuse avec des filtres de polycarbonates de 25mm de diamètre a été utilisée (Poretics, Osmotics, Livermore, Etats-Unis). Une circulation d'eau dans le corps de l'extrudeuse permet de chauffer l'échantillon pendant l'extrusion si besoin. La pression qui permet l'extrusion est effectuée grâce au raccordement à une bouteille d'azote (pression d'azote <10 bars).



Figure 27 : extrudeuse à pression d'azote

Pour des volumes plus petits (0,5 mL par extrusion), un système LiposoFast-Basic™ produit des liposomes unilamellaires par extrusion manuelle à travers une membrane polycarbonate de 5 mm de diamètre, en utilisant des seringues en verre (0,5mL) étanches aux gaz (dispositif et filtres fournis par Avestin Europe GmbH (Mannheim, Germany)).

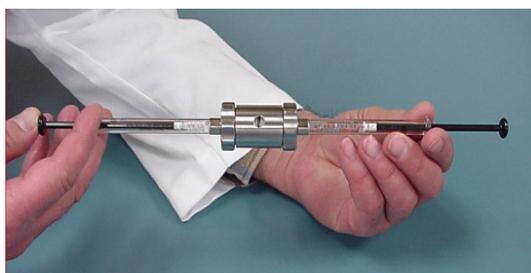


Figure 28 : mini-extrudeuse à pression manuelle (photo : Avestin)

L'osmolarité finale des préparations avant leur purification par chromatographie d'exclusion sur gel, a systématiquement été mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre cryoscopique (Bioblock Scientific, France). **Pour toutes les préparations, les liposomes extrudés ont été conservés en l'état soit à 4°C soit à température ambiante. Ils ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique juste avant utilisation.**

III-2. Purification et Caractérisation des liposomes chargés en complexes de lanthanides

Des lipoCEST d'Eu-DOTA ont été synthétisés afin de suivre pas à pas leur synthèse, leur purification, et leur stabilité, en utilisant les propriétés spectroscopiques du complexe dans l'UV-visible.

➤Caractérisation du complexe Eu-DOTA

La Figure 13 montre le spectre d'absorption UV-visible du complexe Eu-DOTA en solution dans l'eau (10mM) à 25°C (spectrophotomètre d'absorption UV-visible double faisceau Lambda 2 Perkin-Elmer, cuve en quartz 1 cm de chemin optique).

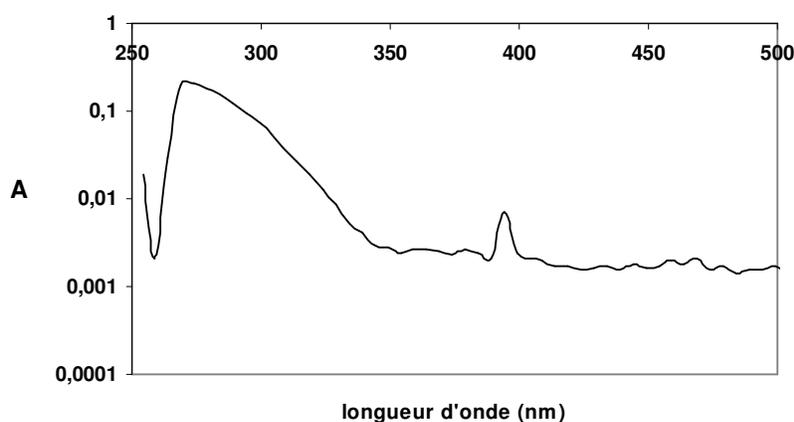


Figure 29 : spectre d'absorption UV-visible du complexe Eu-DOTA en solution dans l'eau. A (absorbance=densité optique DO)

La bande d'absorption à 276 nm correspond aux fonctions carbonyle du ligand DOTA. La bande à 393 nm est due à l'absorption des ions Eu(III) et correspond à la bande excitatrice de la fluorescence de la terre rare. La Figure 14 montre le spectre d'émission de fluorescence à 25°C d'une solution dans l'eau du complexe (concentration 10mM) lorsque la longueur d'onde d'excitation est 396 nm (Fluorolog Spex FL1T11, Jobin Yvon, Longjumeau France). Les cuves utilisées sont des cuves en quartz quatre de 1 cm de chemin optique. Le spectre d'émission obtenu montre une bande d'émission relativement intense centrée à 697-698 nm stable dans une large gamme de concentrations et que nous avons exploitée par la suite. La Figure 15 montre le spectre d'excitation de la même solution mesuré pour une longueur d'onde d'émission à 698 nm qui vérifie bien que le maximum d'excitation est situé à 393nm et donc que cette bande est la plus appropriée pour détecter le complexe.

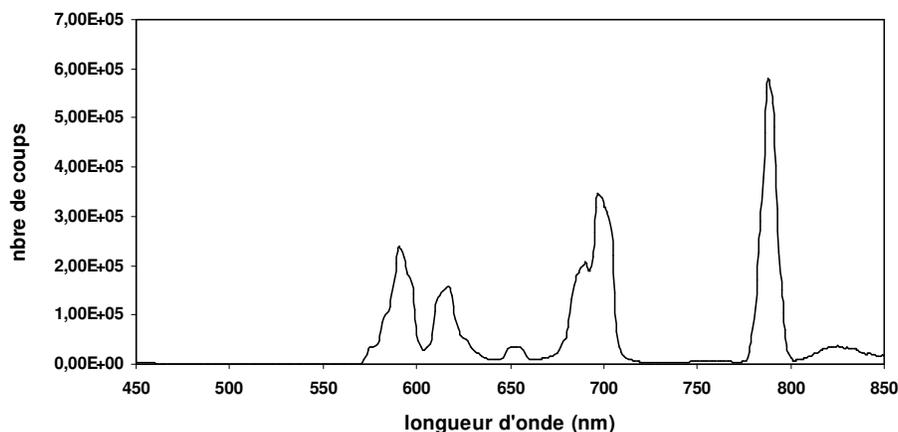


Figure 30 : spectre d'émission de fluorescence du complexe Eu-DOTA en solution dans l'eau dans l'eau obtenu pour une longueur d'onde d'excitation à 393nm.

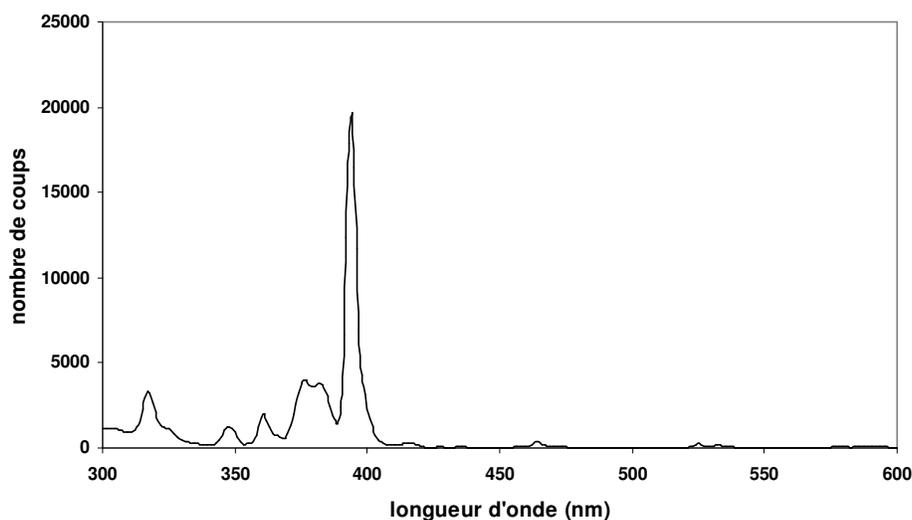


Figure 31 : spectre d'excitation de fluorescence du complexe Eu-DOTA en solution dans l'eau obtenu pour une longueur d'onde d'émission à 698nm.

La Figure 16 reporte la relation linéaire entre l'intensité d'émission de fluorescence du complexe Eu-DOTA à 698 nm en fonction de sa concentration en solution aqueuse à la longueur d'onde d'excitation de 393 nm. Cette relation a permis le dosage de diverses solutions de complexe.

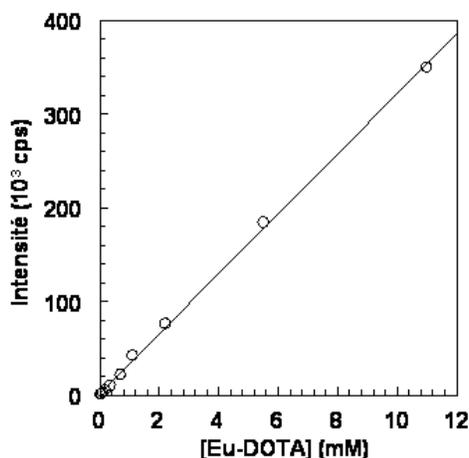


Figure 32. Variation de l'intensité d'émission de fluorescence (unité arbitraire) de solutions aqueuses de complexe Eu-DOTA en fonction de la concentration et mesurée à 25°C (longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement égales à $\lambda_{exc} = 393$ nm et $\lambda_{em} = 698$ nm).

➤ **Purification par chromatographie d'exclusion sur gel (ou chromatographie d'exclusion stérique CES).**

L'étape d'extrusion achevée, les liposomes calibrés contenant le complexe de terre rare ont été séparés du complexe libre non encapsulé par chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse basse pression sur gel de Sephacryl S1000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède), selon une procédure qui avait été développée pour l'obtention de liposomes magnétiques [Lesieur et al. 2003 ; Martina et al. 2005]. Le dispositif utilisé est composé de petites colonnes (hauteur 5,8 cm ; diamètre 0,4mm) contenant 0,8mL de gel et préalablement saturées à l'aide de vésicules non chargées de complexe mais de même composition lipidique que celle des agents LipoCEST ou encore nommées liposomes « blancs » (Figure 17).

Selon le principe de l'exclusion stérique, les liposomes, de taille supérieure au diamètre des pores du gel vont être exclus de ces derniers lors de leur élution dans la colonne. Ainsi, leur volume d'élution va correspondre au volume exclus de la colonne. Par contre, le complexe libre, du à sa petite masse moléculaire, va être retenu dans la colonne et sera élué à un volume plus conséquent.

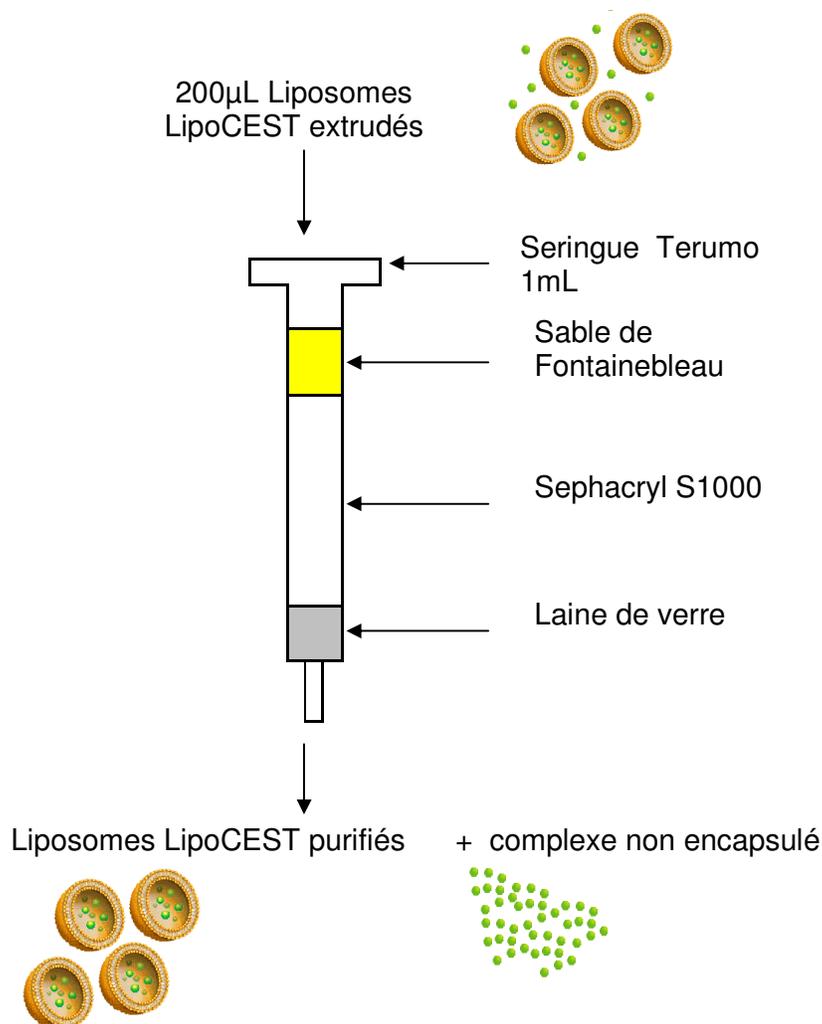


Figure 33 : Dispositif de chromatographie d'exclusion stérique utilisé pour la purification des liposomes chargés de complexe de lanthanide

La Figure 18 montre, à titre d'exemple, le profil d'élution obtenu pour des liposomes (EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%)) chargés en [Eu(III)-DOTA, H₂O]⁻ (ou [Eu-DOTA] ou Eu-DOTA) après passage sur colonne ainsi que les profils de liposomes blancs de diamètre équivalent et de complexe seul. Ces profils ont été obtenus après collection de fractions et analyse de chaque fraction d'une part à l'aide d'un appareil de diffusion quasi-élastique de la lumière ou DQEL Nano ZS-90 (Malvern) et d'autre part en spectrophotométrie de fluorescence pour détecter la présence de complexe. Les mesures de DQEL ont été exploitées en reprenant d'une part la valeur de l'intensité diffusée à 90° par les liposomes, proportionnelle à leur concentration, et d'autre part le diamètre hydrodynamique déduit du coefficient de diffusion de ces liposomes selon l'équation de Stokes-Einstein établie pour des particules sphériques indépendantes (cf chapitre VI).

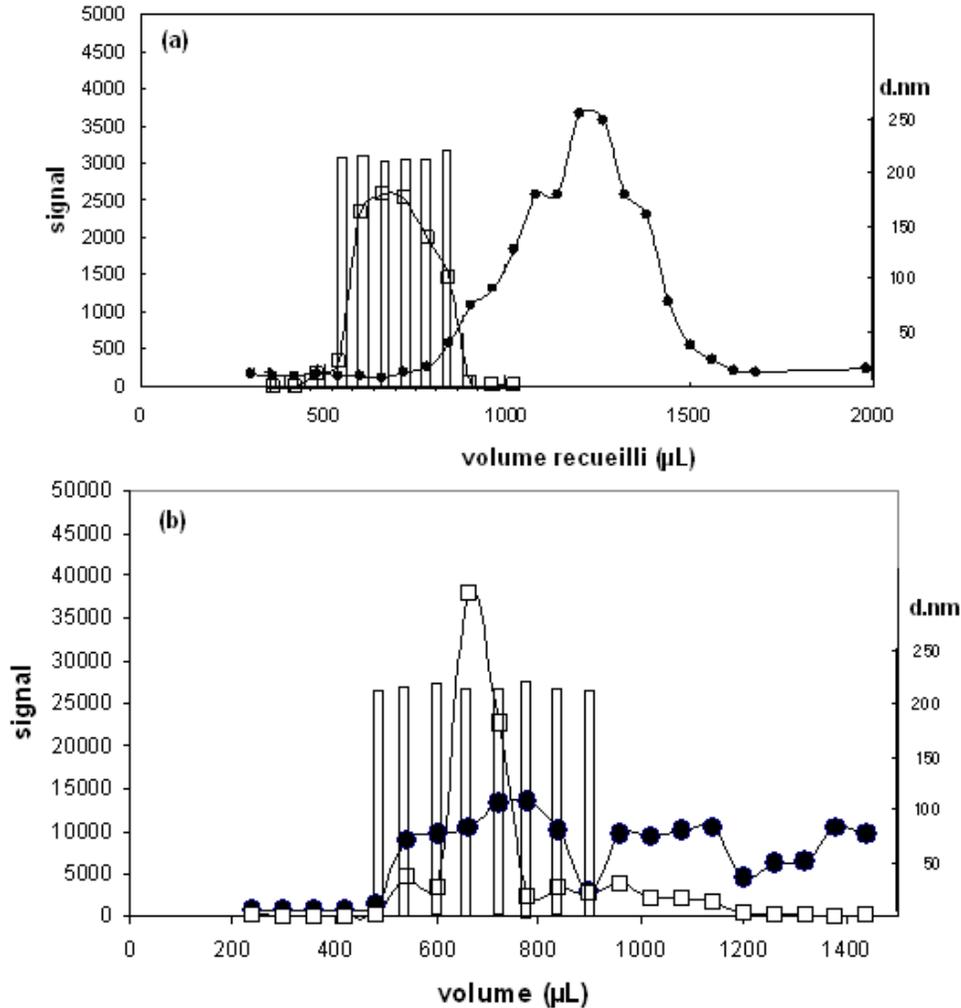


Figure 34 : Profils de chromatographie d'exclusion stérique de liposomes blancs, de complexe et de liposomes chargés en [Eu-DOTA] (a) avec double détection, diffusion de la lumière à 90° (□) et émission de fluorescence à 698 nm (●) (excitation 393 nm), de liposomes blancs et de [Eu-DOTA] injectés séparément (b) détectés respectivement en diffusion de la lumière à 90° et en fluorescence (émission à 698 nm, excitation 393 nm). Les diamètres moyens hydrodynamiques des vésicules éluées sont reportés directement sur les profils. Les volumes injectés sont de 200 μL, le volume de chaque fraction collectés est de 30μL et l'éluant une solution tampon Hepes 10 mM, pH 7,4 et NaCl 145 mM, de même osmolarité que la solution de complexe utilisée pour la fabrication des liposomes(292mOsm).

En pratique, pour assurer la récupération de liposomes totalement exempts de complexe non encapsulé et limiter la dilution apportée par le passage sur la colonne, seule la partie de la population correspondant à la première fraction de 70% du pic total d'élué des liposomes a été récupérée en sortie de colonne et utilisée pour les expériences ultérieures. Pour éviter tout problème de choc osmotique lors du passage sur la colonne, l'éluant utilisé est une solution aqueuse de tampon HEPES pH 7,4 complétée en NaCl de façon à ajuster exactement l'osmolarité de cette solution à celle de la solution aqueuse de complexe utilisée pour fabriquer les liposomes.

IV. Rendement d'encapsulation et concentration intra-liposome de complexe

IV-1. Approche expérimentale

Les teneurs en phosphore et en terre rare de toutes les préparations de liposomes que nous avons étudiées ont été déterminées de façon à connaître les concentrations totales en phospholipides et complexe contenues dans ces préparations (voir chapitre V). Ces données ont permis de remonter au rendement d'encapsulation, c'est-à-dire à la fraction de complexe effectivement piégée dans les liposomes lors de leur fabrication. Pour ce faire, les concentrations en complexe contenu dans chaque préparation étudiée avant et après séparation du complexe non encapsulé par chromatographie d'exclusion stérique, ont été déterminées par spectrométrie de masse. Soient $[Cx]_i$ et $[Cx]_f$ les concentrations en complexe mesurées avant et après passage sur la colonne. Pour tenir compte de la dilution éventuelle liée au passage sur le gel, la concentration $[Cx]_f$ est corrigée du facteur de dilution (déduit des concentrations lipidiques obtenues par dosage du phosphore, $[Lip]_i$ concentration totale de lipides avant colonne et $[Lip]_f$ concentration totale de lipides après colonne). Le rendement d'encapsulation r est donc donné par:

$$r = [Cx]_f \cdot ([Lip]_i / [Lip]_f) / [Cx]_i \quad [1]$$

La quantité de complexe incorporée dans les vésicules n_{int} par mole de lipide est par ailleurs donnée par :

$$n_{int} = [Cx]_f / [Lip]_f \quad [2]$$

En considérant que lors de la fabrication des liposomes, la concentration de complexe piégé dans les vésicules est la même que la concentration de complexe resté à l'extérieur (équilibre des espèces de part et d'autre de la membrane, $[Cx]_{int} = [Cx]_{ext}$), la fraction de volume de préparation encapsulée dans les vésicules est égale au rapport des quantités de complexe totale (avant passage sur colonne) et internalisée (après passage sur colonne), soit :

$$f_{exp} = r \quad [3]$$

Cette hypothèse a été largement utilisée dans nombre d'études publiées et portant sur les propriétés d'encapsulation des liposomes. Elle s'est avérée vérifiée en absence d'interactions spécifiques entre les lipides et la substance incorporée [X. Xu et al. 2012 ; Terreno et al. 2008 ; Fossheim et al. 1999].

IV-2. Approche théorique

D'un point de vue fondamental il était intéressant à ce stade de mise au point des liposomes d'estimer, cette fois par le calcul théorique, la fraction volumique piégée par les liposomes, ceci à partir de la concentration en lipides des préparations et du rayon des vésicules. Parallèlement, l'estimation par le calcul de la concentration équivalente en liposomes contenus dans les préparations étudiées permet d'évaluer la sensibilité de la réponse des liposomes ramenée à la quantité d'agents de contraste effective.

Pour une population de liposomes ayant le même volume unitaire (population monodisperse), le volume interne total des liposomes est égal au produit du volume unitaire interne d'un liposome par le nombre de liposomes N_L par unité de volume de préparation. Pour une concentration totale en lipides $[\text{Lip}]_{\text{tot}}$ donnée, le nombre de liposomes par unité de volume peut être calculé à l'aide de l'expression suivante:

$$N_L = [\text{Lip}]_{\text{tot}} \cdot N_a / N_{\text{ag}} \quad [4]$$

N_a est le nombre d'Avogadro ($N_a = 6,023 \cdot 10^{23}$) et N_{ag} est le nombre d'agrégation d'un liposome, soit le nombre de molécules de lipide formant un liposome.

Le nombre d'agrégation d'un liposome peut être calculé à partir du volume de la membrane délimitant la vésicule et du volume moléculaire V_{mol} des lipides. Pour une vésicule de rayon R et d'épaisseur de bicouche e , le nombre d'agrégation est donc donné par :

$$N_{\text{ag}} = 4\pi/3 (R^3 - (R-e)^3) / V_{\text{mol}} \quad [5]$$

Le volume total piégé par les liposomes par unité de volume de préparation, soit la fraction volumique encapsulée théorique f_{the} (en v/v) est alors donnée par:

$$f_{\text{the}} = N_L \cdot 4\pi/3 (R-e)^3$$

Soit :

$$f_{\text{the}} = [\text{Lip}]_{\text{tot}} \cdot N_a \cdot V_{\text{mol}} \cdot (R-e)^3 / [R^3 + (R-e)^3] \quad [6]$$

Dans le cas de liposomes composés partiellement de phospholipides porteurs de chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG₂₀₀₀), il faut tenir compte de la couronne de polymère venant s'ajouter à l'épaisseur de la bicouche de phospholipides. Si l'on pose L l'épaisseur de cette couronne, l'équation [5] devient :

$$N_{\text{ag}} = 4\pi/3 [(R-L)^3 - (R-L-e)^3] / V_{\text{mol}} \quad [7]$$

En considérant que les chaînes de polymère recouvrant le feuillet interne de la bicouche excluent la substance encapsulée dans le volume d'eau libre interne, la fraction volumique piégée à l'intérieur des liposomes de concentration en lipides totale $[\text{Lip}]_{\text{tot}}$ devient :

$$f_{\text{the}} = [\text{Lip}]_{\text{tot}} \cdot N_a \cdot V_{\text{mol}} (R-2L-e)^3 / [(R-L)^3 + (R-L-e)^3] \quad [8]$$

Les équations [7] et [8] permettent donc d'évaluer la fraction volumique susceptible d'être piégée par des liposomes à partir de données qui correspondent au mélange lipidique utilisé et aux caractéristiques structurales des molécules lorsqu'elles se trouvent dans l'état de bicouche hydratée.

Sont reportées dans le Tableau 4 les valeurs déterminées expérimentalement par différents auteurs des volumes moléculaires, de l'épaisseur des bicouches et de l'aire moléculaire à l'interface hydrophile-hydrophobe des lipides constituant les liposomes que nous avons étudiés.

Tableau 6. Caractéristiques structurales des lipides utilisés pour la préparation des liposomes- Données expérimentales.

Lipide(s)	Volume moléculaire (V_{mol})	Epaisseur de la bicouche (e)	Aire moléculaire (A)
EPC	1253 Å ³ [Huang et Mason 1978] 1270 Å ³ [White et King 1985] 1267 Å ³ [Small 1986] 1260,6 Å ³ [Petrache et al 1998]	37 Å [Huang et Mason 1978] ~40 Å [White et King 1985] 43 Å [Small 1986]	58,9 Å ² [Small 1986] 58 Å ² [Mitsche et al 2010] 66-69 Å ² [Huang et Mason 1978] 66-70 Å ² [Lewis et Engelman 1983] 69,4 Å ² [Petrache et al 1998] 64-70 Å ² [White et King 1985]; 65 Å ² [Lund-Katz et al 1988]
DSPE	1269 Å ³ [Rappolt et al 2004]	56 Å [Kuhl et al 1994] 48,7 Å [Rappolt et al 2004]	42 Å ² [Bianco-Peled et al 2001] 43 Å ² [Kuhl et al 1994]
DPPC/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (85:10:5 mol%)			49,4 Å ² [Heger et al 2009]
DOPC/Cholestérol	$V_{mol} = 1316 - 0,775x$ $x = \text{fraction molaire de cholestérol}$ [Alwarawah et al 2010]	44-46 Å pour $x=0,2-0,4$ [Alwarawah et al 2010]	48 Å ² pour $x=0,5$ [Lund-Katz et al 1988] 56- 44 Å ² pour $x= 0,1-0,4$ [Alwarawah et al 2010]
SOPC/Cholestérol			59,1-46,9 Å ² pour $x=0,14-0,43$ [Lasic et Nidham 1995]
EPC/Cholestérol		42 Å pour $x \sim 0,5$ [Rand et al 1989]	

Concernant la couronne de poly(éthylène glycol), le rayon de Flory des chaînes de PEG₂₀₀₀ peut être évalué à partir de $R_F = N^{3/5} \cdot a$ ($a = 3,5 \text{ \AA}$, longueur d'une unité oxyéthylène; $N = 45$, nombre d'unités oxy(éthylène), Kuhl et al 1994 ; Kenworthy et al 1995) ce qui conduit à $R_F = 34 \text{ \AA}$. La distance entre sites d'encrage D peut être quant à elle calculée à partir de la relation $D = (A/x)^{1/2}$ où A est l'aire moléculaire moyenne du mélange lipidique à l'interface et x la composition de la membrane en DSPE-PEG₂₀₀₀ des différents liposomes que nous avons préparés. En prenant $x = 5 \text{ mol\%}$ et en tenant compte des valeurs des aires moléculaires à l'interface hydrophile-hydrophobe déterminées expérimentalement pour les différents lipides utilisés au cours de la thèse (cf Tableau 4), la distance entre site d'ancrage D varie, selon la composition des bicouches, de 30 \AA à 37 \AA , soit en moyenne de l'ordre de grandeur du rayon de Flory. D'après la théorie prédictive établie par Alexander (1977) et de Gennes (1980), la conformation des chaînes de polymère à la surface des vésicules se trouve à la transition dite « champignon-brosse ». Une majorité de publications s'accordent à l'appui de mesures effectuées à l'aide de différentes techniques, pour donner une valeur de l'épaisseur de la couronne de PEG₂₀₀₀ dans cet état de conformation comprise entre 38 et 66 \AA , soit en moyenne très voisine de 50 \AA [S.R. Sheth and D. Leckband 1997 ; A.K. Kenworthy et al 1995 ; Lasic et Nidham 1995 ; Needham et al 1992 ; Hansen et al 2003 ; Majesky et al 1998 ; Kuhl et al 1998].

La Figure 19 illustre les résultats des valeurs théoriques du nombre d'agrégation et de la fraction volumique piégée au niveau du compartiment interne de liposomes unilamellaires. On constate que l'ordre de grandeur du nombre d'agrégation est faiblement affecté par la composition lipidique des liposomes. A rayon équivalent, la fraction de volume piégée au sein des liposomes est plus faible lorsque la membrane des liposomes est recouverte de 5 mol\% de PEG₂₀₀₀ mais varie peu en fonction de la composition lipidique de la bicouche.

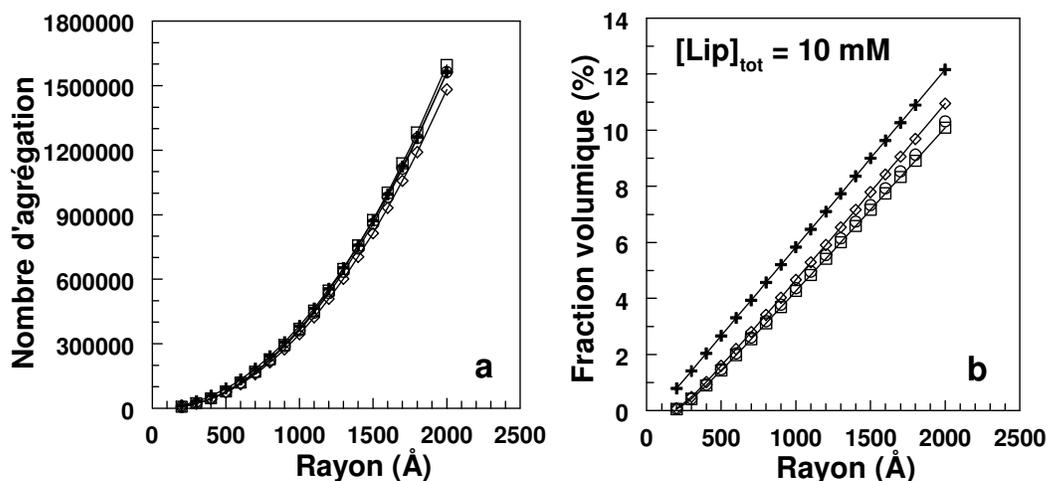


Figure 35: Variation du nombre d'agrégation (a) et de la fraction volumique (b) de liposomes unilamellaires en fonction de leur rayon, d'après les expressions théoriques données par les équations [4-8] en prenant $L(\text{PEG}_{2000}) = 50 \text{ \AA}$, $V_{\text{mol}} = 1264 \text{ \AA}^3$ et $e=40 \text{ \AA}$ (liposomes sans cholestérol), ou $V_{\text{mol}} = 1315 \text{ \AA}^3$ ou 1316 \AA^3 et $e = 44 \text{ \AA}$ ou 45 \AA (liposomes avec 20 mol% ou 30 mol% de cholestérol) [valeurs moyennes estimées d'après les données du Tableau 4]. La fraction volumique piégée a été calculée pour une concentration totale en lipides de 10 mM. Les liposomes sont respectivement composés de EPC (100 mol%) +, EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95 :5 mol%) ◇, EPC/Cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (76 :19 :5 mol%) ○ et EPC/Cholestérol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (66,5 :28,5 :5 mol%) □.

Dans les équations précédentes le rayon des liposomes correspond à leur rayon géométrique. Cette grandeur est souvent difficile à mesurer directement en raison de la polydispersité intrinsèque des préparations [Lesieur et al 1993] ou par exemple dans le cas de la microscopie électronique, du manque de contraste des chaînes de polymère dans le cas de particules PEG-ylées [Beugin et al 1998 ; Hall et al 2007]. Une valeur approchée de ce paramètre peut être déterminée assez simplement à l'aide de mesures de diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) qui donnent accès au rayon hydrodynamique moyen R_h de particules supposées sphériques contenues dans une même dispersion. Il faut noter toutefois que ce rayon est souvent supérieur au rayon géométrique puisqu'il prend en compte la couche d'eau d'hydratation des liposomes entraînée dans leur mouvement [Lesieur et al 1993]. La Figure 20 résume les paramètres caractéristiques d'un liposome unilamellaire constitué en partie par un lipide porteur de chaîne de PEG et qui interviennent dans le calcul de son nombre d'agrégation et de la fraction de volume piégée dans son compartiment aqueux interne.

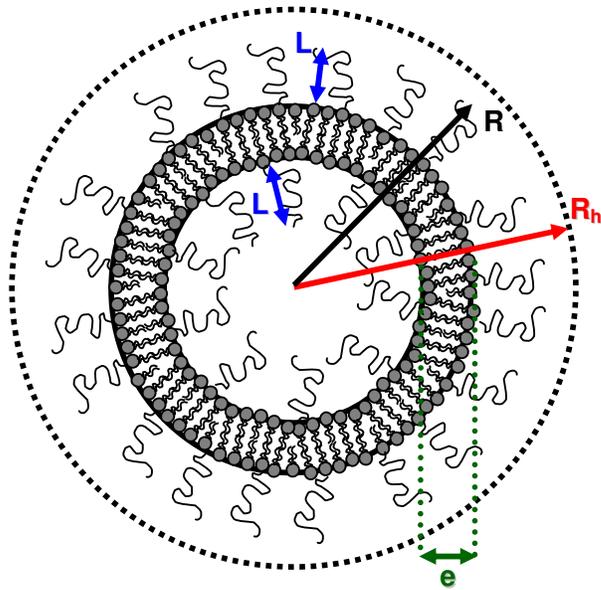


Figure 36 : Représentation schématique d'un liposome PEG-ylé et paramètres caractéristiques de sa structure vésiculaire. R et R_h désignent respectivement les rayons géométrique et hydrodynamique de la structure, e l'épaisseur de la bicouche lipidique et L la longueur des chaînes de polymère étendues à la surface de la bicouche.

IV-3. Application aux liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés de [Gd-HPDO3A]

A titre d'illustration, le taux d'encapsulation et la fraction volumique de liposomes chargés en [Gd-HPDO3A] ont été déterminés expérimentalement par chromatographie d'exclusion stérique couplée au dosage des lipides et du gadolinium. La préparation a pour conditions initiales $[Cx]_i=58,7\pm 1,3$ mM et $[Lip]_i=19,2$ mM. Après purification sur colonne et collecte totale des liposomes, les concentrations finales en complexe et n lipides sont $[Cx]_f=2,9 \pm 0,1$ mM et $[Lip]_f = 9,6 \pm 0,1$ mM. D'après les équations [1-3], la fraction volumique encapsulée expérimentale est $f_{exp} = 9,8 \pm 0,6$ % pour une préparation de liposomes de concentration totale en lipides de 19,2 mM, soit $5,1 \pm 0,3$ % pour une concentration en lipides de 10 mM. Le calcul théorique conduit à une fraction volumique de 4,7 % en prenant comme rayon des vésicules leur rayon hydrodynamique moyen déterminé par DQEL ($R_h = 101$ nm, Figure 21) et les valeurs des paramètres e , L et V_{mol} reportées dans la légende de la Figure 20. Aux approximations faites pour le calcul et aux erreurs expérimentales près, les fractions expérimentales et calculées sont en bon accord. Ceci confirme l'hypothèse que la concentration initiale de complexe servant à l'hydratation des lipides est conservée à l'intérieur des vésicules lors de leur formation puis de leur purification. Réciproquement, ce résultat conforte la validité des équations [1-8] ainsi que les valeurs choisies d'après la littérature pour les paramètres structuraux intervenant dans ces équations.

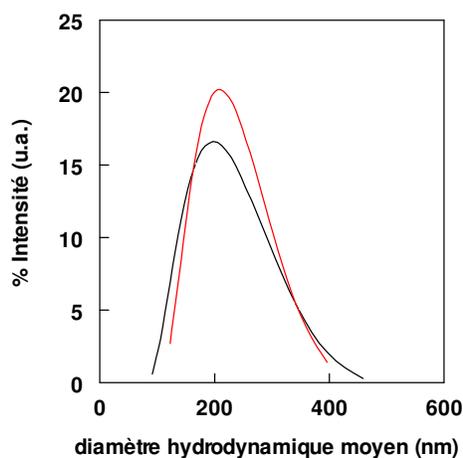


Figure 37 : Profils de distribution des diamètres hydrodynamiques des liposomes chargés en [Gd-HPDO3A] (courbe en noir) ou en [Eu-DOTA] (courbe en rouge). Les mesures ont été réalisées par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) à une concentration en liposomes équivalentes à 0,5 mM en lipides.

IV-4. Application aux liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés de [Eu-DOTA]

Dans cette expérience, le taux d'encapsulation et la fraction volumique de liposomes chargés en [Eu-DOTA] ont été déterminés par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la détection du signal d'émission de fluorescence du complexe (cf paragraphe IV celui qui décrit la méthodologie à l'euporium). Pour ce faire, la totalité des liposomes chargés de [Eu-DOTA] a été collectée en sortie de colonne, solubilisée avec une solution d'OG et analysée par spectrophotométrie de fluorescence (Figure 22). La préparation initiale (non purifiée) a été également solubilisée dans les mêmes conditions de concentrations en détergent et lipide finales avant d'être analysée par spectrophotométrie de fluorescence.

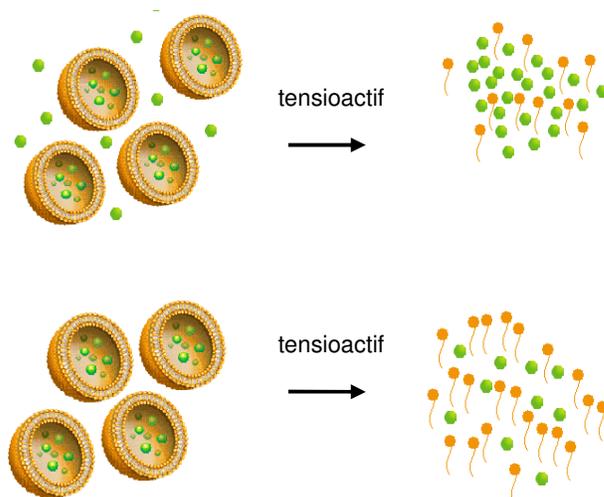


Figure 38 : schémas de liposomes chargés et non purifiés (en haut) ou purifiés (en bas) solubilisés par un tensioactif (à droite)

Les analyses ont été réalisées deux fois à partir de deux collections de fractions indépendantes. Le rapport des intensités d'émission fluorescence mesurées avant et après colonne donne directement le rendement d'encapsulation et donc la fraction volumique piégée par les liposomes trouvée égale à $11 \pm 2 \%$ pour une concentration en lipides de 19,1 mM, soit $5,5 \pm 1 \%$ pour une concentration totale en lipides de 10 mM. Ce résultat est en accord avec celui obtenu à partir des liposomes contenant du [Gd-HPDO3A] et à nouveau voisin de la fraction théorique ici de 5,3 % en prenant $R_n = 110 \text{ nm}$ (Figure 15). Ainsi les équations [1-8] sont raisonnablement vérifiées par deux méthodes indépendantes. De même l'hypothèse selon laquelle la concentration de complexe est conservée lors de son encapsulation dans les liposomes est à nouveau applicable.

V. Dosages des lanthanides et du phosphore

Les éléments thulium, europium ou gadolinium pour les complexes et phosphore pour les phospholipides ont été déterminées par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif associé à un spectromètre d'émission atomique et couplé à une chromatographie en phase liquide (ICP-AES HPLC, Optima 3300 RL, Perkin. Débit de la pompe péristaltique 1mL/min, débit du gaz plasma 15.0 L/min, auxiliaire ICP 0.9 L/min et débit du spray 0.8 L/min. HPLC : 1500W RF power, longueurs d'onde utilisées 346,220 nm (Tm(III)), 324,227 nm (Y(III)) après minéralisation de l'échantillon.

Un volume de 4500 µL d'une solution aqueuse d'acide nitrique à 65% (v/v) est ajouté à 500µL de la solution de liposomes LipoCEST étudiée. Le mélange est chauffé 8 heures à 80°C afin d'atteindre la dissolution. La solution est ensuite diluée par deux pour réduire l'acidité et permettre la quantification du lanthanide par ICP-AES HPLC (32.5% (v/v) d'acide nitrique). Une gamme étalons de solutions de lanthanide identique à celui mesuré est préparée (0.2 mg/L à 10 mg/L de lanthanide, 32.5% (v/v) d'acide nitrique et yttrium en tant que standard interne pour la calibration de l'appareil (0.7 mg/mL)). De même pour mesurer le phosphore (± 2 mM), une gamme d'étalonnage de 0.5 mg/L à 10 mg/L de phosphore a été préparée et mesurée à la longueur d'onde de 214.914 nm (auxiliaire ICP 1.0 L/min et débit du spray 0.7 L/min).

Chaque analyse a été triplée (précision 10%).

VI. Caractérisation des liposomes LipoCEST **par diffusion quasi-élastique de la lumière**

Le diamètre hydrodynamique (d_h) des lipoCEST purifiés est déterminé par diffusion quasi-élastique de la lumière (DQEL) l'aide d'un spectromètre corrélateur photonique (10 mW HeNe 632.8- nm laser, Zetasizer ZS90, Malvern Instruments). Les mesures sont effectuées à 25 °C suivant un angle de diffusion de 90°.

Avant toute mesure, l'échantillon est dilué à environ 0,5mM dans son tampon d'éluion pour atteindre une concentration optimisée garantissant une réponse optimale de l'appareil. La valeur de d_h est calculée automatiquement par l'appareil à partir de la mesure du coefficient de diffusion transrationnel D des particules selon l'équation Stokes–Einstein. Les particules sont supposées indépendantes et sphériques.

$$d_h = k_B T / 3\pi\eta D \quad [9]$$

Avec k_B la constante de Boltzman et η la viscosité du milieu.

Le diamètre hydrodynamique moyen a été déduit de l'analyse des distributions en mode unimodal et moyenné sur trois mesures répétées sur le même échantillon. L'écart-type ainsi mesuré est inférieur à 5%.

VII. Expériences de résonance magnétique nucléaire

VII-1. Mesure du temps de relaxation par ^{17}O RMN

Les mesures ont été effectuées au sein de l'équipe de Robert N. Muller avec Luce Vanderelst, dans le département de chimie générale organique et biomédicale, au laboratoire de RMN et d'imagerie moléculaire à l'université de Mons-Hainaut en Belgique.

Sur un spectromètre Bruker AMX-300 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une sonde ^{17}O , les temps de relaxation longitudinale ($^{17}\text{O-T}_1$) et transversale ($^{17}\text{O-T}_2$) sont mesurés à partir d'un échantillon de 2 mL placé dans un tube de verre de 10 mm de diamètre. La température est contrôlée par l'intermédiaire du flux d'air ou d'azote (Bruker BVT-2000 unit). Les temps de relaxation $^{17}\text{O-T}_1$ sont mesurés à l'aide d'une séquence IRFT. Le temps de relaxation $^{17}\text{O-T}_2$ de l'eau pure et de l'eau contenant 200 mM de complexe a été mesuré suivant une séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill. Tous les spectres ^{17}O RMN sont découplés en proton et chaque analyse a été répétée au moins trois fois à partir d'échantillons indépendants.

VII-2. Expériences de ^1H RMN

Les mesures ont également été effectuées au laboratoire de RMN et d'imagerie moléculaire à l'université de Mons-Hainaut en Belgique. Sur le même appareil que précédemment (spectromètre Bruker AMX-300 de chez Bruker, Karlsruhe, Allemagne), une sonde ^1H RMN a été montée. Les mesures ont été effectuées à 7,05 T à température fixe. Cette température est contrôlée par un flux d'azote et est d'une précision de $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

Spectres ^1H RMN en double tube

Les complexes étudiés au cours de la thèse sont des agents de déplacement chimique des protons de l'eau qui interagissent transitoirement avec le centre lanthanide, avec une cinétique très rapide de sorte qu'une expérience classique de ^1H RMN ne permet pas de visualiser le déplacement chimique des protons de l'eau liée par rapport aux protons de l'eau non liée : le spectre montre un signal unique, moyenne des déplacements chimiques. Le dispositif expérimental du double tube permet donc d'observer le signal de l'eau non liée différencié du signal déplacé chimiquement par le complexe. Pour ce faire, l'échantillon contenant le complexe en solution est placé dans un tube de verre RMN de 5 mm de diamètre à l'intérieur duquel est glissé un tube coaxial prolongé d'un capillaire fermé contenant une solution de D_2O qui permet également les réglages RMN (Wilmad®, Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

A 25°C et à une concentration en complexe donnée, le spectre ^1H RMN est acquis dans une gamme de fréquence de déplacement chimique entre -50 et +50 ppm.

Spectres CEST

Les spectres CEST (CEST pour chemical exchange saturation transfer) des agents lipoCEST ont été effectués sur une gamme de fréquence de déplacement chimique entre -50 et +50 ppm. Toutefois, toute la séquence a été précédée d'un temps de délai de 15s et d'une impulsion de saturation B_1 appliquée pendant 3 s. Comme indiqué dans la partie bibliographique (chapitre III), cette méthode permet d'observer et de mesurer les variations de l'intensité du signal de l'eau et de déduire l'efficacité du transfert d'aimantation (saturation transfer value (ST %)) qui peut être calculée pour chaque valeur de déplacement chimique de façon symétrique :

$$\text{ST}\% = (1 - I_{\omega} / I_{-\omega}) \times 100 \quad [10]$$

Où I_{ω} et $I_{-\omega}$ indiquent deux mesures de l'intensité du signal de l'eau à deux valeurs de déplacement chimique ω et $-\omega$ symétriques par rapport au centre du signal de l'eau (origine zéro des fréquences fixée).

Les différentes températures explorées ont été 8°C, 25°C, et 37°C. Cette dernière température (37°C) a été la température fixée par défaut afin d'effectuer la majorité des mesures à la température du corps humain.

VII-3 Imagerie par résonance magnétique

Les images IRM ont été acquises au laboratoire d'imagerie et de spectroscopie (LRMN) de NeuroSpin au CEA de Saclay (à Gif-sur-Yvette). L'appareil IRM (Bruker, Ettlingen, Allemagne) possède un champ de 7,05 T.

Les échantillons fantômes contenant les différentes préparations de liposomes LipoCEST ont été conditionnés dans des corps de seringues TERUMO (1 mL; 0.4 cm×5.8 cm) fermées de façon étanche en veillant à ce qu'aucune bulle d'air ne soit formée. Les tubes sont regroupés dans un porte-échantillon cylindrique (3cm de diamètre) contenant un liquide inerte du point de vue de la réponse en ^1H RMN (tétra-fluorure de carbone Fluorinert® FC-40, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Les images sont acquises à 37°C, et la température contrôlée à l'aide d'un système à air pulsé. La routine Bruker "Mapshim" a été utilisée pour atteindre une largeur de signal de 20 Hz pour un voxel de 5x5x5 mm³.

Des images pondérées T_2 ont été acquises, ainsi que des images CEST. Une séquence MSME pour « *multislice-multiecho* » a été utilisée ($T_R = 5000$ ms, 12 échos séparés avec $T_{E1} = 8$ ms, résolution spatiale de $300 \times 300 \times 1000 \mu\text{m}^3$, temps d'acquisition = 6 min) avec un module de saturation additionnel appliqué en ON et OFF : ON pour les images acquises avec présaturation (signal = image_{ON}) et OFF sans présaturation (signal = image_{OFF}). La fréquence optimale de saturation δ_{sat} , et la puissance d'impulsion B_1 associée ont été déterminés expérimentalement en traçant une cartographie 2D permettant de représenter l'efficacité du transfert de saturation du signal en fonction de la valeur de B_1 (1 à $12 \mu\text{T}$) et de la fréquence de déplacement chimique δ_{sat} (balayée de 20ppm à -20ppm). Le rapport de transfert d'aimantation (RTA) a été calculé à partir des valeurs moyennes du signal sur les régions d'intérêt tel que : $\text{RTA} = (\text{image}_{\text{OFF}} - \text{image}_{\text{ON}}) / \text{image}_{\text{REF}}$. Le signal de référence (image_{REF}) correspond à une acquisition effectuée à une fréquence d'irradiation fixée en dehors de la gamme correspondant aux protons échangeables. Le module de présaturation est constitué d'un enchaînement de 3 impulsions de 128 ms (durée totale du module de saturation : 384 ms.) A chaque impulsion, le module est répété de façon à ce que le signal des protons ayant subi un déplacement chimique puisse être sélectivement saturé environ 80% du temps. De plus, afin d'assurer que la relaxation de l'aimantation longitudinale soit maximale entre chaque répétition, T_R est choisi de sorte à être suffisamment long.

La même procédure instrumentale a été appliquée aux deux expériences d'imagerie *in vivo* sur des rats Wistar mâles. La fréquence d'irradiation a été fixée à 6 ppm avec une impulsion de saturation de $7,4 \mu\text{T}$. Pendant toute la durée d'acquisition, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'un mélange air/dioxygène (50:50) additionné d'isoflurane (1-3%). Leur respiration a été contrôlée par moniteur et leur température maintenue à 37°C en utilisant de l'air régulé thermiquement et pulsé dans l'antenne où étaient placés les animaux. Pour l'expérience visualisant le devenir d'agents LipoCEST après administration par voie intraveineuse, cette dernière a été pratiquée dans la veine caudale du rat après une première acquisition pré-injection sans modifier la position de l'animal dans l'imageur. Les détails complémentaires des expériences seront donnés dans les chapitres correspondants plus loin dans le texte.

VII-4. Mesures de relaxivité

Les temps de relaxation T_1 ont été mesurés à 7.05T (300MHz en fréquence de Larmor du proton) et à 37°C grâce à un relaxomètre Minispec AMX-300 (Bruker, France).

Les temps de relaxation T_1 sont automatiquement calculés par l'appareil en séquence inversion-récupération, avec 20 points et quatre acquisitions pour chaque mesure.

Afin d'affiner d'avantage les résultats, les paramètres RD (relaxation delay), 1^{er} pulse et pulse final (Figure 23) sont optimisés manuellement pour chaque échantillon afin d'avoir la meilleure qualité de signal.

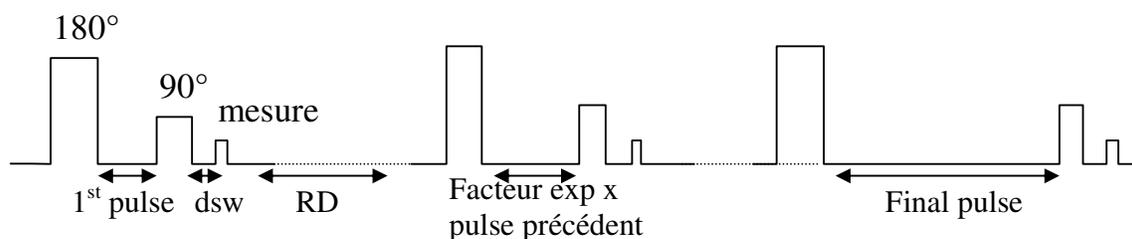


Figure 39 : Schéma de la séquence Inversion récupération utilisée par le relaxomètre pour les mesures de T_1

Le tampon sans liposome permet de régler l'appareil (Shim, réglage des impulsions, amplification). Les échantillons sont introduits à raisons de 100 μL dans des réducteurs en verre de 2 mm de diamètre (20 mm de longueur), eux-mêmes introduits dans des tubes d'analyse en verre de 5 mm de diamètre (150 mm de longueur). Les analyses ont été effectuées 3 fois sur le même échantillon (écart type de 2%). Pour des échantillons différents d'une même préparation, l'écart-type est de 5%.

PARTIE III : Résultats expérimentaux

I. Perméabilité membranaire

I-1 Méthode d'étude

Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre IV de la partie bibliographique, plusieurs méthodes ont été développées pour accéder à la perméabilité à l'eau de membranes lipidiques. La méthode que nous avons retenue utilise la mesure de relaxivité [Huster et al. 1997; Fossheim et al 1999]. Le principe consiste à encapsuler un composé paramagnétique dans des liposomes dont on veut étudier la perméabilité de membrane. Ce composé modifie les temps de relaxation de l'aimantation des protons de l'eau, notamment le temps de relaxation longitudinale T_1 , de sorte que l'on puisse distinguer les deux types d'eau selon leur position par rapport à la membrane (compartiment interne ou milieu externe des liposomes). Pour ce faire nous avons utilisé le prohance® ou complexe de Gd(III) avec le ligand HPDO3A (Figure 1).

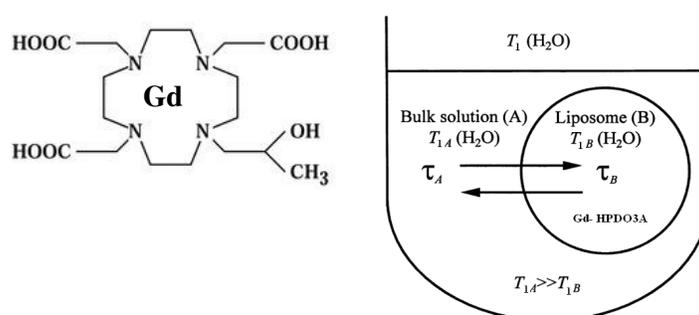


Figure 40 : Structure chimique du complexe [Gd(III)-HPDO3A, H₂O] ou prohance® et représentation schématique du système d'étude pour déterminer la perméabilité de membrane de liposomes à l'eau [adapté de Huster et al. 1997].

Expérimentalement il s'agit de déterminer le temps de relaxation T_1 des protons de l'eau d'un échantillon contenant une dispersion aqueuse de liposomes chargés d'une quantité connue de Gd-HPDO3A pour remonter aux paramètres de déplacement des molécules d'eau entre l'eau externe B et le compartiment interne A des liposomes.

L'échange d'eau entre les deux compartiments dépend directement du temps de résidence τ_B de l'eau dans le compartiment B. L'équation suivante établit la relation entre la relaxivité $1/T_1$ mesurée sur l'échantillon et le temps de résidence τ_B que l'on cherche à connaître:

$$1/T_1 = f/(\tau_B + T_{1B}) + 1/T_{1A} \quad [1]$$

Où les temps de relaxation T_{1A} et T_{1B} sont déterminés indépendamment à partir d'un échantillon d'eau libre (T_{1A}) et d'un échantillon constitué d'une solution aqueuse de Gd-HPDO3A à la même concentration que celle contenue dans les liposomes (T_{1B}). Le paramètre f est la fraction volumique occupée par les liposomes ($f = V_B/V_A$, V_B étant le volume interne total de solution piégée par les liposomes contenus dans l'échantillon et V_A le volume total d'échantillon). Dans l'équation [1], le temps T_{1B} dépend de la concentration intra-liposome C_i en composé paramagnétique, tel que :

$$T_{1B} = 1/(r_{1Gd-HPDO3A} \times C_i) \quad [2]$$

Où $r_{1Gd-HPDO3A}$ est la relaxivité propre du complexe dans le milieu aqueux (unité : $[s.mol/L]^{-1}$). La concentration intra-liposome C_i est supposée équivalente à la concentration de la solution aqueuse d'hydratation du film lipidique utilisé lors de la préparation des liposomes.

L'équation [1] peut donc s'écrire :

$$1/T_1 - 1/T_{1A} = f/(\tau_B + T_{1B}) \quad [5]$$

Soit :
$$1/(1/T_1 - 1/T_{1A}) = \tau_B/f + 1/(r_{1Gd-HPDO3A} C_i f) \quad [6]$$

Ainsi, d'après l'équation [6] et comme décrit dans la littérature [Fossheim et al 1999 ; Terreno et al. 2008], il a été proposé qu'en fixant la fraction volumique f et le diamètre des vésicules, en incrémentant la valeur de la concentration de complexe encapsulé C_i il était possible d'obtenir une relation linéaire dont l'ordonnée à l'origine donnait la valeur de τ_B . Une variante de la méthode consiste à fixer la concentration C_i et faire varier f en changeant le diamètre des liposomes. Or, ces deux approches présentent une source d'incertitudes puisqu'une part il est difficile de maîtriser la reproductibilité en taille de liposomes et d'autre part l'effet de confinement du composé paramagnétique piégé à l'intérieur des liposomes peut engendrer une réponse affectée par la concentration intra-liposome.

De plus, dans les études reportées, la fraction volumique f est estimée par le calcul théorique du volume interne des vésicules utilisées ce qui ajoute une approximation supplémentaire surtout quand la composition de la membrane est complexe.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis au point une méthode dérivée de celle qui était présentée dans la littérature, de manière à nous affranchir davantage des risques d'incertitudes. D'après l'approche théorique développée dans la Partie 2, chapitre IV, nous avons montré que la fraction volumique f d'une population de liposomes de concentration totale en lipides $[Lip]_{tot}$ est proportionnelle à la concentration en lipides, tel que :

$$f = [Lip]_{tot} \cdot N_a \cdot V_{mol} (R-2L-e)^3 / [(R-L)^3 + (R-L-e)^3] \quad [7]$$

Où N_a est le nombre d'Avogadro. Dans cette relation, V_{mol} (volume moléculaire des lipides), R (rayon des vésicules), e (épaisseur d'une bicouche membranaire), L (longueur de la brosse de chaînes de PEG éventuellement présente en surface des liposomes) sont des valeurs constantes pour une population de liposomes de taille (distribution de taille) donnée et de composition donnée. De ce fait, l'équation [7] peut s'écrire plus simplement comme suit :

$$f = [\text{Lip}]_{tot} \cdot K_{liposome} \quad [8]$$

$$\text{avec } K_{liposome} = N_a \cdot V_{mol} (R-2L-e)^3 / [(R-L)^3 + (R-L-e)^3] \quad [9]$$

$K_{liposome}$ est une constante pour une population de liposomes donnée.

La valeur de $K_{liposome}$ peut être quant à elle déduite de la détermination expérimentale de la fraction volumique f_{exp} correspondant à la préparation initiale de liposomes, par simple dosage de la quantité de composé paramagnétique contenu dans la préparation de liposomes avant et après purification sur colonne d'exclusion stérique (cf Partie 2 chapitre IV). En effet, en faisant l'hypothèse (vérifiée) que lors de l'encapsulation de l'agent paramagnétique, la concentration interne C_i est égale à la concentration d'hydratation des lipides, la fraction volumique des liposomes dans la préparation initiale est égale au rendement d'encapsulation r défini comme le rapport de la quantité d'agent piégé par les vésicules ($n_{agent\cdot intra}$) et la quantité totale initiale d'agent contenue dans le milieu d'hydratation ($n_{agent\cdot initial}$) avant leur purification par chromatographie d'exclusion stérique.

La détermination de r permet d'avoir la valeur expérimentale f_{exp} :

$$f_{exp} = r = (n_{agent\cdot intra}) / (n_{agent\cdot initial}) \quad [10]$$

$$\text{Ainsi : } K_{liposome} = r / [\text{Lip}]_{tot, initiale} \quad [11]$$

Où $[\text{Lip}]_{tot, initiale}$ est la concentration en lipides totale de la préparation de liposomes initiale. La fraction volumique f de la même préparation mais diluée à une concentration en lipides connue $[\text{Lip}]_{tot}$ est aisément calculée à partir des équations [8], [10] et [11]:

$$f = r \cdot [\text{Lip}]_{tot} / [\text{Lip}]_{tot, initiale} \quad [12]$$

Le rapport $[\text{Lip}]_{tot} / [\text{Lip}]_{tot, initiale}$ correspond au facteur de dilution des liposomes.

Ainsi, à partir d'une même préparation de liposomes encapsulant une concentration connue de composé paramagnétique (concentration interne C_i), les mesures de temps de relaxation T_1 de différentes dilutions de cette préparation (différentes concentration en lipides) conduit à une loi expérimentale linéaire en fonction de f dont le coefficient directeur est $1/(\tau_B + T_{1B})$ (cf équation [5]).

T_{1B} est déterminé par l'équation [2] $T_{1B} = 1/(r_{1Gd-HPDO3A} \times C_i)$ et déduit expérimentalement de la courbe $1/T_1$ versus $C_{Gd-HPDO3A}$ tracée à partir de la mesure de T_1 en fonction de la concentration en Gd-HPDO3A en solution aqueuse.

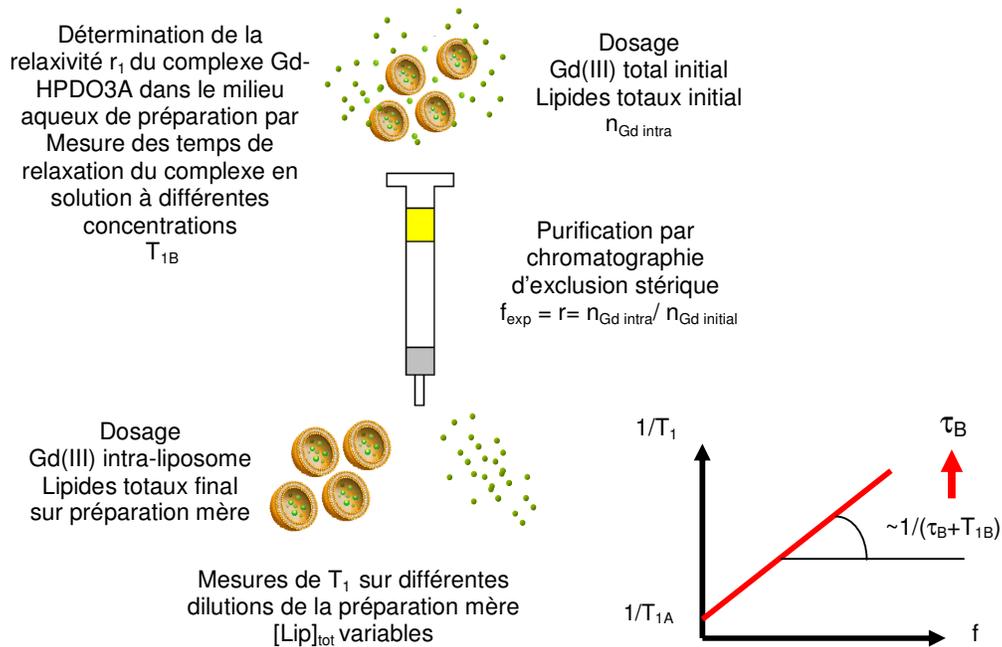


Figure 41 : récapitulatif de la méthodologie adoptée pour la détermination du temps de résidence τ_B de l'eau dans le compartiment interne des liposomes

Expérimentalement, la méthodologie que nous avons appliquée (Figure 2) a consisté, pour chaque membrane étudiée, à préparer des liposomes chargés de Gd-HPDO3A à une concentration parfaitement déterminée C_i . L'analyse des teneurs en Gd(III) et en lipides avant et après purification sur colonne d'exclusion stérique a permis de déterminer le rendement d'encapsulation de complexe r correspondant à la fraction volumique de référence des liposomes au sein de la préparation initiale ($f_{exp} = r$). Cette préparation a été diluée précisément et les teneurs en Gd(III) et lipides de chaque échantillon ont été contrôlées par dosage analytique. Dans cette procédure le milieu de dilution est le même que le milieu utilisé comme éluant pour la chromatographie d'exclusion stérique et composé d'un tampon Hepes 10 mM pH 7,4 contenant une concentration en NaCl ajustée à l'osmolarité de la solution de complexe initiale. Les fractions volumiques f de chaque échantillon ont été calculées à l'aide de l'équation [12] et le temps de relaxation T_1 des protons de l'eau a été mesuré pour chacun d'entre eux. La variation de $1/T_1$ en fonction de f a été tracée de manière à déterminer le temps de résidence τ_B à partir du coefficient directeur $p = 1/(\tau_B + T_{1B})$ de la droite obtenue:

$$\tau_B = 1/p - T_{1B} \quad [14]$$

Le coefficient de perméabilité P à l'eau peut alors être calculé à partir de la valeur de τ_B , du volume interne des liposomes V_{int} et de leur aire surfacique externe A [Reginald et al. 1997; Huster et al. 1997; Cho et al 2003; Fossheim et al 1999] l'aide de la relation:

$$P = V_{int}/A\tau_B \quad [15]$$

Le volume interne moyen des liposomes et leur aire surfacique peuvent être calculés avec une bonne estimation à partir du rayon hydrodynamique R_h déduit des mesures de diffusion quasi-élastique de la lumière (cf Partie 2 chapitre IV) :

$$V_{int} = 4\pi/3 (R_h - e - 2L)^3 \quad [16]$$

$$A = 4\pi r_h^2 \quad [17]$$

Où : e = épaisseur de la bicouche lipidique, L = épaisseur de la brosse de PEG₂₀₀₀ (éventuellement). Dans notre étude, nous avons pris : $L(\text{PEG}_{2000}) = 50 \text{ \AA}$ et $e=40 \text{ \AA}$ (liposomes sans cholestérol), ou $e = 45 \text{ \AA}$ (liposomes avec cholestérol) [valeurs moyennes estimées d'après les données du Tableau 4, Partie 2 chapitre IV].

I-2 Résultats

► Choix de la concentration interne en composé paramagnétique Gd-HPDO3A

La concentration interne de Gd-HPDO3A doit être choisie suffisamment importante pour obtenir des mesures suffisamment sensibles tout en étant assez basse pour éviter d'augmenter la viscosité de la solution interne, viscosité qui influencera la mesure du temps de résidence de l'eau dans le liposome. En effet, la littérature indique que la viscosité de la solution de Gd-HPDO3A influence les temps de corrélation de diffusion et de rotation des molécules risquant de fausser les mesures de T_1 [Fossheim et al, 1999]. Ainsi la viscosité de solutions de Prohance® interfère à partir d'une concentration voisine de 250 mM. Lors de notre étude, deux concentrations ont été utilisées : 50 mM et 100 mM.

► Détermination de $r_{1 \text{ Gd-HPDO3A}}$ et de T_{1A}

La Figure 3 montre la courbe de variation de la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$ de solution aqueuse de Prohance® dans du tampon HEPES 10 mM pH 7,4, en fonction de la concentration en complexe à 37°C et dans des conditions iso-osmolaires ajustées à une solution de NaCl 300 mOsm. On obtient une droite dont le coefficient directeur correspond à $r_{1 \text{ Gd-HPDO3A}}$, trouvée ici égale à $3,17 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (coefficient de régression linéaire = 1). La parfaite linéarité de la courbe de la Figure 3 confirme que jusqu'à 100 mM, la viscosité de la solution ne modifie pas la relaxivité du composé paramagnétique.

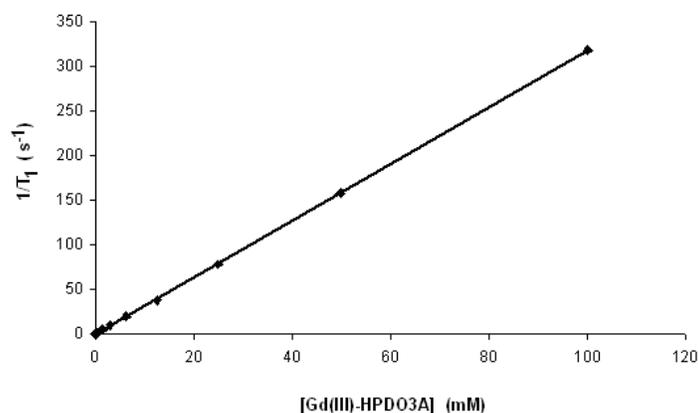


Figure 3: Loi de relaxivité longitudinale du Prohance® dans un milieu iso-osmolaire à tampon HEPES 10 mM pH 7,4 à 37°C avec pour coefficient directeur $r_{\text{Gd-HPDO3A}} = 3,1704 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$; $R^2 = 1$)

► Application détaillée : liposomes de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀

Afin d'expliciter pas à pas notre procédure, nous prenons l'exemple de liposomes dont la membrane est composée d'une bicouche mixte EPC/DSPE PEG₂₀₀₀ (95 :5 % en mole) de concentration totale en lipides initiale 20,1±0,5 mM et encapsulant une solution de Gd-HPDO3A à 112,9±1,7 mM. Après passage sur la colonne d'exclusion stérique qui élimine le complexe non encapsulé, la concentration en Gd-HPDO3A finale recueillie est de 2,08±0,03 mM pour une concentration totale en lipides de 4,63±0,12 mM. Ceci conduit un rendement d'encapsulation de $r = 2,08 \times (20,1/4,63) / 112,9 = 0,0799$. La population de liposomes présente un diamètre hydrodynamique moyen de 271,6 ± 14,2nm. Quatre échantillons sont progressivement dilués à partir de la population recueillie en sortie de colonne et les temps de relaxation T₁ sont mesurés à 37°C. Le Tableau 1 rassemble les données nécessaires à la construction de la courbe présentée Figure 4 et qui correspond à la loi de variation de 1/T₁ en fonction de la fraction volumique f de chaque échantillon analysé. La courbe obtenue est une droite comme attendu d'après l'équation [5] ce qui vérifie parfaitement notre hypothèse de travail. Le coefficient directeur p, égal à 1/(τ_B+T_{1B}) est trouvé de $p = 3,027 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (coefficient de régression linéaire = 0,9999).

Tableau 1: Paramètres caractéristiques des échantillons de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % en mole) en fonction de la concentration en lipides totale déterminée par ICP-AES.

[Lip]_{tot} (mM)	temps de relaxation T₁ (s)^a	vitesse de relaxation 1/T₁ (s⁻¹)	fraction volumique^b f
4,63±0,12	0,1706±0,0027	5,86±0,09	1,840 10 ⁻²
2,30±0,06	0,3250±0,0049	3,08±0,05	0,914 10 ⁻²
1,16±0,03	0,5870±0,0088	1,70±0,03	0,461 10 ⁻²
0,57±0,01	1,0150±0,0152	0,99±0,01	0,227 10 ⁻²
0,29±0,01	1,5980±0,0024	0,63±0,01	0,115 10 ⁻²

^amesuré par relaxométrie à 37°C ; ^bcalculée à partir de l'équation [12]

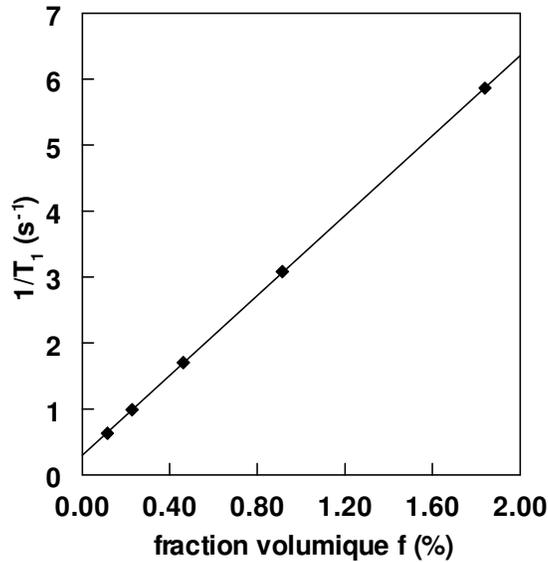


Figure 4 : variation de la vitesse de relaxation $1/T_1$ obtenue pour chaque échantillon de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % en mole) e en fonction de la fraction volumique f correspondante.

La valeur de p permet de calculer τ_B (d'après l'équation [14]) en tenant compte de T_{1B} déduit de la relaxivité du Gd-HPDO3A $r_{1 \text{ Gd-HPDO3A}} = 3,17 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 2) et de la concentration interne en complexe paramagnétique $C_i = 112,9 \text{ mM}$:

$$\tau_B = 1/p - T_{1B} = 5,096 \cdot 10^{-4} \text{ s}$$

$$\text{Soit } \tau_B = 509,6 \text{ } \mu\text{s}$$

La perméabilité P peut être alors estimée à partir des équations [15-17].

$$P = 1/3 (R_h - e - 2L)^3 / \tau_B R_h^2$$

$$\text{Soit : } P = 6,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

En prenant $R_h = 1358 \pm 136 \text{ \AA}$; $e = 40 \text{ \AA}$; $L = 50 \text{ \AA}$. L'incertitude sur le résultat ne tient compte que de la largeur de distribution de taille des liposomes.

► Temps de résidence de l'eau et perméabilité membranaire : bilan des résultats

Plusieurs préparations de liposomes ont été étudiées (Figure 5), composées respectivement d'EPC (100% en mole) (trois distributions de taille différentes), de EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % en mole) (également trois distribution de taille différentes) et de EPC/CHOL/DPSE PEG₂₀₀₀ (68:27:5 %) (trois distributions de taille) ou (60:35:5 % en mole) (une seule distribution de taille).

Nous avons également examiné le cas d'une membrane supposée présenter une perméabilité à l'eau satisfaisante pour construire un système LipoCEST. En effet, cette membrane est composée de POPC/DPPG/CHOL (70:10:20 % en mole) (une seule distribution de taille), soit trois lipides imperméabilisant à la température de travail. Toutes les expériences ont été réalisées à 37°C pour se placer dans des conditions de température physiologiques.

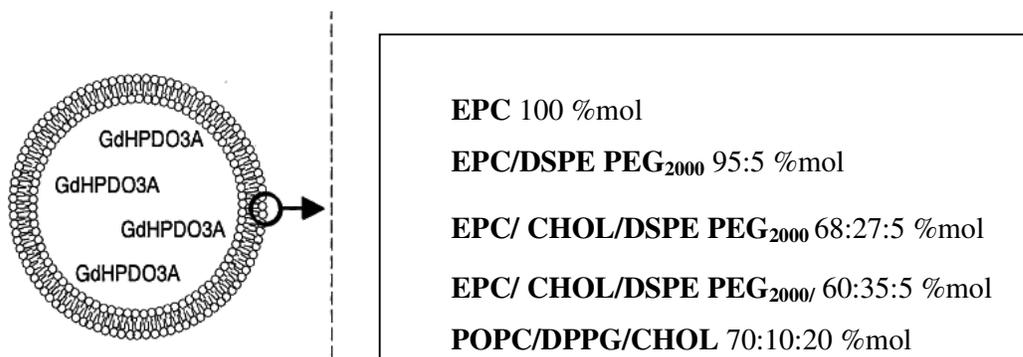


Figure 5 : Systèmes étudiés : différentes compositions. EPC : Egg phosphatidylcholine; DSPE-PEG₂₀₀₀ : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]; CHOL : cholestérol; DPPG :1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol); POPC :1-hexadecanoyl-2-(octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine.

Le Tableau 2 regroupe les caractéristiques des liposomes, les conditions expérimentales et les paramètres τ_B et P calculés à partir des courbes donnant la loi de variation de $1/T_1$ en fonction de f reportées Figure 6.

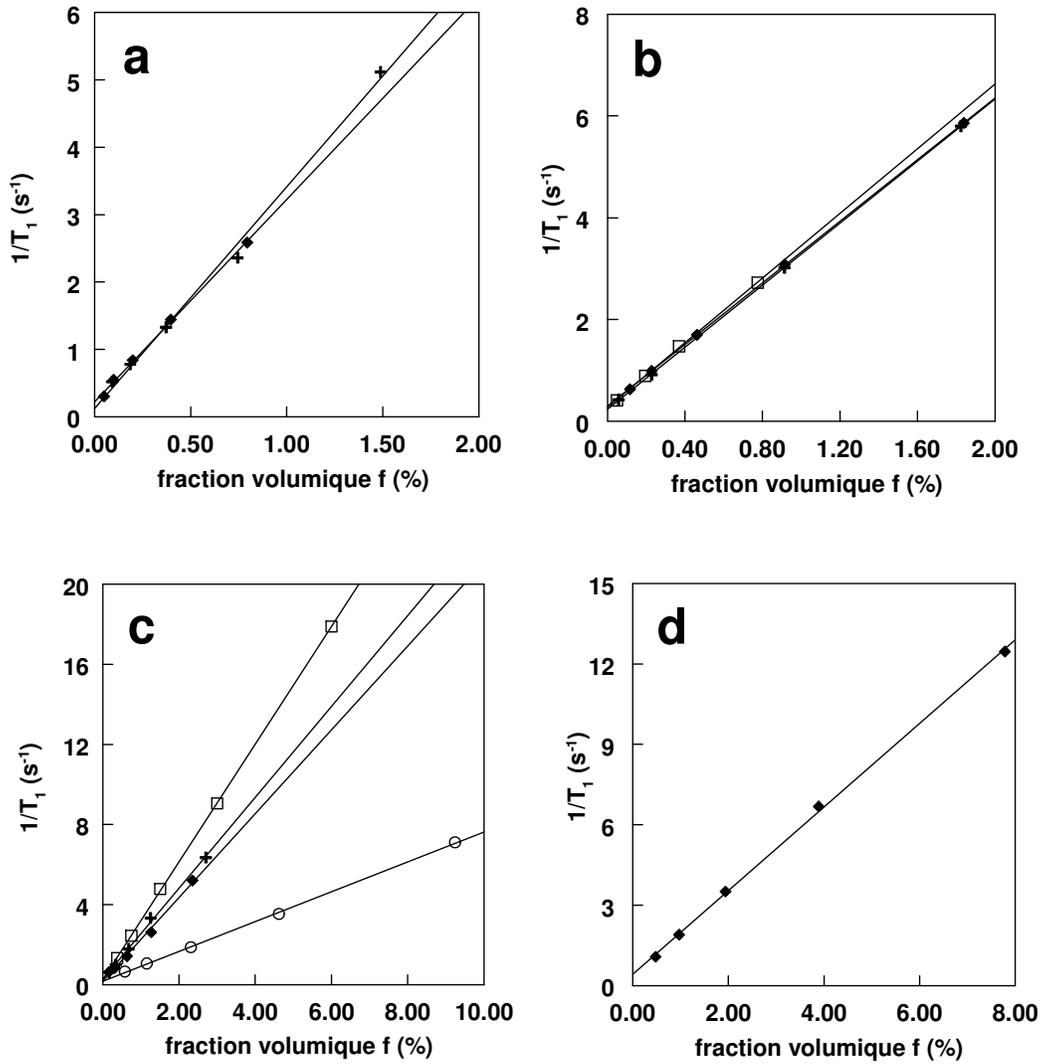


Figure 6 : Courbes expérimentales de la variation de $1/T_1$ (à 37°C) en fonction de la fraction volumique f pour les différentes membranes étudiées. (a) EPC 100mol% ($d_h = \blacklozenge$ 339,9 nm ; $+$ 240,8 nm) ; (b) EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ ($d_h = \blacklozenge$ 271,6 nm ; $+$ 210,1 nm ; \square 165,1 nm) ; (c) EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (27mol% CHOL : $d_h = \blacklozenge$ 268,7nm ; $+$ 210,8 nm ; \square 168,3 nm) et (35mol% CHOL : $d_h = \bullet$ 268,7nm) ; (d) POPC/DPPG/CHOL ($d_h = \blacklozenge$ 262,0 nm). Toutes les régressions linéaires ont un coefficient de corrélation compris entre 0.999 et 0.9999.

Tableau 2 : Temps de résidence τ_B de l'eau dans les liposomes et perméabilité P des membranes à l'eau à 37°C, en fonction de leur composition et du diamètre des liposomes. La valeur de T_{1B} est déduite de l'équation $1/(r_{1Gd-HPDO3A} \times C_i)$, avec $r_{1Gd-HPDO3A} = 3,17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

membrane^a diamètre moyen d_h rendement encapsulation r [Gd-HPDO3A] interne C_i	T_{1B} (μs)	τ_B (μs)	P (cm.s^{-1})
EPC 100 %mol $d_h = 213,7 \pm 10,6 \text{ nm}$ $r = 0,0842 \quad C_i = 108,4 \text{ mM}$	2911,1	- ^b	- ^b
EPC 100 %mol $d_h = 240,8 \pm 12,0 \text{ nm}$ $r = 0,0660 \quad C_i = 104,2 \text{ mM}$	3028,4	14,3	$2,54 \cdot 10^{-1}$
EPC 100 %mol $d_h = 339,9 \pm 17,0 \text{ nm}$ $r = 0,0632 \quad C_i = 99,9 \text{ mM}$	3155,6	174,8	$3,02 \cdot 10^{-2}$
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 %mol $d_h = 165,1 \pm 8,1 \text{ nm}$ $r = 0,0334 \quad C_i = 101,5 \text{ mM}$	3108,1	34,4	$4,2 \cdot 10^{-2}$
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 %mol $d_h = 210,1 \pm 13,6 \text{ nm}$ $r = 0,0628 \quad C_i = 104,5 \text{ mM}$	3017,4	262,4	$8,7 \cdot 10^{-3}$
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 %mol $d_h = 271,6 \pm 13,6 \text{ nm}$ $r = 0,0799 \quad C_i = 112,9 \text{ mM}$	2794,1	509,5	$6,4 \cdot 10^{-3}$
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 68:27:5 %mol $d_h = 168,3 \pm 8,4 \text{ nm}$ $r = 0,1618 \quad C_i = 101,1 \text{ mM}$	3119,8	287,6	$5,5 \cdot 10^{-3}$
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 68:27:5 %mol $d_h = 210,8 \pm 10,5 \text{ nm}$ $r = 0,0599 \quad C_i = 104,9 \text{ mM}$	3006,4	1722,3	$1,3 \cdot 10^{-3}$
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 68:27:5 %mol $d_h = 268,7 \pm 13,4 \text{ nm}$ $r = 0,0597 \quad C_i = 103,8 \text{ mM}$	3039,6	2099,2	$1,5 \cdot 10^{-3}$
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 60:35:5 %mol $d_h = 235,3 \pm 12,7 \text{ nm}$ $r = 0,0918 \quad C_i = 49,6 \text{ mM}$	6359,7	7047,9	$3,7 \cdot 10^{-4}$
POPC/DPPG/CHOL 70:10:20 %mol $d_h = 262,6 \pm 13,1 \text{ nm}$ $r = 0,1484 \quad C_i = 50,6 \text{ mM}$	6239,7	179,8	$2,2 \cdot 10^{-2}$

^a Pour le calcul de P selon les équations [15-17], les paramètres de membrane sont les suivants : $L(\text{PEG}_{2000}) = 50 \text{ \AA}$; $e(\text{EPC}) = 40 \text{ \AA}$; $e(\text{EPC/CHOL}) = 45 \text{ \AA}$; $e(\text{POPC/DPPG/CHOL}) = 44 \text{ \AA}$; valeurs moyennes estimées d'après les données du Tableau 4, Partie 2 chapitre IV et d'après [Hodzic et al 2008 ; Pan et al. 2012].

^b ces valeurs n'ont pu être déterminées dans les conditions choisies (τ_B limite)

I-3 Discussion

➤ Commentaires sur les résultats obtenus

D'après les résultats du Tableau 2, la membrane formée uniquement d'EPC semble très perméable à l'eau à la température de 37°C. Les temps de résidence déduits de nos expériences sont très courts de sorte que même avec une concentration interne voisine de 100 mM en complexe paramagnétique, il est difficile de suivre le flux des molécules d'eau depuis l'intérieur des liposomes (compartiment B) jusque l'extérieur (compartiment A). Seuls les liposomes de plus grands diamètres ont conduit à une détermination de la perméabilité. Celle-ci est très importante pour les liposomes de 240 nm de diamètre et bien au-dessus des valeurs trouvées pour des membranes de phosphatidylcholines dans leur état fluide dont le coefficient de perméabilité à l'eau est compris entre $3 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-2}$ cm/s selon la nature des chaînes et la température [Dordas et Brown, 2000 ; Olbrich et al 2000 ; Rawicz et al 2008]. Il est possible, que dans ce cas également, nos conditions de mesure soient encore limites pour conduire à un résultat raisonnablement fiable. Par contre les liposomes de 339 nm de diamètre présentent une perméabilité à l'eau voisine de $3 \cdot 10^{-2}$ cm/s plus compatible avec les données de la littérature et qui se place parmi les plus élevées. A noter également que la température de 37°C à laquelle nous avons opéré peut expliquer l'écart avec les valeurs déjà publiées par d'autres auteurs.

Lorsque l'on introduit 5% en mole de DSPE-PEG₂₀₀₀, les temps de résidence de l'eau à l'intérieur des liposomes apparaissent globalement plus grands. La perméabilité a pu être déterminée pour les différentes populations examinées et a été trouvée, selon le diamètre des liposomes, comprises entre $6,4 \cdot 10^{-3}$ et $4,2 \cdot 10^{-2}$ cm/s, soit inférieure à celle estimée pour une membrane non PEGylée. Ce résultat pourrait être lié à la présence des chaînes de polymère hydrophile qui pourraient contribuer à freiner l'eau au niveau de leur sphère d'hydratation lors de son passage à travers la membrane des liposomes. L'existence d'une couche d'eau peu mobile de part et d'autre de la bicouche a été en effet mise en évidence et pourrait influencer la perméabilité à l'eau des liposomes [Tirosh et al 1998 ; Hashizaki et al 2003].

L'insertion de cholestérol à une proportion de 27% en mole imperméabilise nettement la membrane des liposomes puisque les perméabilités à l'eau chutent dans un intervalle compris entre $1,3 \cdot 10^{-3}$ et $5,5 \cdot 10^{-3}$ cm/s, selon la taille des liposomes, soit pour diamètre équivalent, d'un facteur compris entre 5 et 10. Ceci se traduit également par une augmentation notable des temps de résidence τ_B des molécules d'eau dans le compartiment intra-liposome.

Ce comportement est renforcé lorsque l'on augmente la proportion de cholestérol à 35% en mole puisque le temps de résidence est multiplié par un facteur supérieur à 10 à dimension de vésicules égale par rapport à une membrane sans cholestérol et la perméabilité chute d'autant. Ce résultat rejoint l'ordre de grandeur trouvé dans la littérature [Terreno et al. 2008 ; Rawicz et al 2008]. Le rôle imperméabilisant du cholestérol vis-à-vis des molécules d'eau ou d'autres solutés hydrophiles a été largement démontré et s'explique par l'effet condensant de ce lipide dont l'insertion au sein d'une bicouche de phospholipides réduit considérablement la mobilité de leurs chaînes hydrocarbonées et favorise leur rapprochement, défavorable au passage de l'eau [Finkelstein 1976 ; Mathai et al 2008 ; Saito et Shinoda 2011]. De façon surprenante, les liposomes POPC/DPPG/CHOL attendus comme imperméables en raison de leur teneur en DPPG, lipide présentant une température de transition de phase élevée (42 °C) et en cholestérol [Fossheim et al 1999] ne montrent pas une telle imperméabilité trouvée ici voisine de $2,2 \cdot 10^{-2}$ cm/s pour une dimension moyenne de liposomes de 260 nm.

La Figure 7 reprend les valeurs des paramètres τ_B et P en fonction de la composition des membranes et du diamètre moyen des liposomes. Il apparaît clairement que le temps de résidence de l'eau dans les liposomes et leur perméabilité dépendent non seulement de la composition lipidique des bicouches mais également du diamètre des liposomes. Ainsi, dans le cas des liposomes EPC, EPC-DSPE-PEG₂₀₀₀ et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ plus les vésicules sont petites, plus elles sont perméables à l'eau, cet effet étant accentué pour des diamètres inférieurs à 200 nm. Ce résultat est cohérent avec la diminution du rapport surface sur volume des liposomes avec le rayon. En effet, des vésicules de plus grand rayon contiennent davantage d'eau pour une surface d'efflux proportionnellement plus faible, donc, à composition de membrane constante, il faut plus de temps à toute l'eau du compartiment intra-liposome pour sortir.

Cet effet est moins important lorsque le rayon des vésicules augmente (Figure 7a) en accord avec la loi de variation du rapport surface/volume en $1/\text{rayon}$. On retrouve en toute logique l'effet de taille sur la perméabilité (Figure 7b), à savoir plus le rayon du liposome est petit, plus la perméabilité à l'eau est importante. Néanmoins, pour un diamètre défini de liposomes il apparaît nettement que c'est la composition de la membrane qui gouverne la perméabilité.

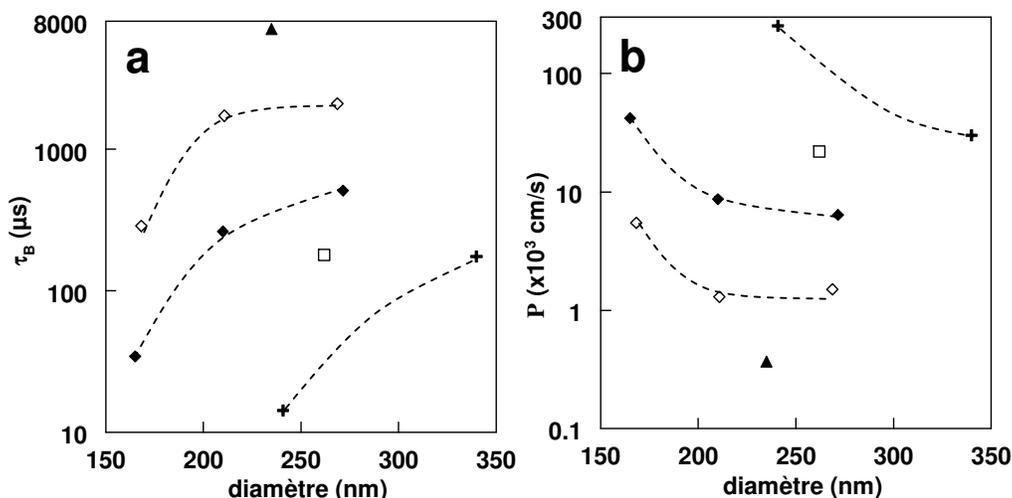


Figure 7: Temps de résidence de l'eau dans les liposomes τ_B (a) et perméabilité (b) membranaire en fonction du diamètre hydrodynamique moyen des vésicules. (+) EPC 100 mol% ; (◆) EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (90 :5 mol%) ; (◇) EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (68/27/5 mol%) ; (▲) EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (60/35/5 mol%) ; (□) POPC/DPPG/CHOL (70/10/20 mol%). Les lignes en trait pointillé sont des courbes de tendance.

Ces résultats sont en très bon accord avec l'étude réalisée par Zhao et ses collaborateurs qui ont mis en évidence l'influence de la taille de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ sur le temps d'échange de l'eau entre le compartiment intra-liposome et le milieu extérieur [Zhao et al 2008]. En particulier ils ont déterminé la perméabilité à l'eau de liposomes de diamètre 199 nm à l'aide de trois méthodes différentes. Ils ont trouvé une valeur comprise entre $9,9 \cdot 10^{-3}$ et $1,1 \cdot 10^{-2}$ cm/s à 22°C selon la méthode, très proche de la valeur que nous avons déterminée à 37°C pour des liposomes de 210 nm de diamètre de même composition, égale à $8,7 \cdot 10^{-3}$ cm/s. De façon tout à fait intéressante, l'étude de caractérisation que nous avons menée sur le système LipoCEST constitué de liposomes EPC/DSPE PEG₂₀₀₀ (95 :5 % en mole) encapsulant le complexe de thulium [Tm-III)-DO3A, (H₂O)₂] et détaillée dans le chapitre suivant, a conduit à un temps de résidence de l'eau de 370 μ s à 37°C pour un diamètre hydrodynamique moyen de liposome de $192,4 \pm 9,6$ nm, obtenu par une méthode de RMN CEST donc différente de la méthodologie utilisée ici. D'après la Figure 7a, cette valeur est en très bon accord avec les valeurs de τ_B trouvées pour des liposomes voisins de 200 nm de diamètre et confirme la validité de la méthode proposée dans ce chapitre.

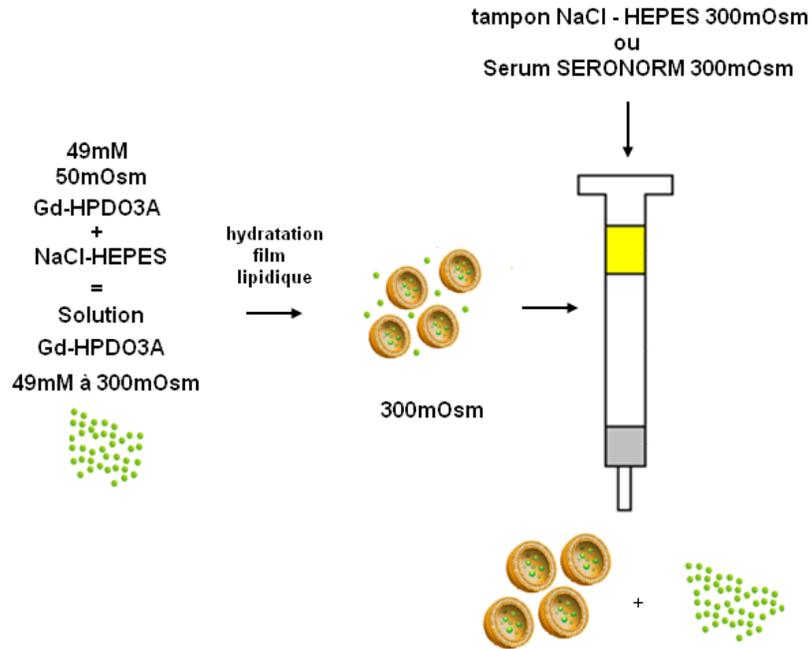


Figure 8 : Illustration du protocole de préparation des liposome chargé Gd-HPDO3A à 49mM complété en NaCl jusqu'à 300mOsm en présence d'HEPES pour le tampon. Les liposomes obtenus par hydratation d'un film lipidique par cette solution sont élués soit par un tampon Hepes 10 mM pH 7,4/NaCl 300mOsm, soit sur du Seronorm 300 mOsm.

Afin d'anticiper le comportement d'un agent LipoCEST PEGylé en milieu plasmatique et ici sa perméabilité membranaire en conditions isotoniques (milieu à 300 mOsm), nous avons réalisé l'expérience décrite par le schéma de la Figure 8. Des liposomes EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ encapsulant le même mélange de Prohance® à 49,0 mM et de tampon 10 mM HEPES pH 7,4 supplémenté en NaCl de sorte à atteindre une osmolarité équivalente à 300 mOsm, ont été synthétisés puis élués sur colonne d'exclusion stérique soit avec un milieu tampon 10 mM HEPES/145 mM NaCl, soit avec un milieu sérique commercial, le Seronorm®. Les mesures de T_1 ont été effectuées sur différentes dilutions des deux préparations récupérées en sortie de colonne.

La Figure 9 montre les courbes de variation de $1/T_1 - 1/T_{1A}$ versus f . On constate que ces courbes sont des droites conformément à la théorie (équation [1]) dont le coefficient directeur est très voisin, montrant que les deux systèmes présentent une perméabilité membranaire voisine et très peu affectée par la nature de milieux iso-osmolaires.

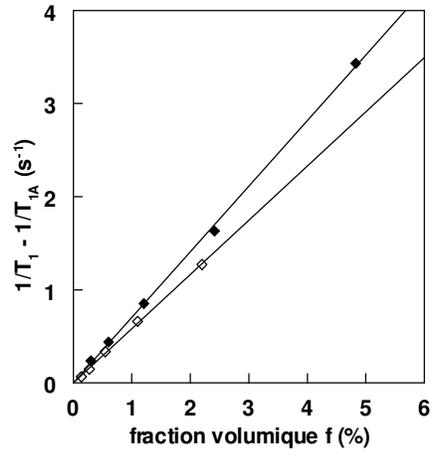


Figure 9: Courbes expérimentales de la variation de $(1/T_1 - 1/T_{1A})$ (à 37°C) en fonction de la fraction volumique f pour des liposomes EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (60:35:5 % mol) encapsulant une solution isotonique de Prohance® (300 mOsm) et baignant dans du tampon aqueux HEPES/NaCl à 300 mOsm (◆) ou dans du Séronorm®. (◇) Les régressions linéaires ont un coefficient de corrélation de 0.999.

Le Tableau 4 résume les résultats issus des courbes de la Figure 9 selon le traitement de données déjà décrits dans le paragraphe I-2 et en supposant que le coefficient de relaxivité du complexe Gd-HPDO3A est de $3,17 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. On note que le temps de résidence de l'eau dans le compartiment intra-liposome est plus long en milieu sérique. Ceci induit une valeur de perméabilité de la membrane à l'eau légèrement plus faible. Ce phénomène s'oppose à la tendance attendue par effet de taille des liposomes et pourrait être dû à une différence de viscosité des deux milieux aqueux utilisés.

Par ailleurs en comparant les résultats du Tableau 3 avec ceux du Tableau 2 pour des liposomes de même composition membranaire, on retrouve le même ordre de grandeur des perméabilités ce qui confirme la fiabilité de notre procédure. Les différences observées pourraient être liées à un effet de concentration en sel. Il serait intéressant de reproduire la même expérience sur d'autres membranes.

Tableau 3 : Temps de résidence τ_B de l'eau dans les liposomes et perméabilité P des membranes à l'eau à 37°C, pour des liposomes PEGylés contenant 35 % en mole de cholestérol dans leur membrane et une solution de Gd-HPDO3A ajustée à 300 mOsm par ajout de NaCl.

membrane ^a diamètre moyen d_h rendement encapsulation r [Gd-HPDO3A] interne C_i	T_{1B} (μ s)	τ_B (μ s)	P (cm.s^{-1})
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 60:35:5 %mol $d_h = 207,2 \pm 10,3$ nm r = 0,0351 $C_i = 49,0$ mM milieu 300 mOsm Hepes/NaCl	6442,3	7766,6	$2,8 \cdot 10^{-4}$
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 60:35:5 %mol $d_h = 188,2 \pm 9,6$ nm r = 0,0160 $C_i = 49,0$ mM milieu 300 mOsm /sernorm®	6442,3	10724,6	$1,8 \cdot 10^{-4}$

➤ Comparaison de la méthodologie proposée ici avec celle présentée dans la littérature

Le principe de mesurer la perméabilité membranaire à l'eau par détermination des temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau contenue dans des préparations de liposomes encapsulant du Prohance®, a été décrit et appliqué à des systèmes de membranes EPC/DSPE PEG₂₀₀₀ (95 :5 mol%) et EPC/CHOL/DSPE PEG₂₀₀₀ (70 :25 :5 mol%) [Fossheim et al. 1999 ; Terreno et al. 2008]. Cependant, pour incrémenter la valeur de la relaxivité $1/T_1$, les auteurs ont fait varier soit la concentration interne en complexe paramagnétique des liposomes tout en maintenant constante leur concentration en lipides et leur diamètre, soit la taille des liposomes à concentration interne constante. D'après nos résultats, la seconde procédure introduit une incertitude puisque nous avons mis en évidence que le temps de résidence de l'eau dans le compartiment intra-liposome dépend du diamètre des vésicules. Dans le cas de la première de ces options, l'incertitude provient de la maîtrise du diamètre des vésicules et de la distribution de tailles d'une préparation à l'autre.

La seconde source d'erreur possible provient du fait que la fraction volumique piégée par les liposomes est, dans ces études, issues du calcul théorique et non déterminée expérimentalement. Le temps de résidence trouvé dépend donc de la validité de ce calcul alors que dans notre méthodologie il est entièrement issu de mesures expérimentales (dosages précis des constituants des liposomes avant et après passage sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique) n'est pas directement déterminé.

EPC/CHOL/DPSE PEG₂₀₀₀ 70 :25 :5 %mol a permis de comparer les deux méthodes sur des membranes identiques et de justifier les avantages à changer de méthode.

Pour cela une seconde série de liposomes de concentration fixée en lipides mais différant par leur contenu interne en complexe a été préparée en conditions iso-osmotiques. Ensuite nous avons appliqué le formalisme décrit dans la littérature et déterminé les paramètres de fit de l'équation :

$$1/(1/T_1 - 1/T_{1A}) = \tau_B/f + 1/(r_{1 \text{ Gd-HPDO3A}} \times [\text{Gd}]_f) \text{ détaillée dans le chapitre partie I-1.}$$

La Figure 10 montre les courbes correspondant à la variation de $1/(1/T_1 - 1/T_{1A})$ en fonction de $1/(r_{1 \text{ Gd-HPDO3A}} \times [\text{Gd}]_f)$ pour les deux membranes (avec et sans cholestérol). A partir d'une régression linéaire, l'ordonnée à l'origine donne τ_B/f . La valeur du temps de résidence τ_B a donc été calculée en remplaçant f par sa valeur théorique explicitée dans la partie 2 (chapitre IV). La perméabilité P a été ensuite déterminée à partir de l'équation $P = 1/3 (R_h - e - 2L)^3 / \tau_B R_h^2$, en prenant le rayon hydrodynamique moyenné sur les différentes préparations de liposomes.

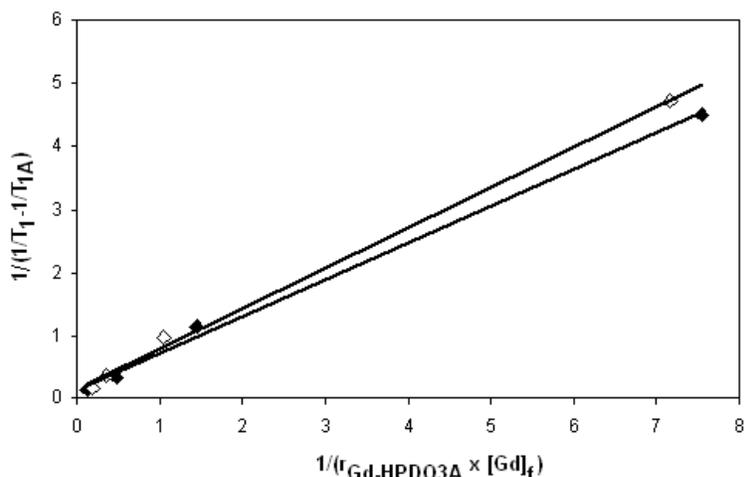


Figure 10 : Tracé du coefficient de relaxivité mesuré à 37°C en fonction du temps de relaxation des protons intra-liposome de liposomes de membrane EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (70 :25:5 mol%), de concentrations en Gd(III) (ramenées au volume total) égales à 2,51 ; 0,99 ; 0,28 ; 0,07 et 0,02mM (ordonnée à l'origine 0,1552 ; R²=0,9976) (◆) et de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%), de concentrations en Gd(III) (ramenées au volume total) égales à 1,70 ; 0,86 ; 0,30 ; 0,04 mM (ordonnée à l'origine 0,1175 ; R²=0,9969) (◇).

Le Tableau 4 rassemble les résultats obtenus à partir des deux méthodes. Pour chaque méthode prise séparément, on retrouve bien l'imperméabilisation de la membrane par incorporation de cholestérol. Cependant, pour une membrane donnée, on note un écart significatif entre les résultats issus des deux méthodes qui souligne l'impact de la procédure utilisant des liposomes différents de par leur contenu interne et l'utilisation d'une fraction volumique théorique.

Tableau 4 : Temps de résidence τ_B de l'eau dans les liposomes et perméabilité P pour des liposomes de membrane EPC-DSPE PEG₂₀₀₀ 95/5 % mol et EPC-CHOL-DSPE PEG₂₀₀₀ 70/25/5 % mol à 37°C par deux méthodes en fonction du diamètre des liposomes et avec $r_{\text{IGd-HPDO3A}} = 3,17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. La méthode développée dans la thèse fait varier la concentration totale en liposomes chargés avec une concentration intérieure en complexe de Gd(III) fixe ; la méthode de la littérature fait varier la concentration interne en complexe de Gd avec une concentration en liposome totale presque fixe.

Membrane		EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5% mol	EPC/CHOL/DSPE PEG ₂₀₀₀ 70 :25 :5% mol
Méthodologie littérature^a	Plage de diamètres (nm)	153,5-172,4	163,4-188,1
	[Gd(III)-HPDO3A] par rapport volume total	0,04-1,70 mM	0,02-2,51 mM
	τ_B (μs)	1138	2169
	P ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) ^a	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$
Méthodologie développée^b	diamètre moyen (nm)	165,3 \pm 8,1	168,3 \pm 8,4
	τ_B (μs)	34	288
	P ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) ^a	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$

^aLes résultats sont issus de nos expériences mais conduites selon le méthode proposée dans la littérature [Terreno et al. 2008 & Fosshem et al. 1999]

^b Pour le calcul de P selon les équations [15-17], les paramètres de membrane sont les suivants : L(PEG₂₀₀₀)= 50Å ; e(EPC)=40Å ; e(EPC/CHOL) =45Å ; e(POPC/DPPG/CHOL) = 44 Å ; valeurs moyennes estimées d'après les données du Tableau 4, Partie 2 chapitre IV et d'après [Hodzic et al 2008 ; Pan et al. 2012].

II. Systèmes LipoCEST PEGylés à base d'un complexe de Thullium(III) échangeant deux molécules d'eau, le [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂]

Rappelons qu'un système LipoCEST doit idéalement être constitué de liposomes dont la perméabilité membranaire à l'eau conduit à une constante d'échange suffisamment lente devant l'échelle de temps de la RMN, encapsulant un agent de shift paramagnétique le plus efficace possible (partie 1, chapitre IV). Ceci permet de distinguer le signal des protons de l'eau liée par rapport à celui des protons de l'eau des tissus dont le déplacement chimique peut varier dans un intervalle de 0 à 3 ppm en raison des agents DiaCEST endogènes. De plus, pour des applications biomédicales, le système doit respecter des conditions de milieu de préparation compatibles avec les milieux physiologiques, en particulier être isotoniques (iso-osmolaires avec le plasma sanguin) si on envisage une administration par voie intraveineuse. Dans ce dernier cas, le revêtement de chaînes de poly(éthylène glycol) permet de prolonger leur circulation plasmatique et donc d'atteindre la cible à imager en quantités suffisantes. Dans ce chapitre nous présentons un nouveau système, mis au point au cours de la thèse, dont les performances reposent pour l'essentiel sur le complexe encapsulé. Après avoir expliqué notre démarche de choix, nous décrirons les principaux résultats obtenus qui font l'objet d'un article rédigé en anglais suivi d'expériences complémentaires.

II-1 Choix du système

Le comportement paramagnétique d'un lanthanide dû à ses propriétés de susceptibilité magnétique et en particulier son efficacité à déplacer la fréquence de résonance des protons de l'eau (effet de shift), peuvent être appréhendés grâce à la méthode de mesure LIS (*lanthanide induced shifts*). Cette méthode permet de mesurer entre autres la constante de Bleaney, notée C_j , qui reflète la force des interactions entre l'ion Ln(III) et les atomes donneurs d'électrons. La valeur du déplacement chimique induit par le lanthanide étant directement proportionnelle à ce coefficient, il est alors possible en classant les lanthanides selon C_j d'identifier ceux qui seront les agents de shift les plus efficaces (Tableau 1) [Viswanathan et al. 2009].

Tableau 7 : Valeur de la constante de Bleaney C_j pour chaque lanthanide [Viswanathan et al. 2009].

Ln ³⁺	Ce ³⁺	Pr ³⁺	Nd ³⁺	Sm ³⁺	Eu ³⁺	Gd ³⁺	Tb ³⁺	Dy ³⁺	Ho ³⁺	Er ³⁺	Tm ³⁺	Yb ³⁺
C_j	-6.3	-11.0	-4.2	-0.7	4.0	0.0	-86	-100	-39	33	53	22

Les complexes de Ln(III) avec un même ligand linéaire, le DTPA, ont fait l'objet de mesures comparées des déplacements chimiques induits sur les protons de l'eau (Figure 1). L'efficacité en tant qu'agent de shift suit bien le classement selon la constante de Bleaney. Comme attendu, le déplacement chimique induit le plus fort est obtenu pour le complexe de dysprosium, puis celui de terbium, et en troisième position le complexe de thulium [Aime et al. 2006].

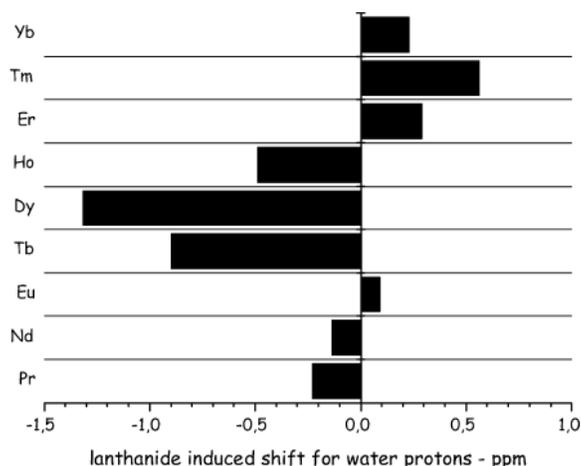


Figure 42 : Déplacements chimiques des protons de l'eau liée au lanthanide d'un complexe [Ln(III)-DTPA, H₂O] (100mM) mesurés à 25°C à 14T [Aime et al. 2006]. La référence à déplacement chimique nul correspond au signal de l'eau libre.

Le ligand DTPA qui est linéaire ne permet pas une orientation optimale de la molécule d'eau de coordination avec le lanthanide. Les complexes cycliques peuvent contribuer à améliorer l'effet de déplacement chimique (Figure 3). En effet, pour un chélate en forme de cage, l'axe de la liaison de coordination Ln(III)-eau est mieux aligné avec l'axe magnétique du lanthanide, et par conséquent, les déplacements chimiques observés sont plus importants [Aime et al. 2006]. Ainsi, les chélates cycliques de Tm(III) ou de Dy(III), notamment de DOTMA et de DOTA, semblent parmi les agents de shift les plus efficaces.

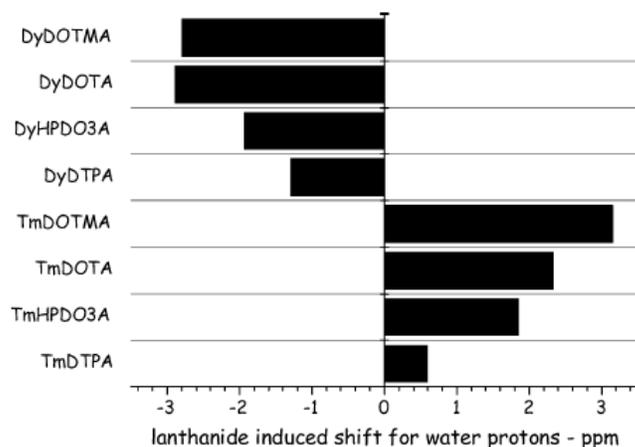


Figure 43 : Déplacements chimiques des protons de l'eau liée au lanthanide Tm(III) ou Dy(III) d'un complexe linéaire (DTPA) ou cyclique (DOTA, DOTMA, HPDO3A) liant une molécule d'eau (100mM) mesurés à 25°C à 14T [Aime et al. 2006]. La référence à déplacement chimique nul correspond au signal de l'eau libre.

A notre connaissance, les complexes de Ln(III) formés à partir de cages cycliques liant 2 molécules d'eau dans leur sphère de coordination ont été très peu étudiés en raison de leur stabilité parfois compromise selon la composition du milieu aqueux. Il est néanmoins possible de penser que l'existence de deux sites de liaison à l'eau soit favorable à un meilleur effet de shift du lanthanide [Hermann et al 2008]. Parmi les cages connues pour permettre la liaison à deux molécules d'eau, le ligand DO3A rend possible la formation de l'isomère en conformation TSAP favorable à un échange rapide au niveau des sites de liaison [Hermann et al 2008], ce que nous recherchons pour la construction d'un système LipoCEST pour lequel l'agent de shift doit interagir avec une quantité maximale d'eau intra-liposome avant son passage dans le milieu externe. Pour notre système, nous avons retenu le complexe de Tm(III) (Figure 3). Par ailleurs, l'encapsulation dans un liposome permet de protéger le complexe de réactions de compétition avec l'eau de substances donneurs endogènes telles que les ions hydrogénocarbonate ou certains acides aminés ou encore certains groupements de surface des protéines [Hermann et al 2008] par rapport aux deux sites de coordination.

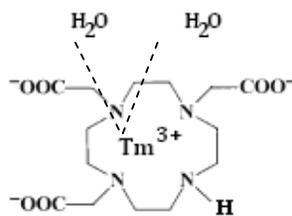


Figure 3 : structure chimique du complexe [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂].

Du point de vue de l'effet CEST et comme démontré par le groupe de Silvio Aime, la structure liposome doit sa grande sensibilité au nombre de molécules d'eau échangeables car en principe l'agent CEST étant cette fois la vésicule dans son ensemble, les molécules d'eau contenue dans le compartiment interne représente la population qui se lie à l'agent et dont l'aimantation va pouvoir être transférée à l'eau du bulk. Si l'on considère les courbes théoriques montrées Figure 4, la sensibilité d'un composé paramagnétique utilisé en IRM CEST dépend, entre autres paramètres, du nombre de protons échangeables entre le site de liaison à l'agent CEST et l'eau libre des tissus. De ce fait, l'effet CEST attendu pour un liposome doit atteindre son optimum à de très faibles concentrations. Ceci a été vérifié expérimentalement sur plusieurs systèmes [Sherry et Woods, 2008 ; Aime et al. 2006 ; Delli Castelli 2008b ; Aime et al. 2009].

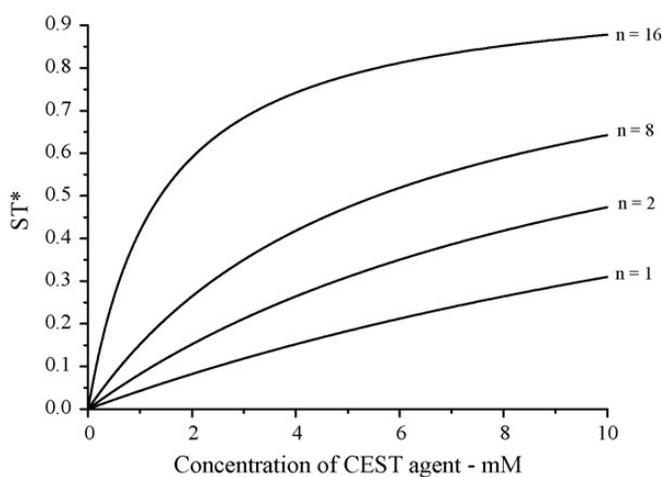


Figure 4 : Effet CEST en ST% en fonction de la concentration en agent CEST étudié, et en fonction du nombre n de protons mobiles par agent CEST [Delli Castelli 2008b].

Néanmoins, l'eau interne doit être suffisamment différenciée en fréquence de résonance de l'eau des tissus. Ceci dépend de l'efficacité de l'agent de shift et de sa concentration interne qui malheureusement est limitée par les conditions physiologiques, notamment en milieu sanguin. En effet, les liposomes sont très sensibles aux chocs osmotiques et la conservation de leur structure et de leur contenu exige de les préparer dans un milieu de même osmolarité que celui dans lequel ils vont être placés pour leur utilisation. Ceci limite la concentration maximale à laquelle l'agent de shift peut être encapsulé. Un moyen d'améliorer cette concentration est d'utiliser un complexe neutre ce qui est le cas du [Tm(III)-DO3A] dont la teneur pourra être portée à environ 300 mM (concentration isotonique).

Les systèmes LipoCEST étudiés jusqu'à présent ont été basés sur des complexes chargés et donc leur concentration était limitée à environ 100-150 mM. Pour contourner ce problème, il a été proposé d'employer des complexes à plusieurs centres Ln(III) [Langereis, 2006] ou insérés dans la membrane des liposomes [Terreno et al. 2007 ; Delli Castelli 2008a], mais toujours liant une seule molécule d'eau. .

La membrane elle-même joue un rôle important dans l'efficacité du lipoCEST car selon sa perméabilité à l'eau, elle va permettre le transfert d'aimantation ou non. D'après la littérature, un certain nombre de membranes ont prouvé leur fonctionnement, notamment des membranes PEG-ylées [Langereis et al 2008 ; Terreno et al. 2007 ; Delli Castelli 2008a] intéressantes pour leurs propriétés stabilisantes en milieu biologique. A partir de nos études de perméabilité et d'évaluation de l'effet CEST de liposomes de différentes compositions, nous avons pu retenir la plus simple d'entre elles : EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀. Cette membrane conduit, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, un temps de résidence optimal dans la cavité interne au contact du complexe de thulium, temps de résidence qui ne doit être ni trop long, ni trop court, au risque de perdre en efficacité CEST.

Le dernier paramètre important qu'il est impératif d'examiner pour évaluer les propriétés d'un système CEST est l'intensité de l'impulsion radiofréquence B_1 (Figure 5). Notamment, pour une membrane fixée conduisant à un temps d'échange chimique donné, l'effet CEST maximum correspond à une impulsion

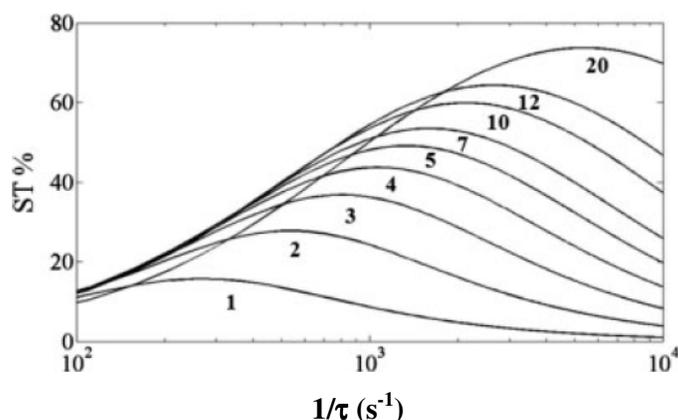


Figure 5 : Dépendance de l'efficacité CEST (ST%) à différent B_1 (1 à 20 μT) en fonction du temps d'échange $1/\tau=k_{ex}$ des protons entre l'eau libre et les sites d'échanges protoniques de l'agent CEST (300Mhz, $\Delta\omega=50ppm$) [Aime et al. 2006].

Cette réflexion nous a conduits à proposer un système LipoCEST encapsulant un complexe de Tm(III) formé avec le ligand DO3A, à concentration intra-liposome isotonique.

Ce complexe neutre a été synthétisé spécialement pour évaluer l'influence d'un échange de deux molécules d'eau de coordination avec le centre paramagnétique. Différentes membranes et différentes conditions RMN CEST ont été étudiées de manière à définir des conditions optimales d'utilisation lorsque les liposomes LipoCEST sont maintenus dans des conditions iso-osmolaires entre leur volume interne et le milieu dans lequel ils baignent. Des expériences complémentaires ont également été menées pour affiner la connaissance de ce système.

II-2 Synthèse et caractérisation des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargé en [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂].

Résumé de l'étude

L'efficacité du complexe en tant qu'agent de déplacement chimique des protons de l'eau a été évaluée par RMN du ¹H 7 T à l'aide d'un double tube coaxial, le tube interne contenant de l'eau et le tube externe contenant la solution de complexe à 100 mM. La variation de fréquence de résonance entre les deux types d'eau a conduit à un déplacement chimique décalé de 12,8 ppm à 25°C dans le cas de la solution de complexe. La comparaison avec les valeurs reportées dans littérature pour des complexes de Tm(III) présentant un seul site de coordination place le complexe Tm-DO3A à un niveau nettement plus efficace (Tableau 2).

Tableau 8 : déplacement chimique de complexes de Tm(III) à 100mM à 25°C et à 14T mesurés en ¹H RMN à l'aide d'un double tube coaxial contenant le complexe d'une part et de l'eau d'autre part [adapté de Aime et al. 2006].

Complexe de Tm(III)	Déplacement chimique induit par rapport à l'eau libre (ppm)
Tm-DTPA	0,6
Tm-HPDO3A	1,8
Tm-DOTA	2,4
Tm-DOTMA	3,2

Le temps de résidence des molécules d'eau sur les sites de coordination du centre magnétique a été déterminé par ¹⁷O RMN et estimé égal à 9.5 ± 2.0 ns à 37 °C et 15.4 ± 3.4 ns à 25°C, soit une constante de vitesse d'échange chimique de l'ordre de 10⁸ s⁻¹. Cet ordre de grandeur indique un échange très rapide, en particulier le temps d'échange de l'eau avec le complexe apparaît beaucoup plus court que celui correspondant à l'échange de l'eau intra-liposome avec le milieu extérieur, d'un facteur 10⁴ à 10⁶, selon la membrane (cf chapitre I de la même partie).

Ceci répond au concept LipoCEST car en effet c'est la membrane du liposome qui doit gouverner cinétiquement l'échange chimique.

Trois formulations isotoniques chargées d'une concentration en complexe à 300 mOsm : EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) ; EPC/Cholesterol/DSPEPEG₂₀₀₀ (71:24:5 mol%); et EPC (100 mol%).

Les liposomes présentent un diamètre moyen proche de 200 nm et des largeurs de distributions de tailles équivalentes. L'effet CEST comparé à une impulsion radiofréquence équivalente de 6,7 μT (champ 7,05 T ; 37°C) est très voisin quelle que soit la membrane, les liposomes contenant 24 % en mole de cholestérol montrent toutefois une efficacité très légèrement supérieure, certainement en raison de l'imperméabilité de la bicouche (cf chapitre I de la même partie). De façon intéressante, la différence de déplacement chimique induite par l'agent LipoCEST $\Delta\omega$ est centrée à 10 ppm pour les trois populations de liposomes, ce qui est favorable pour une application IRM-CEST *in vivo* (Tableau 3).

Tableau 9 : Efficacité CEST et variation de déplacement chimique $\Delta\omega$ des agents LipoCESTs chargés à 300 mOsm en Tm(III)-DO3A,(H₂O₂) à 7,05 T et 37°C (B₁= 6,7 μT).

Membrane étudiée :	Efficacité CEST (ST%)	$\Delta\omega$ (ST maximum) (ppm)
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (95:5 mol%) $d_h = 192 \pm 9$ nm	54%	9
EPC/Cholesterol/DSPE-PEG ₂₀₀₀ (71:24:5mol%) $d_h = 233 \pm 12$ nm	64%	9
EPC (100 mol%) $d_h = 250 \pm 53$ nm	57%	10

L'étude détaillée de la réponse CEST a été réalisée sur la membrane PEGylée simple, le cholestérol n'apportant pas de bénéfice spectaculaire du point de vue de l'efficacité de transfert de saturation. Les liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés à 298mM en Tm-DO3A et de diamètre moyen 190 nm conduisent à des spectres de réponse CEST dont l'allure et l'amplitude dépendent de l'intensité de l'impulsion radiofréquence B₁ qui a été explorée dans un intervalle de 2 à 40,6 μT . L'optimum d'efficacité CEST (ST%) de 60% a été obtenu pour une variation de déplacement chimique de 10 ppm et une valeur de B₁ de 10 μT . Comparativement aux agents LipoCEST sphériques (sans stress osmotique) étudiés jusqu'à présent, les meilleurs effets de shift ont atteint 3,5 ppm pour des complexes avec un seul ion thulium par chélate [Delli Castelli et al. 2008] ou 6,1 ppm pour des complexes avec deux ions thulium par chélate [Terreno et al. 2008].

Par ailleurs à un B₁ de 6,7 μT , une efficacité CEST optimisée de ST=55% mais à $\Delta\omega=1,8$ ppm a été obtenue pour des liposomes LipoCEST de Tm-DOTA ayant la même membrane PEGylée et un diamètre équivalent à celui de notre système [Zhao et al. 2008].

L'incorporation de complexes lipophiles de thulium dans la membrane de liposomes qui encapsulent simultanément le complexe neutre hydrophile Tm-HPDO3A conduit à une valeur de $\Delta\omega$ qui n'excède pas 6 ppm [Terreno et al. 2009]. Par conséquent, il ressort de nos résultats que l'existence de deux sites de coordination de l'eau au centre paramagnétique contribue bien à augmenter l'effet de shift.

En reprenant les conditions expérimentales pour lesquelles nous obtenons un effet CEST maximal de 60% pour les liposomes de membrane sans cholestérol EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%), la concentration en agent CEST est estimée voisine de 30 nM (cf partie 2, chapitre IV) pour l'approche théorique permettant de calculer cette concentration). A une concentration de 2 nM, soit plus de dix fois moins concentrée, les mêmes liposomes présentent un effet de 51% ($B_1=12\mu\text{T}$) ce qui est assez remarquable et place notre système parmi les plus efficaces étudiés jusqu'à présent. Dans des conditions comparables (2 nM, $12\mu\text{T}$, 39°C , $B_0 = 14 \text{ T}$), des liposomes constitués de DPPC/DPPG, de diamètre moyen de 240 nm, mais encapsulant le complexe Tm-DOTMA qui ne lie qu'une molécule d'eau, montrent une efficacité CEST de 34%. Seule une membrane enrichie en cholestérol permet d'avoir une efficacité et une sensibilité comparable à celle du système que nous proposons (55% d'efficacité, Tableau 4). Néanmoins, ce dernier système n'opère qu'à un faible effet de shift de 3,2 ppm.

Tableau 10 : Effet CEST en ST% ($12\mu\text{T}$, 39°C) en fonction de la concentration de LIPOCEST (240 nm, 2nM) pour deux préparations de Tm-DOTMA dont la composition membranaire contient ou non du cholestérol [adapté de Aime et al. 2005; Aime et al. 2006].

lipoCEST	ST_{max}%	$\Delta\omega$ (ppm)
DPPC/DPPG (95:5 mol%)	34%	3,2
DPPC/DPPG/CHOL (55:5:40 mol%)	55%	3,2

➤ **Résultats (article en cours de soumission)**

Sterically stabilized liposomes encapsulating neutral [Tm(III)-DO3A] complex with two inner-sphere coordinated water molecules as effective CEST contrast agents for MR imaging

Introduction

Technological advances performed over the past decades in magnetic resonance imaging (MRI) make this methodology one of the most effective tool in clinical medicine to provide non-invasively high-resolution 3D pictures of soft tissues. Nevertheless, efforts must be pursued to improve MR image sensitivity and get information at cellular even molecular levels for proceeding to early diagnosis and reliable monitoring of therapeutic treatments. For this purpose, the development of highly sensitive contrast-enhancing agents able to selectively alter the signal intensity and/or intrinsic relaxation times of endogenous water protons has become essential. Among the different classes of compounds that deserve interest for improving MRI contrast, chemical exchange saturation transfer (CEST) agents present the unique particularity to generate a frequency-encoded contrast [1-3]. Such species have labile protons or bind to labile water molecules able to be exchanged with the surrounding aqueous medium so that substantial decrease in MR signal intensity of the bulk water can be induced by selective irradiation at the resonance frequency of the exchangeable protons.

A properly designed CEST system must not only contain protons or bound water protons which exhibit a different resonance frequency with respect to bulk water but the chemical exchange must also be slow enough on the magnetic resonance time scale [4-8]. The contrast can be advantageously switched on and off as a function of the radiofrequency used that may be exploited for simultaneous visualization of regions marked by different CEST agents. However, the sensitivity of CEST systems is often limited by an insufficient number of mobile protons. One promising strategy to produce high-sensitivity CEST agents was proposed about ten years ago. This involves the encapsulation of a paramagnetic lanthanide(III) complex as shift reagent inside lipid vesicles whose inner aqueous compartment provides a large reservoir of exchangeable water protons. The rate of chemical exchange is then governed by the permeability to water molecules of the lipid bilayer delimiting the vesicle structure. These innovative systems referred to as LipoCEST agents have been widely demonstrated by a series of eloquent studies providing better than a proof of concept [7-18]. While conventional CEST agents are efficient in the millimolar concentration

range, LipoCEST-induced contrast can be indeed detected at sub-nanomolar concentrations [7-9].

One of the major concerns in the development of LipoCEST agents for *in-vivo* MRI diagnosis becomes the optimization of their efficiency in biological conditions, especially the generation of systems intended for systemic administration [19, 20]. Intravenous injection strictly requires isotonic preparations to ensure their stability and then reliable as well as reproducible contrast settings. Preserving intact vesicle structures in physiological conditions implies to adjust the inner concentration of the encapsulated paramagnetic shift reagent to maintain the same osmotic pressure as that in blood compartment and on both sides of the vesicle membrane (i.e., at equivalent osmolarity of 300 mOsm/L). This prerequisite limits the amount of shift reagent that can be entrapped and consequently limits the expectable saturation transfer efficiency. The second constraint lies in the intrinsic shifting properties of endogenous CEST molecules like proteins which restrict the choice of paramagnetic complexes to those inducing significant resonance frequency variations of the exchangeable water protons. Typically chemical shifts larger than 3-4 ppm are required to allow selective irradiation of water molecules bound to the shift reagent and thereby neglect contributions arising from endogenous magnetization transfer [4,21]. In this respect, macrocyclic lanthanide(III) complexes, especially Tm(III) and Dy(III) complexes containing one highly shifted and fast exchanging water molecule, have been extensively studied and proved highly sensitive CEST contrast agents [4,22], however with limited proton chemical shift effect when used in strictly isotonic conditions [5,7,8]. A recently reported strategy to circumvent these problems consists in using neutral polynuclear lanthanide(III) complexes which interestingly allow the encapsulation of a higher number of paramagnetic cations than the number reachable with mononuclear complexes at the same osmolarity while extending the window of accessible irradiation frequency [12]. Another consistent way is to enhance the signal shift of internal water protons by using non-spherical liposome structures with indeed nonzero contribution to bulk magnetic susceptibility. The studies reported so far have provided substantial results from non-symmetrical systems obtained by shrinking vesicles through osmotic stress [10,11,13,14]. Although the chemical shift of the intraliposomal water protons in such systems could be maintained in biological environments from *ex-vivo* experiments or local administration in mice [13,14], shrunken LipoCESTs would deserve further investigation to improve their overall *in-vivo* stability [11].

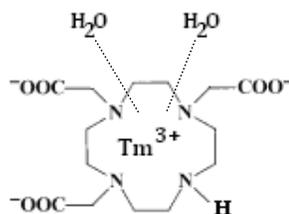


Figure1. Schematic representation of the [Tm(III)-DO3A,(H₂O)₂] chelate

The present work deals with an alternative approach which exploits the increased number of magnetically equivalent mobile water protons per paramagnetic unit. The issue raised here is to characterize a newly designed LipoCEST agent based on a neutral mononuclear complex however with two sets of fast exchanging water molecules in the first coordination sphere. For this purpose, the complex of Tm(III) and heptadentate chelate 1,4,7-tris(carboxymethyl) 1,4,7,10-tetraazacyclodecane (DO3A, Figure 1) was specially synthesized. The macrocycle DO3A is indeed a prototype of heptacoordinated ligands able to form non-ionic lanthanide(III) complexes. As demonstrated for gadolinium(III) ion, DO3A based complexes show a solid-state structure with a square anti-prismatic geometry and two metal-bound water molecules in aqueous solution [23]. [Tm(III)-DO3A (H₂O)₂] was encapsulated within unilamellar phospholipid vesicles which were sterically stabilized by poly(ethylene glycol) chains grafted onto their surface to ensure biological stability and then enable further *in-vivo* applications, especially through intravenous administration. This study reports MR properties of the hydrophilic Tm(III)-based shift reagent as well as saturation transfer efficiency of the derived LipoCEST agent as a function of its concentration and radiofrequency saturating field. Insight of CEST-MR imaging was given by preliminary *in-vitro* experiments.

Materials and Methods

Chemicals

Chloroform solutions of egg-yolk-extracted L- α -phosphatidylcholine (EPC) and 1,2-diacyl-SN-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(poly(ethylene glycol))-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Compound 1,4,7-tris(carboxymethyl)1,4,7,10-tetraazacyclodecane (DO3A) was supplied by Chematech. Thulium chloride (TmCl₃ (H₂O)₆), cholesterol (Chol, purity \geq 99%), sodium chloride and *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) were provided by Sigma (St. Louis, MO). Unless otherwise stated, the buffer used was 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH

7.4 and 300mOsm aqueous solution (measured with a cryoscopic micro-osmometer, Bioblock Scientific, France).

Synthesis of [Tm(III)-DO3A] complex

Thulium(III) 1,4,7-tris(carboxymethyl)1,4,7,10-tetraazacyclododecane [Tm(III)-DO3A] complex was synthesized by the complexation of DO3A with TmCl₃. DO3A (12 g) was dissolved in 50 mL water adjusted at pH 6 with NaOH and heated to 70°C. TmCl₃(H₂O)₆ (10 g) was added and the mixed solution stirred overnight at 60°C to achieve complete complexation. Then, the pH was adjusted to 4 by HCl addition and free Tm(III) removed on a weakly acidic cation-exchange resin (Chelex 100, BioRad). The purified solution was lyophilized and the complex recrystallized in 5 equivalent of ethanol. The final powder was recovered by filtration. Remaining NaCl was removed by using reversed-phase chromatography on a C2-grafted silica gel column (RP-2, 5x30 cm, Merck) with water as mobile phase. Collected NaCl-free fractions were identified by reaction with AgNO₃ before being pooled and lyophilised. The purity of the complex was determined by HPLC-UV-MS analysis (Agilent HP1100, 201 nm detection wavelength, HydroSynergy Polar RP80, Phenomenex; 5µl injection sample of 0.01% (w/v) aqueous solution; gradient of acidified water 0.05%TFA/methanol as mobile phase). A 98 % purity (residual NaCl less than 0.3 % by weight) was checked for the Tm(III) chelate used for all the experiments.

LipoCEST agent preparation

Complex-loaded liposomes were prepared by hydration of thin lipid films (EPC: 100mol%; EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀: 95/5 mol% or EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀/cholesterol: 70/5/25 mol%) with a 300 mOsm [Tm-DO3A] aqueous solution followed by sequential extrusion (nitrogen pressure <10 bars, 25 °C) through polycarbonate filters with decreasing pore diameters of 0.8 μm/0.4 μm/0.2 μm/0.2 μm (PORETICS, Osmotics, Livermore, USA). Non-entrapped complex molecules were removed by gel exclusion chromatography performed with a 0.4 cm×5.8 cm Sephacryl S1000 superfine (Pharmacia) microcolumn (TERUMO 1 mL syringe) saturated with EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) liposomes, prepared according to the same procedure used for LipoCEST agents but using 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4 buffer for lipid hydration. The mobile phase was 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4 buffer. For all the experiments, the LipoCEST dispersions were purified just before the measurements. The empty liposomes composed of EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95/5 mol%) were prepared in a similar manner by using 145 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4 buffer for film hydration without performing the SEC step.

Thulium and phospholipids contents were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) after sample mineralization. A volume of 4500 μL of 65% (v/v) nitric acid was added to 500 μL LipoCEST sample. The mixture was heated to 80 °C for 8 hours, allowing complete dissolution, before dilution in Milli-Q water in order to obtain 32.5% (v/v) final concentration of nitric acid. Total thulium concentration (\pm 30 mM) was quantified by ICP-AES (Optima 3300 RL, Perkin) with peristaltic pump flow rate of 1 mL/min, plasma gas flow rate of 15.0 L/min, 0.9 L/min auxiliary and 0.8 L/min spray. Solutions in 32.5% (v/v) nitric acid of thulium ranging from 0.2 mg/L to 10 mg/L and containing yttrium as internal standard (0.7 mg/mL) were used as calibration standards (1500W RF power, characteristic wavelengths: 346.220 nm (Tm(III)), 324.227 nm (Y(III))). Total phosphorus content (\pm 2 mM) was determined according to the same procedure by using a set of calibration standards ranging from 0.5 mg/L to 10 mg/L, 214.914 nm detection wavelength, 1.0 L/min ICP auxiliary and 0.7 L/min spray flow rates. The analyses were performed in triplicate.

Quasi-elastic light scattering

The hydrodynamic diameter (d_h) of the purified LipoCEST agents were determined by quasi-elastic light scattering (QELS) with a photon correlator spectrometer (10 mW HeNe 632.8-nm laser, Zetasizer ZS90, Malvern Instruments), at 25°C and 90°scattering angle. Just before measurements, the samples were diluted to optimize the response of the apparatus (total lipid concentration close to 0.5 mM). The d_h values were calculated from the measured translational diffusion coefficients D of the particles according to the Stokes–Einstein equation assuming the particles independent and spherical, $d_h = k_B T / 3\pi\eta D$ (k_B , Boltzman constant; η , dispersant viscosity). Mean hydrodynamic diameters were deduced from unimodal distribution analysis and measurements performed in triplicate showed standard deviation lower than 5%.

^{17}O NMR relaxation rate measurements

Longitudinal and transverse oxygen-17 relaxation times ($^{17}\text{O}-T_1$ and $^{17}\text{O}-T_2$, respectively) were determined from 2 mL samples contained in 10-mm-o.d. tubes with a Bruker AMX-300 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a broadband probe. Field homogeneity was optimized on the proton free induction decay observed with the decoupling coil. Temperature was regulated by air or nitrogen flow (Bruker BVT-2000 unit). Longitudinal relaxation times $^{17}\text{O}-T_1$ were measured using the IRFT sequence and experimental data were fitted with a three-parameter routine. Diamagnetic transverse relaxation times $^{17}\text{O}-T_2$ of pure water (pH~6) and water in a 200 mM Tm(III)-complex aqueous solution were obtained at natural abundance using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence and using a two-parameter fit of the data. All ^{17}O NMR spectra were proton-decoupled. Each measurement was repeated at least three times from independent samples. The treatment of the experimental data was performed as already described [24].

^1H NMR experiments

Measurements were performed with a Bruker AMX-300 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating at 7T and temperature adjusted with a precision of $\pm 0.5^\circ\text{C}$ (temperature-controlled nitrogen flow).

Water proton chemical shift offset induced by [Tm-DO3A] was determined at 25°C by using a 5-mm NMR tube containing complex aqueous solution (pH~6) and a coaxially inserted capillary (Wilmad®, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) filled with D_2O as the lock solvent.

The chemical exchange saturation transfer (CEST) spectra of the LipoCEST agents were acquired with the same spectrometer in a frequency offset range of ± 50 ppm. The whole sequence was preceded by a delay of 15 s and the saturation pulse was applied for 3 s. The saturation transfer value (ST %) over the entire range of frequency offset was calculated according to $ST\% = (1 - I^\omega / I^{-\omega}) \times 100$, I^ω and $I^{-\omega}$ are referring to the bulk water signal intensity at two frequency offsets ω and $-\omega$, symmetrically distributed with respect to the zero offset of the bulk water resonance. The frequency offset ω corresponds to the resonance of the water protons inside the liposomes or $\Delta_{liposome}$.

MRI acquisition

Experiments were performed on a 7T MRI scanner (Bruker, Ettlingen, Germany) using a Bruker birdcage volume coil with a 3.4 cm diameter. Samples were placed in 5-mm diameter tubes immersed in Fluorinert® FC-40 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Temperature was held constant at 37°C using an air heater. The Bruker “Mapshim” routine was used to achieve a water linewidth of ~ 20 Hz from a $5 \times 5 \times 5$ mm³ voxel. CEST images were acquired using a MSME sequence (TR = 5000 ms, 12 echoes registered separately with TE₁ = 8 ms and echo spacing = 8 ms, $300 \times 300 \times 1000$ μm^3 spatial resolution, 6 min acquisition time, $n_{slices} = 10$) with additional saturation module applied ON (Image_{ON}) and OFF (Image_{OFF}) resonance. The saturation module consisted of a train of three 128 ms square pulses leading to a total saturation module duration of 384 ms. The saturation module was repeated each pulse (TR/ n_{slices} = 500 ms) such that the shifted protons were saturated $\sim 80\%$ of the time. A relatively long TR was used to ensure that longitudinal magnetization was almost fully relaxed between each repetition. The optimum saturation frequency, δ_{sat} , and pulse power, B₁, were determined experimentally by measuring Z-spectra over a range of δ_{sat} values from -20 ppm to +20 ppm and B₁ values from 1 to 12 μT . In order to maximize the signal-to-noise ratio (SNR), each image was reconstructed as a weighted-sum of echo images, weight being equal to the intrinsic SNR calculated on the reference echo image. The CEST contrast specific to the lipoCEST agents was distinguished from the background magnetization transfer (MT) contrast by calculating the asymmetric MT ratio (MTR_{asym}) expressed as:

$$MTR_{asym} = 100 \times \frac{\text{Image}_{OFF} - \text{Image}_{ON}}{\text{Image}_{Ref}}$$

Results and Discussion

Tm(III)-complex properties

In order to optimize the paramagnetic response of the intraliposomal water protons, the transitory binding of water molecules to the trivalent Tm(III) cations of the complex should combine fast exchange rate and significantly different chemical shift compared to free water protons [5]. Figure 2 shows the high resolution ^1H NMR spectrum of the $[\text{Tm(III)-DO3A}(\text{H}_2\text{O})_2]$ compound at a 100 mM concentration in water. The downfield shift of 12.8 ppm found for water protons demonstrates the remarkable efficiency of the complex as shift reagent since, at equivalent concentration, the resonance signal offset of water protons has been found significantly smaller, i.e., not exceeding 4 ppm, for other Tm(III) complexes with analogous square anti-prismatic geometry but with only one inner-sphere water molecule [5].

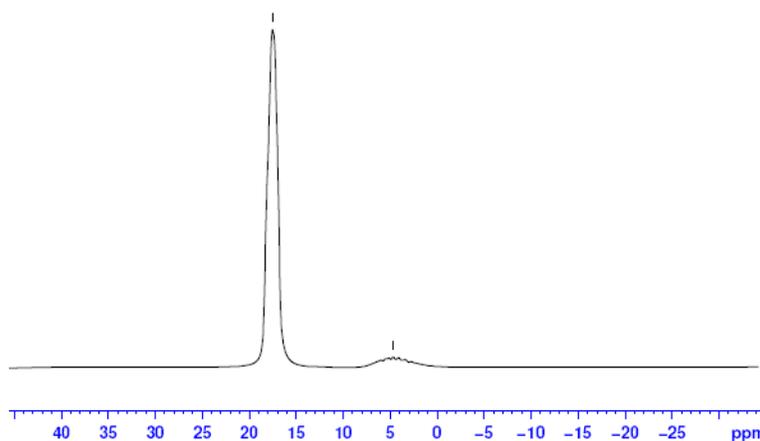


Figure 2. ^1H NMR spectrum (7T, 25°C) of a 100 mM aqueous solution of $[\text{Tm(III)-DO3A}(\text{H}_2\text{O})_2]$. The measurement was performed by using two concentric tubes. The signal at 4.7 ppm corresponds to the water protons contained in the inner reference tube filled with pure water while the signal at 17.5 ppm is attributed to water protons in the complex solution.

The exchange rate of the water molecules coordinated to the Tm(III) ion was determined from the temperature dependence behaviour of the paramagnetic contribution to the transverse and longitudinal reduced relaxation rate $R_{1,2p}^r$ of the ^{17}O -water nuclei in the temperature range from 283 K to 315 K. The variation of the reduced R_{2p}^r versus temperature (Figure 3) does not display a bell-shaped curve as it is usually observed for analogous lanthanide(III) complexes with rather long water exchange rates around hundred of nanoseconds [25]. The behaviour observed here for the $[\text{Tm(III)-DO3A}(\text{H}_2\text{O})_2]$ complex is characteristic of the occurrence of a very short lifetime of the inner sphere water molecules. According to Swift-Connick theory [24,26,27] and on the assumption that the two labile water molecules have the same exchange rate, the simultaneous best-fitting adjustment procedure of the Arrhenius plots for reduced transverse and longitudinal relaxation rates in Figure 3b led to an estimate of the water

residence lifetime τ_M of 9.5 ± 2.0 ns at 37°C (15.4 ± 3.4 ns at 25°C) (exchange rate close to 10^8 s^{-1}). This value indeed ranks among the shorter residence lifetimes found for macrocyclic lanthanide(III) paramagnetic complexes. The exchange rate is 10 fold faster than for the analogous gadolinium chelate $[\text{Gd(III)-DO3A, (H}_2\text{O)}_2]$ [28] in agreement with monotonically increasing τ_M values with increasing atomic number of lanthanides [1,29, 30-32]. Besides, such fast water exchange was already obtained with $[\text{Gd(III)-DO3A-propionate (H}_2\text{O)}]^-$ complex for which a τ_M value of 8 ns has been found at 25°C [30].

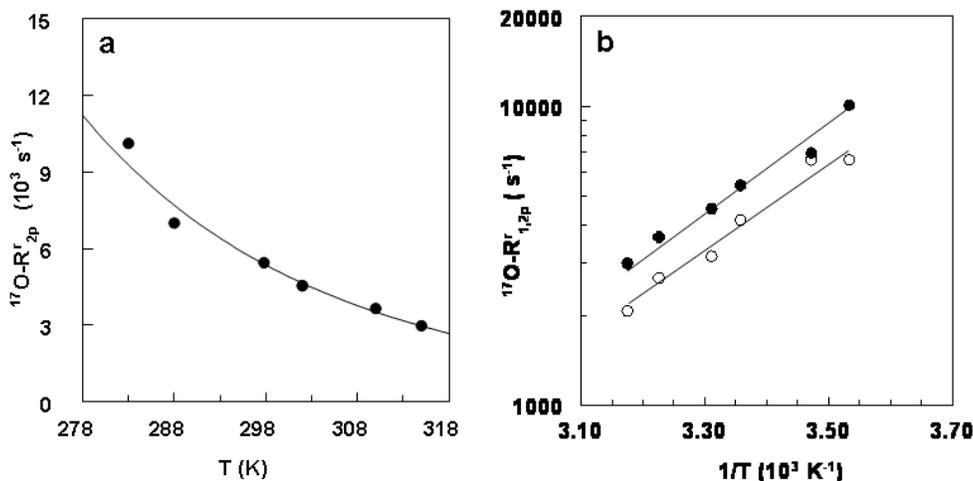


Figure 3. Temperature dependence of Oxygen-17 reduced paramagnetic relaxation rates ($R^r_{1,2p} = 1/f \cdot q \cdot T^p_{1,2}$; $q = 2$; $f = [\text{complex}]/[\text{water}]$; $[\text{water}] = 55.55$ M) at 7.05 T for a 200 mM $[\text{Tm(III)-DO3A (H}_2\text{O)}_2]$ aqueous solution. Reduce transverse relaxation rate versus temperature (a). Arrhenius plots of reduce transverse R^r_{2p} (filled symbols) and longitudinal R^r_{1p} (open symbols) relaxation rates (b). Each data point is the average of at least three measurements (best than 3 % precision).

The high chemical shift effect on water protons and the very fast exchange rate of the metal-coordinated water molecules nicely fulfil two main requirements of LipoCEST agent efficiency [1]. By encapsulating the $[\text{Tm(III)-DO3A (H}_2\text{O)}_2]$ complex in liposomes, it is indeed expected that the proton signal of all the water molecules confined in the vesicle cavity can be highly shifted before exchanging with the external liposome medium. Indeed, as the exchange rate of the thulium-coordinated water molecules is fast enough, the resonance signal offset of the intraliposomal water protons will be proportional to the intrinsic chemical shift of a one-site bound water proton weighted by the fraction of water coordinated to the thulium center. Then, only the exchange rate of the water molecules across the lipid membrane will govern the CEST contrast.

Characteristics of the LipoCEST agents

The LipoCEST agents herein studied were obtained by loading EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) liposomes with [Tm(III)-DO3A] complex at concentrations equivalent to 300±5 mOsm and at the same osmolarity of the final external aqueous medium. The procedure of sequential extrusion led to vesicle dispersions of monomodal size distribution of rather large width however with well reproducible average hydrodynamic diameters in the 189-193 nm range as measured by QELS. Figure 4 (curve A) shows one representative size distribution of the produced [Tm(III)-DO3A]-loaded EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ liposomes. It is worth noting that for all LipoCEST agents, their size parameters were constant throughout the experiments reported here and over the following three months at least.

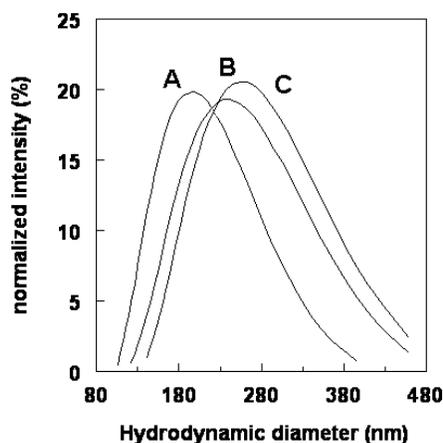


Figure 4. QELS size distribution of EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%, A), EPC/Cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 mol%, B) or EPC (100 mol%, C) liposomes loaded with 298 mM [Tm(III)-DO3A] inner concentration.

According to Bloch model theory, essentially two parameters can determine a maximum CEST effect beside the concentration of the paramagnetic agent [1,33,34]. The chemical shift of the exchangeable protons has to be sufficiently large to allow independent irradiation of the intraliposomal protons without any direct concomitant saturation of the protons in the surrounding medium (i.e., the protons of the water molecules outside the liposomes). The second parameter is the water exchange rate k_{ex} between the inner and outer compartments of the liposomes which has to be sufficiently slow to observe the two proton pools at different chemical shifts. This implies the relation $k_{ex} < \Delta\omega$ where $\Delta\omega$ is the signal frequency offset of the intraliposomal protons. However, faster the water proton exchange, better the saturation transfer performance since a greater number of protons can be exchanged during the measurement time. For a given k_{ex} , when these two parameters are fixed by the composition of the CEST agent, the maximization of the CEST effect depends on the adjustment of the applied presaturation radiofrequency (RF) field B_1 to this proton exchange rate. According to

numerical solution of Bloch equations [34], the optimal B_1 intensity value should be equal to $k_{ex}/2\pi$. Figure 5a displays the variation of the saturation transfer (ST) efficiency of the [Tm(III)-DO3A]-loaded liposomes at the constant lipid concentration of 12 mM as a function of the saturation offset for different pulses in the range from 2 to 40.6 μ T. At RF fields below 10 μ T, the ST profiles showed enhancement and progressive broadening with increasing pulse value. Gradual shift of the frequency offset corresponding to the maximum of the ST curve is also observed (Figure 5a, inset). From 10 μ T, the frequency offset at maximum ST stabilized at 11 ppm (Figure 5a) while the ST profiles are extending over wider frequency intervals. However the saturation transfer efficacy is decreased by increasing B_1 beyond 15 μ T, accompanied by a significant broadening of the ST profiles. These results agree with predicting theoretical simulations based on Bloch equations [1,2,34] as the radiofrequency pulse intensity determines the maximum efficiency of the saturation transfer so that its increase enhances the CEST effect but also reduces its frequency selectivity. Here, high B_1 strengths operate more efficient saturation and provide complete visualization of the resonance frequency range of the intra-liposomal water protons which is revealed rather wide (Figure 5a).

This agrees with previously reported LipoCEST behaviour [9,11]. The dependence on B_1 of the ST profile may arise from the liposome size distribution which, although centred to 190 nm, extends from about 100 nm to 300 nm in hydrodynamic diameter, i.e., a surface to volume ratio multiplied by 3 between the largest and the smallest vesicle populations. Indeed, when considering that the water exchange rate from the inner to the outer compartment of liposomes is inversely proportional to their surface to volume ratio, it can be expected that small LipoCEST agents transfer saturation more efficiently than large ones except that this is modulated by the applied field intensity as well as by the relative proportions of the size-differing vesicle populations. This has been recently verified experimentally in the case of [Tm(III)-DOTA]-loaded liposomes [18] and may also explain that low B_1 restrict saturation to a part of the LipoCEST agents, then reducing both CEST effect and operating frequency range as seen in Figures 5a. It cannot be totally ruled out that the complex encapsulation rate might slightly vary from one liposome to the other so that the range of signal resonance offset of the intraliposomal protons would be substantially enlarged.

The maximum ST values and associated frequency offsets related to the radiofrequency fields explored are reported by Figure 5b. Curve fitting by simple spline interpolation leads to an optimal saturation transfer reached when B_1 is set to 10 μ T. At this radiofrequency pulse and beyond, the resonance of the exchangeable water protons at maximum ST stabilized at 11

ppm despite broadening of the ST profile. This suggests that, in these conditions, likely all the LipoCEST agents present in the sample contributed to the CEST process and the majority of them showed maximum saturation transfer. On the basis of Bloch theory, the optimum B_1 value is defined by the proton exchange k_{ex} rate between the CEST agents and their surrounding aqueous medium such as $k_{ex} = 2\pi B_1$ [34]. By taking $B_1 = 10 \mu\text{T}$, an estimate of the water exchange rate between the inner cavity of the liposomes and the surrounding bulk is found equal to $2.7 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ (residence lifetime close to $370 \mu\text{s}$), indeed much slower than the exchange rate of the two water molecules coordinated to the encapsulated Tm-based complex. This value of water exchange rate agrees with 200-800 μs residence lifetimes previously determined for other LipoCEST agents from relaxivity measurements [35].

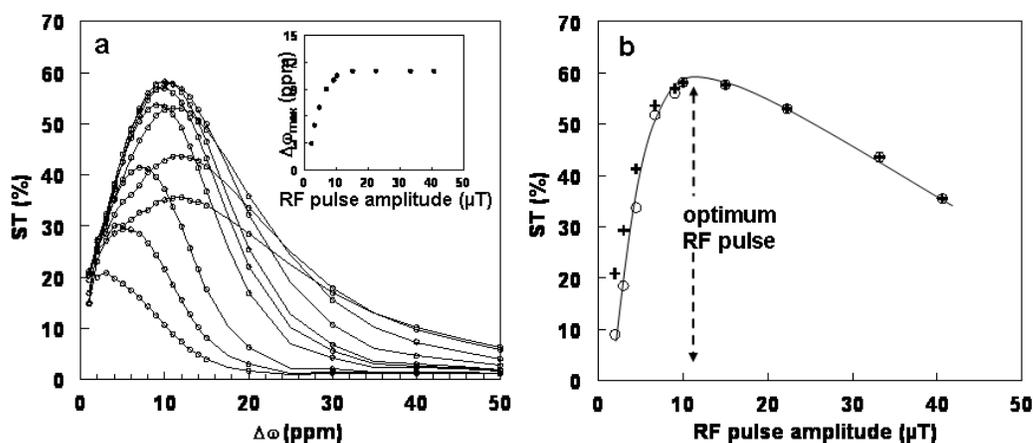


Figure 5. Saturation transfer (ST) profiles (7.05 T, 310 K) deduced from CEST spectra of [Tm(III)-DO3A]-based EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) LipoCEST agents (12 mM total lipids and 298 mM intraliposomal complex concentration). (a) ST variation as a function of the presaturation radiofrequency (RF) pulse amplitude B_1 (successively of 2, 3, 4.5, 6.7, 9.1, 10, 14.9, 22.3, 33.2 and 40.6 μT); the frequency offset corresponding to maximum ST ($\Delta\omega_{\text{max}}$) recorded for each B_1 value increases with increasing pulse power before reaching a constant value of 11 ppm for $B_1 \geq 10 \mu\text{T}$ (inset). (b) Evolution of the ST value obtained at presaturation frequency equal to either $\Delta\omega_{\text{max}}$ (+) or 11 ppm (O) by varying B_1 . The maximum CEST effect provided by the LipoCEST agent is obtained by applying a radiofrequency pulse in the 10-12 μT range.

Saturation transfer assessment shown in Figure 5 indicates a maximum ST effect close to 60% at optimal B_1 in agreement with the maximum value of 64.5% predicted by Bloch's theory [Woessner et al 2005]. This was found at a total lipid concentration of 12 mM that nearly equals a concentration in LipoCEST agents of 18 nM as calculated from $[\text{liposome}](\text{nM}) = [\text{lipids}](\text{mM}) \cdot 10^6 / N_{\text{ag}}$. The aggregation number of the vesicles N_{ag} was deduced from $N_{\text{ag}} = 4\pi/3 [(R-L)^3 - (R-2L-e)^3] / V_m$, by taking the vesicle radius R equal to the half of the mean hydrodynamic diameter ($R = 950 \text{ \AA}$), the length of poly(ethylene) chains coating the vesicles L and lipid bilayer thickness e to 50 \AA [19,36] and 40 \AA [37-39], respectively, and the lipid molecular volume V_m to the average value of 1264 \AA^3 of the data in

the literature [37,39]. Both Maximum saturation transfer efficiency and corresponding frequency offset are preserved down to 2 nM in LipoCEST agents. Such an outstanding sensitivity is among the best previously observed so far for LipoCEST agents which are loaded with a Tm(III) complex [5,11].

Influence of bilayer composition

Figure 6 displays the ST performance of three [Tm(III)-DO3A]-loaded liposome preparations of similar size distributions (Figure 4) and having different lipid compositions which were chosen to compare potential influence of PEGylated phospholipids or cholesterol when combined to phosphatidylcholine. The membrane composition is indeed expected to act on vesicle permeability to water which should be affected by PEGylated lipids [40-42] and lowered by cholesterol [43-45]. The profiles in Figure 6 were recorded by using the same presaturation RF field of 6.7 μ T and from close concentrations of LipoCEST agents. As expected, the maximum saturation efficiency was observed at frequency offsets not differing from more than 1 ppm since the main factor influencing this parameter is the concentration of the encapsulated complex which was here set in a very narrow range. The three liposome samples show almost equivalent effectiveness suggesting that bilayer composition poorly change the CEST response. Nevertheless, by looking more closely the results, it seems that the liposome bilayer composition slightly modulates the ST efficiency. Compared to pure EPC liposomes, incorporation of DSPE-PEG₂₀₀₀ very slightly reduces the ST effect while the presence of cholesterol in the bilayer tends to improve it, accordingly to supposed permeability effect.

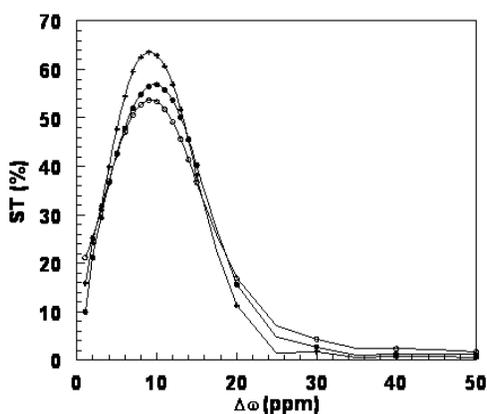


Figure 6. Saturation transfer (ST) profiles (7.05 T, 310 K) deduced from CEST spectra of [Tm(III)-DO3A]-based LipoCEST agents with different lipid bilayer compositions: EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%, ●, 12 mM total lipids, 298 mM intraliposomal complex concentration), EPC/Cholesterol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 mol%, +, 10.5 mM total lipids, 299 mM intraliposomal complex concentration) or EPC (100 mol%, ■, 11.6 mM total lipids, 304 mM intraliposomal complex concentration). The presaturation radiofrequency (RF) pulse amplitude B_1 was set at 6.7 μ T.

CEST images

As expected from the presence of a second water molecule in the inner hydration sphere of the [Tm(III)-DO3A] complex, the value of 11 ppm found for the frequency offset of the intraliposomal water protons is significantly higher than the commonly reported one for spherical LipoCEST agents loaded with an equivalent concentration of Tm(III)-based complex however with only one metal-bound water molecule. In the latter case, the most efficient systems which have been reported agree with the theoretical prediction and indeed cause a 4 ppm maximum downfield shift in optimal conditions and in a bulk aqueous solution iso-osmolar with respect to the inner content of the liposomes [5,7,8,16]. Moreover, the signal separation reached with the [Tm(III)-DO3A]-based LipoCEST system is sufficiently large to allow distinction from endogenous CEST effect typically observed at a frequency offset around 3 ppm [4,21] and it is obtained at reasonably low presaturation RF fields convenient for *in vivo* imaging. Figure 7 shows CEST images of [Tm(III)-DO3A]-loaded liposomes at 12 mM total lipid concentration and empty ones at the same concentration. In agreement with the ST profiles in Figure 5, the attenuation of the bulk water signal obtained with RF saturating pulses of either 10 μ T or 12 μ T is significant when these were applied at 5 ppm or 10 ppm compared to 15 ppm.

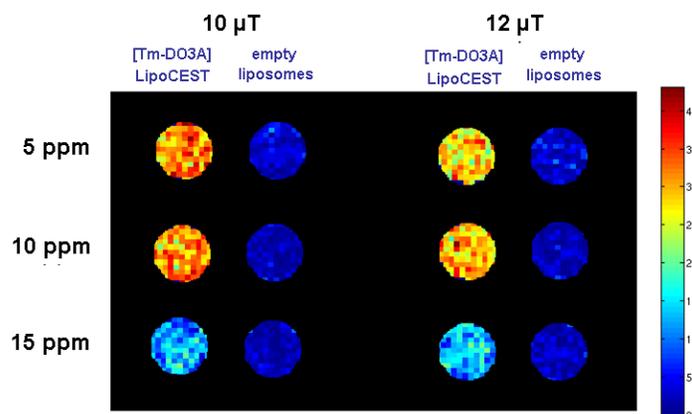


Figure 7. *In vitro* MRI-CEST images (7.05 T, 310 K) of a phantom containing two sample tubes filled with [Tm(III)-DO3A, 2H₂O]-loaded EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) LipoCEST agents (12 mM total lipids, 298 mM intraliposomal complex concentration) and empty liposomes of the same bilayer composition and total lipid concentration. The experimental conditions of the MSME sequence used as well as the image construction procedure are detailed in the experimental section. The RF field intensity used for proton signal presaturation was either 10 μ T or 12 μ T (indicated on the top) and the water proton resonance frequency at which the saturation was switched on and off is reported on the left. The arbitrary colour scale on the right reveals low CEST contrast in blue colour (MTR_{asym} values < 10) and high CEST contrast in red colour (MTR_{asym} values > 30).

Conclusion

This study points out the relevant properties of a LipoCEST system designed with a paramagnetic shift reagent based on the Tm(III) ion and containing two coordinated and fast-exchanging water molecules. Thereby, we showed that encapsulating the neutral [Tm(III)-DO3A, 2H₂O] macrocyclic chelate inside PEG-coated liposomes in iso-osmotic conditions allow to reach a quasi maximum yield of magnetization transfer between exchangeable water protons from the inner to the outer vesicle compartments. Moreover, the chemical shift separation between the two pools of water is significantly improved compared to the other spherical LipoCEST agents already described. As a matter of fact, by fixing the concentration of the shift reagent to reach isotonic conditions (300 mOsm) in order to anticipate *in-vivo* conditions of systemic administration, the frequency offset of 4 ppm, usually observed with an encapsulated mononuclear complex, is more than doubled without modifying the liposome shape. Not otherwise stated, this result had been achieved so far only with shrunken vesicles [8,10,11]. The advantage here to maintain a non-shrunken state is to preserve an optimum amount of water molecules in the inner cavity of the liposomes which here clearly contributes to the high saturation transfer efficiency obtained at LipoCEST agent concentrations as low as 2 nM. Interestingly, the performances of these newly described CEST contrast agents are absolutely maintained by incorporating cholesterol in the liposome bilayer which can then be used to better stabilize the shift reagent encapsulation rate versus time. Finally, as demonstrated by the MRI-CEST images from phantom samples, high contrast which differ from the endogenous signal of biological tissues can be expected at reasonably low presaturation pulses. Consequently and as encouraged by very recently reported *in-vivo* experiments [46], PEG-ylated liposomes loaded with [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂] provide actually promising tools for *in-vivo* MR imaging.

References

- [1] M. Woods, E. D. Woessner, A.D. Sherry (2006). "Paramagnetic lanthanide complexes as PARACETS agents for medical imaging." Chem. Soc. Rev. **35**: 500-511.
- [2] E. Terreno, D. Delli Castelli, S. Aime (2010). "Encoding the frequency dependence in MRI contrast media: the emerging class of CEST agents." Contrast Media Mol. Imaging **5**: 78-98.
- [3] P.C.M. van Zijl, N.N. Yadav (2011). "Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't?." Imaging Methodology **65**: 927-948.
- [4] K.M. Ward, A.H. Aletras, R.S. Balaban (2000). "A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST)." J. Magn. Res. **143**: 79-87.
- [5] S. Aime, S. Geninatti Crich, E. Gianolio, G.B. Giovenzana, L. Tei, E. Terreno (2006). "High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging." Coordination Chemistry Reviews **250**: 1562-1579.
- [6] J Zhou, P. Z. (2006). "Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **48**(2-3): 109-136.
- [7] S. Aime, S. Geninatti Crich, E. Gianolio, E. Terreno (2009). "Pushing the sensitivity envelope of lanthanide-based magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for molecular imaging applications." Acc. Chem. Res **42**(7): 822-831.
- [8] D. Delli Castelli, S. Geninatti Crich, E. Terreno, S. Aime (2008). "Metal containing nanosized systems for MR-Molecular Imaging applications." Coordination Chemistry Reviews **252**(21-22): 2424-2443.
- [9] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno (2005). "Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes." Angew. Chem. Int. Ed. **44**: 5513-5515.
- [10] E. Terreno, C. Cabella, C. Carrera, D. Delli Castelli, R. Mazzon, S. Rollet, J. Stancanello, M. Visigalli, S. Aime (2007). "From spherical to osmotically shrunken paramagnetic liposomes: an improved generation of LIPOCEST MRI agents with highly shifted water protons." Angew. Chem. Int. Ed. **46**(6): 966-968.
- [11] E. Terreno, D. Delli Castelli, E. Violante, H.M.H.F Sanders, N.A.J.M Sommerdijk, S. Aime (2009). "Osmotically shrunken LIPOCEST agents: an innovative class of magnetic resonance imaging contrast media based on chemical exchange saturation transfer." Chem. Eur. J. **15**(6): 1440-1448.
- [12] E. Terreno, A. Barge, L. Beltrami, G. Cravotto, D. Delli Castelli, F. Fedeli, B. Jebasingh, S. Aime (2008). "Highly shifted LIPOCEST agents based on the encapsulation of neutral polynuclear paramagnetic shift reagents." Chem. Commun. **5**: 600-602.

- [13] E. Terreno, D. Delli Castelli, L. Milone, S. Rollet, J. Stancanello, E. Violante, S. Aime (2008). "First ex-vivo MRI co-localization of two LIPOCEST agents." Contrast Media Mol. Imaging **3**: 38-43.
- [14] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno (2009). "Lanthanide-loaded paramagnetic liposomes as switchable magnetically oriented nanovesicles." Methods in Enzymology **464**:193-210.
- [15] S. Aime, D. Delli Castelli, D. Lawson, E. Terreno (2007). "Gd-loaded liposomes as T1, susceptibility, and CEST agents, all in one." J. Am. Chem. Soc. **129**(9):2430-2431.
- [16] E. Terreno, C. Cabella, V. Menchise, F. Fedeli, C. Carrera, D. Delli Castelli, G. Digilio, S. Aime (2011). "Gadolinium-doped LipoCEST agents: a potential novel class of dual 1H-MRI probes." Chem. Commun. **47**(16): 4667-4669.
- [17] D. Delli Castelli, W. Dastru, E. Terreno, E. Cittadino, F. Mainini, E. Torres, M. Spadaro, S. Aime (2010). "In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes." Journal of Controlled Release **144**(3): 271-279.
- [18] J. M. Zhao, Y. Har-el, M. T. McMahon, J. Zhou, A. D. Sherry, G. Sgouros, J. W. M. Bulte, P.C. M. Van Zijl (2008). "Size-induced enhancement of chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast in liposomes." J. Am. Chem. Soc. **130**(15): 5178-5184.
- [19] D.D. Lasic, D. Needham (1995). "The stealth liposome: a prototypal approach." Chemical Reviews **95**(8):2601-2628.
- [20] A. Laxmi Ayyagari, X. Zhang, K.B. Ghaghada, A. Annapragada, X. Hu, R.V. Bellamkonda (2006). "Long-circulating liposomal contrast agents for magnetic resonance imaging." Magnetic Resonance in Medicine **55**(5): 1023-1029.
- [21] J. Zhou, D.A. Wilson, P.Z. Sun, J.A. Klaus, P.C.M. van Zijl (2004). "Quantitative description of proton exchange processes between water and endogenous and exogenous agents for WEX, CEST, and APT experiments." Magnetic Resonance in Medicine **51**:945-952.
- [22] S. Aime, B. Botta, M. Fasano, E. Terreno (1998). "Lanthanide(III) chelates for NMR biomedical applications." Chem. Soc. Rev. **27**:19-29.
- [23] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubicek, I. Lukes (2008). "Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes." Dalton Trans. 3027-3047.
- [24] L. Vander Elst, A. Rocha, P. Gillis, S. Laurent, F. Botteman, J.W.M. Bulte, R.N. Muller (2002). "Dy-DTPA Derivatives as Relaxation Agents for Very High Field MRI: The Beneficial Effect of Slow Water Exchange on the Transverse Relaxivities." Magnetic Resonance in Medicine **47**:1121-1130.
- [25] S. Laurent, L. Vander Elst, R.N. Muller (2006). "Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents." Contrast Med. Mol. Imaging **1**:128-137.

- [26] T.J. Swift, R.E. Connick (1962). "NMR relaxation mechanisms of O17 in aqueous solutions of paramagnetic cations and the lifetime of water molecules in the first coordination sphere." *J. Chem. Phys.* **37**: 307-312.
- [27] D.H. Powell, O.M. Ni Dhubhaill, D. Pubanz, L. Helm, Y.S. Lebedev, W. Schlaepfer, A.E. Merbach (1996). "Structural and Dynamic parameters obtained from 17O NMR, EPR, and NMRD studies of monomeric and dimeric Gd3+ complexes of interest in magnetic resonance imaging: an integrated and theoretically self-consistent approach." *J. Am. Chem. Soc.* **118**:9333-9346.
- [28] P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer (1999). "Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications." *Chem. Rev.* **99**(9):2293-352.
- [29] N. Graeppe, D.H. Powell, G. Laurenczy, L. Zekany, A.E. Merbach (1995). "Coordination equilibria and water kinetics of lanthanide(III) propylenediaminetetraacetates and other magnetic resonance imaging related complexes." *Inorganica Chimica Acta* **235**:311-326.
- [30] S. Aime, M. Botta, J.I. Bruce, V. Mainero, D. Parker, E. Terreno (2001). "Modulation of the water exchange rates in [Gd-DO3A] complex by formation of ternary complexes with carboxylate ligands." *Chem. Commun.* 115-116.
- [31] E. Terreno, P. Boniforte, M. Botta, F. Fedeli, L. Milone, A. Mortillaro, S. Aime (2003). "The water-exchange rate in neutral heptadentate DO3A-like GdIII complexes: effect of basicity at the macrocyclic nitrogen site." *Eur. J. Inorg. Chem.* 3530-3533.
- [32] C. Li, Y-X. Li, G-L. Law, K. Man, W-T. Wong, H. Lei (2006). "Fast water-exchange Gd3+-(DO3A-like) complex functionalized with aza-15-crown-5 showing prolonged residence lifetime in vivo." *Bioconjugate Chemistry* **17**:571-574.
- [33] F. Bloch (1946). "Nuclear Induction." *Phys. Rev.* **70**:460-474.
- [34] D.E. Woessner, S. Zhang, M.E. Merritt, A.D. Sherry (2005). "Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI." *Magnetic resonance in Medicine* **53**:790-799.
- [35] E. Terreno, A. Sanino, C. Carrera, D.D. Castelli, G.B. Giovenzana, A. Lombardi, R. Mazzon, L. Milone, M. Visigalli, S. Aime (2008). "Determination of water permeability of paramagnetic liposomes of interest in MRI field." *J. Inorg. Biochem.* **102**(5-6):1112-9.
- [36] A.K. Kenworthy, K. Hristova, D. Needham, T.J. McIntosh (1995). "Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol)." *Biophysical J.* **68**:1921-1936.
- [37] D. Small (1986). In "The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids". Chap. 12 pp512.
- [38] S.H. White, G.I. King. "Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6532-6536.

- [39] H.I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle (1998). "Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers". Chemistry and Physics of Lipids **95**:83-94.
- [40] S. Beugin-Deroo, M. Ollivon, S. Lesieur (1998). "Bilayer stability and impermeability of nonionic surfactant vesicles stabilized by PEG-cholesterol conjugates." J. Colloid Int. Sci. **202**:324-333.
- [41] S. Spriwongsitanont, M. Ueno (2002). "Physicochemical properties of PEG-grafted liposomes." Chem. Pharm. Bull. **50**(9):1238-1244.
- [42] K. Hashizaki, H. Taguchi, C. Itoh, H. Sakai, M. Abe, Y. Saito, N. Ogawa (2003). "Effect of poly(ethyleneglycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposomal bilayer membrane." Chem. Pharm. Bull. **51**(7):815-820.
- [43] A. Finkelstein (1976). "Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes." The Journal of general Physiology **68**:127-135.
- [44] J.C. Mathai, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, M. Zeidel (2008). "Structural determinants of water permeability through the lipid membrane." J. Gen. Physiol. **131**(1):69-76.
- [45] H. Saito, W. Shinoda (2011). "Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: a molecular dynamics study." J. Phys. Chem. B **115**:15241-15250.
- [46] J. Flament, F. Geffroy, C. Medina, C. Robic, J.F. Mayer, S. Meriaux, J. Valette, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, F. Lethimonnier, F. Boumezbeur (2012). "In vivo CEST MR imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis targeted lipoCEST contrast agent at 7 T." Magnetic Resonance in Medicine DOI 10.1002/mrm.24217.

II-3 Compléments d'étude

Comparaison de Liposomes LipoCEST de Tm-DO3A sphériques/non sphériques

L'efficacité d'un agent LipoCEST concerne non seulement l'effet CEST proprement dit mais aussi la différence de déplacement chimique des protons de l'eau échangeables induite par le complexe paramagnétique. Cette dernière doit être la plus élevée possible pour permettre de distinguer l'effet CEST apporté par les liposomes de l'effet produit par les agents CEST endogènes. L'effet de shift dépend de la concentration de complexe dans le compartiment intra-liposome mais également, comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique (partie 1, chapitre IV) de la géométrie du liposome. Ainsi l'on peut écrire $\Delta\omega$ comme la somme de deux termes : la contribution de concentration ou contribution hyperfine $\Delta\omega_{hyp}$ et la contribution géométrique ou contribution de susceptibilité magnétique $\Delta\omega_{BMS}$. Cette seconde contribution, négligeable pour un liposome sphérique peut être considérablement augmentée lorsque la géométrie du compartiment intra-liposome est modifiée [Terreno et al. 2007]. Une stratégie proposée en particulier par le groupe de Silvio Aime est d'encapsuler une solution d'agent paramagnétique dans des conditions hypo-osmotiques par rapport au milieu extérieur. Ainsi, par effet de différence de pression osmotique, l'eau équilibre son potentiel chimique de part et d'autre de la membrane des liposomes induisant une diminution de volume à surface de membrane constante et donc une évolution des liposomes vers une forme non sphérique. Les expériences menées sur des liposomes chargés de Tm-HPDO3A à 40mOsm interne et soumis à des pressions osmotiques de milieux allant de 80 à 600 mOsm, démontrent l'effet de shift escompté mais ce dernier s'accompagne d'une perte d'efficacité CEST car le nombre de molécules d'eau intra-liposome diminue avec l'augmentation du stress osmotique (Figure 6). Ainsi, pour obtenir un effet de shift de 8-12 ppm, il est nécessaire de provoquer une différence d'osmolarité de 70-120 mOsm et dans ces conditions l'effet CEST chute à 30 %.

En considérant les résultats présentés dans le paragraphe précédent et concernant les systèmes LipoCEST de Tm-DO3A (Figures 5 et 6 de l'article), il est important de noter qu'un effet CEST maximum est mesuré pour une différence de déplacement chimique $\Delta\omega=10$ ppm à partir de liposomes préparés sans stress osmotique. De façon à examiner l'influence de la contribution de susceptibilité magnétique sur ces systèmes, nous avons réalisé le spectre de réponse CEST de liposomes EPC/CHOL/DESPE-PEG₂₀₀₀ encapsulant une concentration de Tm-DO3A à 298 mM et soumis à une augmentation d'osmolarité de 150 mOsm. La Figure 7 montre l'effet obtenu ainsi que celui réalisé sur les mêmes liposomes mais en conditions iso-osmotiques.

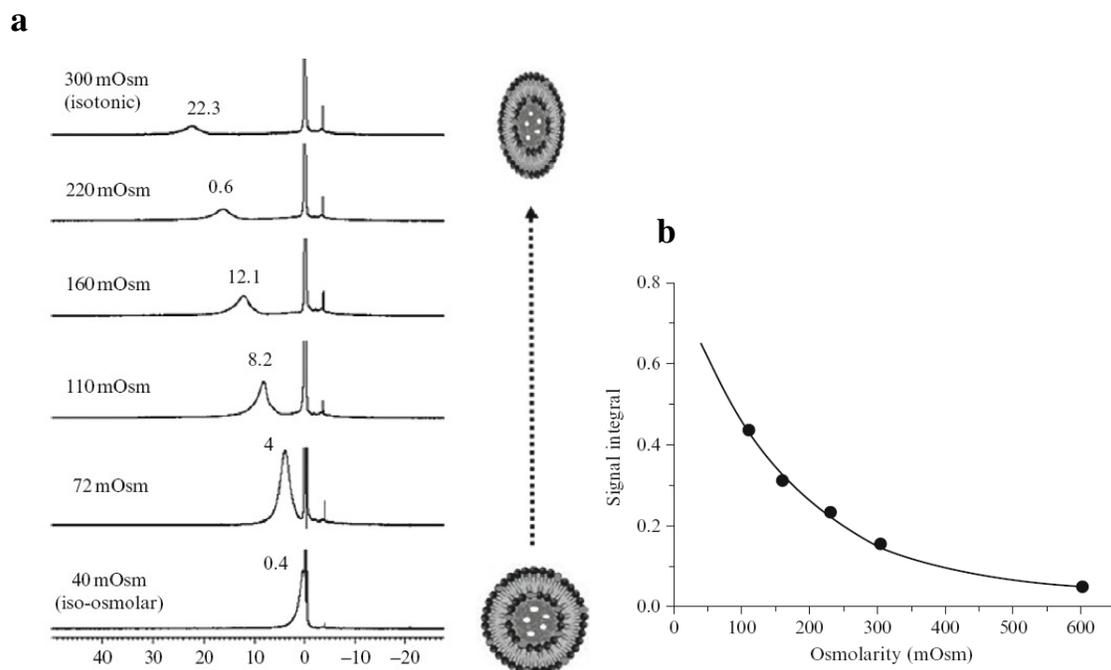


Figure 6 : Spectres RMN du ^1H (14 T, 25 °C) de liposomes DPPC/complexe lipophile de Tm-DOTA/DSPE-PEG₂₀₀₀ (65/30/5 mol%) encapsulant 40 mM (40mOsm) de complexe Tm-HPDO3A en milieux tampons (pH 7,4) d'osmolarités allant de 40 à 300mOsm (a). Signal CEST ($B_1 = 17\mu\text{T}$, 25°C) en fonction de l'osmolarité du milieu (b) [adapté de Aime et al. 2009].

On observe un gain de déplacement chimique de 5 ppm, $\Delta\omega$ passant de 10 à

15 ppm au maximum d'effet CEST qui par ailleurs conserve une valeur élevée de 58%.

On note aussi que le spectre de réponse CEST s'élargit et couvre une gamme de fréquences plus importantes, notamment à 20 ppm l'effet CEST est encore de 50%. Avec un agent LipoCEST de HPDO3A, le même gain de déplacement chimique est obtenu pour des conditions hyper-osmotiques de 180 mOsm mais l'effet CEST devient inférieur à 25%. Cet écart peut être lié à la différence de composition membranaire et donc à la réponse de déformation des liposomes. L'intensité de l'impulsion radiofréquence B_1 peut être également non optimale dans le cas du système de Silvio Aime et ses collaborateurs. Mais le facteur qui reste prépondérant dans les différences de résultats est la quantité de complexe encapsulée. Ainsi, si à concentration interne égale et dans des conditions d'analyse identiques, les liposomes non sphériques conduisent à un effet de shift plus intéressant, une utilisation *in vivo* qui impose une osmolarité extérieure du milieu équivalente à 300 mOsm, implique de réduire la concentration initiale intra-liposome de Tm-DO3A à 150 mM pour conserver le même gain de shift. Se pose alors la question de l'influence d'une telle diminution de concentration sur l'effet CEST.

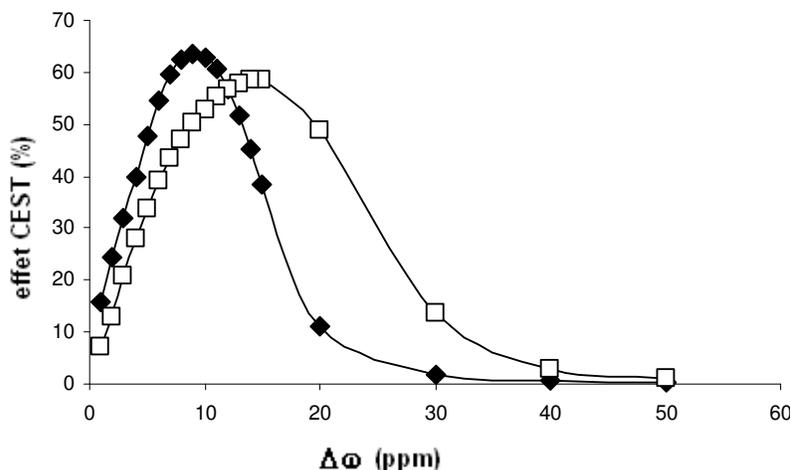


Figure 7 : Effet CEST à $B_1=6,7\mu\text{T}$ et 37°C de liposomes LipoCEST de Tm-DO3A (concentration initiale interne 298mM) de membrane EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 mol%) en milieux iso-osmotique de 300 mOsm (◆) et hyper-osmotique de 450 mOsm (□).

Influence de la concentration interne en Tm-DO3A sur la réponse CEST

Des liposomes de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) contenant trois concentrations internes en Tm-DO3A (135 mM, 298 mM et 468mM) ont été synthétisés et purifiés sur colonne d'exclusion stérique contre une solution d'HEPES 10 mM pH 7,4 et de NaCl iso-osmotique (respectivement 140, 300 et 460 mOsm). Les spectres de réponse CEST ont été enregistrés à $B_1 = 6,7\mu\text{T}$ (Figure 8).

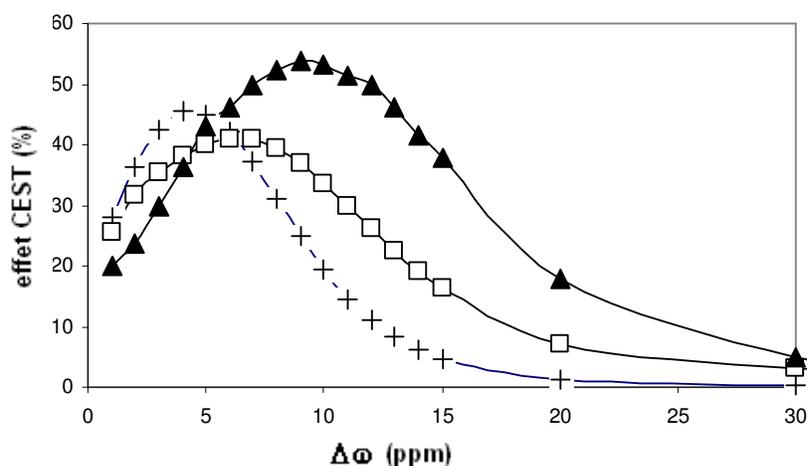


Figure 8 : Effet CEST à $6,7\mu\text{T}$ et 37°C de liposomes LipoCEST EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) encapsulant le complexe Tm-DO3A à une concentration de 135mM (12,5mM lipides ; $d_h=182\pm 91$ nm) (+), 298 mM (12mM lipides ; $d_h=192\pm 102$ nm) (▲) et 468mM (9,06mM lipides ; $d_h= 211\pm 110$ nm) (□.)

Pour une teneur interne en complexe environ deux fois moins concentrée (135 mM contre 298 mM), la différence de déplacement chimique $\Delta\omega$ est divisée par 2 (de 10ppm à 5ppm).

Ceci est en accord avec le fait que l'effet de shift décroît directement avec la quantité de centres paramagnétiques en contact avec l'eau intra-liposome. L'effet CEST est légèrement diminué (-10%). L'efficacité de transfert de saturation de l'aimantation des protons de l'eau intra-liposome aux protons de l'eau externe est probablement moins optimisée avec une impulsion radiofréquence de 6,7 μT , comparativement aux liposomes plus chargés en complexe.

Le résultat relatif aux liposomes contenant 468 mM conduit à un effet de shift de 7 ppm, moins important que celui obtenu avec les liposomes chargés à 298 mM. Logiquement l'augmentation de la concentration interne aurait dû conduire à un gain de déplacement chimique ou tout au moins à une différence de shift équivalente, soit une valeur de $\Delta\omega$ supérieure ou voisine de 10 ppm. Nous avons cherché à optimiser les conditions d'acquisition du spectre de réponse CEST en explorant d'autres valeurs de l'impulsion de saturation B_1 (Figure 9). Les résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une valeur de $\Delta\omega$ de 10 ppm à 10 μT et de 15 ppm à 33,2 μT mais avec un élargissement du spectre de l'effet CEST dans le dernier cas. Néanmoins, l'on peut constater que l'effet CEST n'atteint pas de valeur supérieure à 40% ce qui est loin de l'optimum obtenu à 60% (10 μT) avec le système chargé à 298 mM (Figure 5 de l'article).

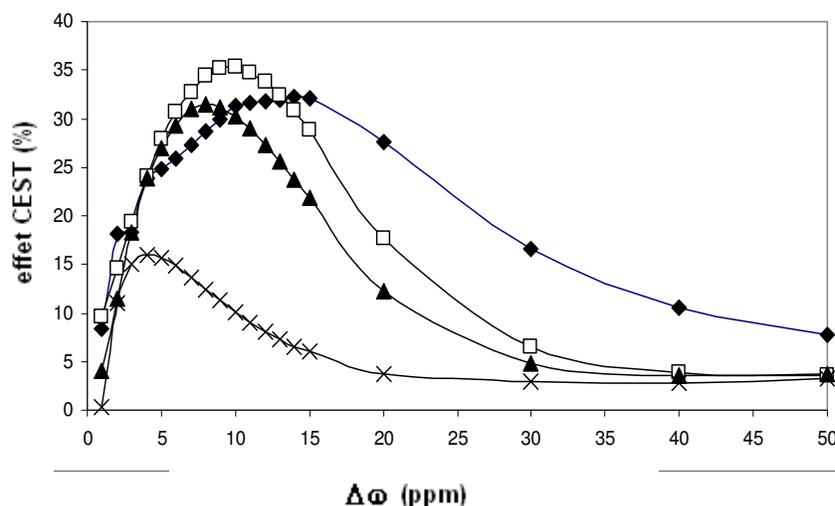


Figure 9 : Effet CEST à 37°C de liposomes LipoCEST EPC/DSPEPEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) encapsulant du Tm-DO3A à 468mM (9,06mM lipides, $d_h = 211 \pm 110$ nm) et enregistrés à différentes valeurs de B_1 : 3 μT (x), 6,7 μT (▲), 10 μT (□) et 33,2 μT (◆).

L'effet de la concentration interne sur le gain de déplacement chimique avait déjà été observé pour des liposomes chargés de Tm-DOTA [Zhao et al 2008] et les auteurs de cette étude avaient également mis en évidence une déviation à la loi de proportionnalité entre $\Delta\omega$ et la concentration en complexe pour des concentrations supérieures à 200 mM.

En fait cette écart à la linéarité rejoint les profils types obtenus expérimentalement et représentant la variation du déplacement chimique de protons provoquée par leurs interactions avec un complexe paramagnétique de lanthanide en fonction de la concentration en ce dernier [Sanders et al 1971 ; Carvalho et al 1997]. Aux faibles concentrations en complexe, la loi est linéaire puis le gain de shift atteint une valeur maximale qui reste constante aux fortes concentrations. Les spectres de RMN du ^1H de deux solutions de Tm-DO3A libre dans l'eau à 100 mM et 300 mM tendent à confirmer ce comportement (Figure 10). Pour approfondir cet aspect, il serait intéressant de procéder à une étude comparative plus complète de l'influence de la concentration en complexe sur l'effet de shift en opérant à des valeurs de B_1 systématiquement optimisées.

La perte d'effet CEST observée aux fortes concentrations en complexe pourrait quant à elle provenir d'un effet de la viscosité des milieux intra-liposome et externe qui pourrait contribuer à ralentir la mobilité de l'eau. Ceci diminuerait donc la constante d'échange k_{ex} et limiterait l'effet CEST malgré l'optimisation de l'intensité de B_1 comme le montre les courbes théoriques de la Figure 5 (paragraphe II-1). La seconde raison serait la diminution relative du nombre de molécules d'eau échangeables par liposome par augmentation de la concentration en complexe dans un volume intra-liposome équivalent (voir prédiction théorique de l'influence du nombre de molécules d'eau échangeable sur l'effet CEST, Figure 4, paragraphe II-1).

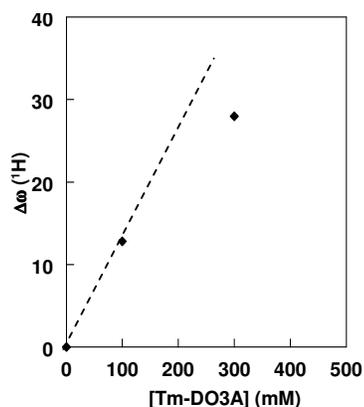


Figure 10 : Variation du déplacement chimique des protons de l'eau de solutions de Tm-DO3A en fonction de leur concentration. Les spectres de RMN du ^1H (7 T, 37°C) ont été effectués en utilisant un double tube concentrique contenant d'une part de l'eau et d'autre part la solution de complexe. On peut noter une déviation par rapport à la linéarité dès 300 mM.

Influence de la distribution de taille des liposomes

Pour un agent LipoCEST donné, un effet CEST optimal correspond à une valeur bien définie de l'impulsion radiofréquence B_1 et en théorie l'effet de shift des protons de l'eau n'est lié qu'à la concentration en complexe locale. Lorsque l'on fixe la composition lipidique de la membrane des vésicules, nous avons vu que le temps de résidence des molécules d'eau dans le compartiment intra-liposome dépendait de leur diamètre (partie 3, chapitre I). Une étude unique a examiné l'influence de la taille des liposomes sur l'effet CEST obtenu [Zhao et al. 2008]. La Figure 11 illustre les résultats, à savoir que pour une valeur de B_1 fixée, l'effet CEST augmente lorsque la taille des vésicules diminue. On peut noter également un décalage de la variation de déplacement chimique (*frequency offset*) en fonction du diamètre des liposomes mais les auteurs ne l'ont pas commenté.

Si nous reprenons les résultats concernant notre système LipoCEST EPC/DSPEPEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) chargé de Tm-DO3A à 298 mM (conditions iso-osmotiques), il est possible, à partir de la Figure 5 de l'article (paragraphe II-2), de tracer la variation de l'effet CEST maximum obtenu pour chaque valeur de B_1 en fonction de la variation de déplacement chimique $\Delta\omega$ (Figure 12a). On obtient ainsi un profil en forme de « cloche » dissymétrique dont l'allure est assez voisine de la distribution en taille des liposomes constitutifs du système et qui révèle plusieurs sous-populations de liposomes de différents diamètres compris entre 100 et 400 nm (Figure 12b). Si l'on considère, d'après [Zhao et al. 2008], que plus le diamètre des liposomes est petit, plus l'effet CEST est grand et si l'on tient compte de la pondération de l'effet CEST par le nombre de liposomes constituant chaque sous-population, il est autorisé de penser que le profil de la Figure 12a reflète l'influence de la taille des liposomes sur leur efficacité CEST.

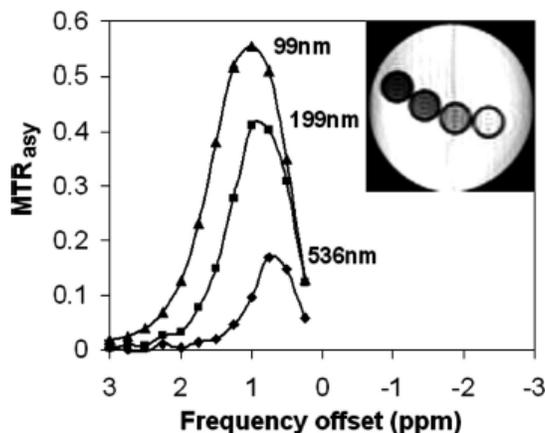


Figure 11 : Effet CEST de trois populations de liposomes LipoCEST EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (48,5:48,5:3 % mol) de diamètres différents, encapsulant une solution de Tm-DOTA à 200mM. L'insert montre l'image IRM-CEST de tubes contenant les différentes préparations, de droite à gauche : solution tampon témoin, liposomes de 99 nm, 199nm et 536nm [Zhao et al. 2008].

Le second aspect de nos résultats qui lui aussi peut être expliqué par l'existence de sous-populations de liposomes de diamètres différents concerne le déplacement progressif du spectre de réponse CEST avec l'augmentation de la valeur de l'impulsion radiofréquence B_1 . En effet, la constante de vitesse d'échange de l'eau entre le compartiment intra-liposome et l'extérieur (k_{ex}) dépend de la perméabilité de la membrane des liposomes qui elle-même est inversement proportionnelle au rayon des liposomes, de sorte que plus les liposomes sont petits, plus la vitesse d'échange ou k_{ex} est grande et donc plus la fréquence du champ de pré-saturation devra être élevée pour obtenir leur effet CEST optimum (cf Figure 5, paragraphe II-1 et Figure 5 de l'article). Ceci explique également que les fortes valeurs de B_1 permettent de révéler la contribution au spectre de la réponse CEST de toutes les sous-populations de liposomes.

La troisième remarque que nous pouvons apporter à nos résultats concerne l'évolution de la différence de fréquence $\Delta\omega$ selon la sous-population de liposomes. En effet, l'ensemble de la préparation LipoCEST engendre une plage relativement large de décalage en fréquence de résonance des protons échangeables allant de 2 à 11 ppm (Figure 12a). En tenant compte des deux constats précédents, il semble que chaque sous-population de liposomes, selon son diamètre, conduise à un effet de shift différent, d'autant plus grand que les liposomes sont petits.

Ce comportement est semblable à celui que l'on peut relever dans l'étude de [Zhao et al 2008] sur des liposomes de Tm-DOTA mais qui n'a pas été expliqué.

Si l'on suppose que le taux d'encapsulation de complexe dans les vésicules est équitablement réparti au sein de toutes les vésicules, la différence d'effet de shift ne pourrait provenir que d'un effet de confinement du complexe au sein des liposomes, différant selon leur volume interne. Autrement dit, une partie des molécules d'eau piégées au sein du liposome pourraient être dans un état non équivalent à celui de molécules d'eau libres, par exemple les molécules d'eau d'hydratation des têtes polaires des lipides ou des chaînes de PEG et influencer le signal de résonance global de l'eau intra-liposome, la fraction d'eau « non libre » étant plus faible pour un volume interne de liposomes plus grand. L'hypothèse que la concentration interne en complexe piégé par les liposomes puisse varier selon leur diamètre n'est pas totalement exclue mais dans ce cas les plus grands liposomes devraient pouvoir encapsuler davantage de complexe (probabilité de capture proportionnelle à la fraction volumique piégée) et donc conduiraient à un effet de déplacement chimique plus important ce qui ne semble pas être le cas car ce sont bien les plus grands liposomes qui correspondent à un faible B_1 optimum (faible k_{ex}) qui coïncide par ailleurs avec un faible effet de shift.

Il serait intéressant à ce stade de l'étude d'examiner séparément l'influence de la taille des liposomes et de leur concentration interne pour élucider le comportement global d'un système LipoCEST. Néanmoins, il apparaît assez clairement qu'un échantillon de liposomes issus du même film lipidique hydraté avec une même solution de complexe paramagnétique et fabriqués par extrusion séquentielle ne constitue pas un agent CEST unique mais un mélange d'agents CEST correspondant chacun à différentes sous-populations possédant des critères distincts en termes d'effet de shift, de constante d'échange k_{ex} et d'impulsion de saturation d'aimantation optimale et conduisant chacun un effet CEST qui lui est propre et qui dépend à la fois de leur concentration dans le mélange et du nombre de molécules d'eau intra-liposome.

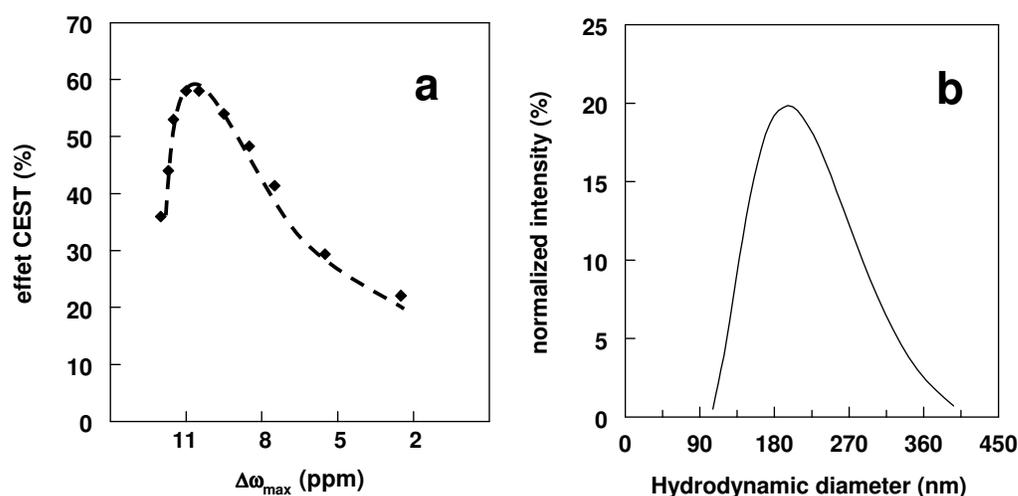


Figure 12 : Effet CEST à 37°C des liposomes LipoCEST EPC/DSPEPEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) contenant 298mM de Tm-DO3A (12mM lipides) pris au maximum des spectres de l'effet CEST à B_1 variable en fonction de la différence de déplacement chimique des protons échangeables (a). Distribution des diamètres hydrodynamiques de la même préparation (b).

Influence de la composition membranaire

L'influence de la composition membranaire a également été examinée sur quatre préparations différentes de liposomes LipoCEST encapsulant une solution de Tm-DO3A de concentration équivalente, les liposomes ayant été purifiés dans des conditions iso-osmotiques. Les mesures de perméabilité (partie 3, chapitre I) ont montré que les membranes EPC 100 %mol, EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 %mol et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ de contenu en cholestérol proche de 25 %mol ou de 35 %mol présentent des temps de résidence de l'eau intra-liposome de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de microsecondes selon le diamètre des vésicules pour les deux premières membranes et d'une ou de plusieurs millisecondes selon la teneur en cholestérol pour les suivantes.

La Figure 13 reporte les distributions de taille des quatre systèmes LipoCEST comparés. Les spectres d'effet CEST enregistrés à un B_1 de $6,7 \mu\text{T}$ sont présentés Figure 14. Les effets CEST pris au maximum des courbes sont très voisins et tous supérieurs à 50 %. Comme déjà évoqué dans le paragraphe précédent, les écarts sont le résultat de plusieurs facteurs : diamètre des liposomes (k_{ex} variable et quantité d'eau échangeable variable), distribution de taille et concentrations relatives des sous-populations auxquels s'ajoutent les différences de perméabilité de la membrane liée à leur composition (k_{ex} variable modulant l'effet CEST pour un B_1 fixe, sachant que selon la théorie, $B_1 \text{ optimal} \propto k_{\text{ex}}/2\pi$).

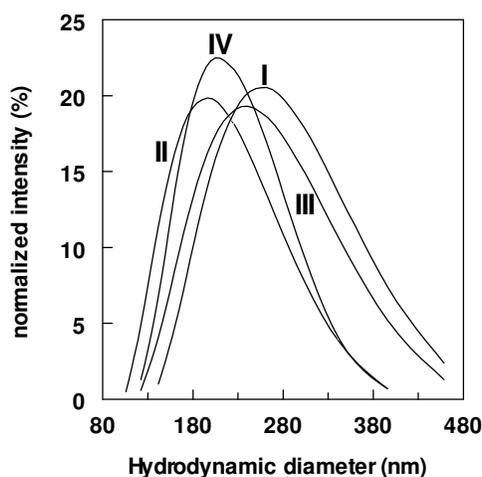


Figure 13 : Distribution des diamètres hydrodynamiques (déterminés de quatre préparations de systèmes LipoCEST de Tm-DO3A. EPC 100 % mol (I), EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol (II), EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol (III) et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 60:35:5 % (IV).

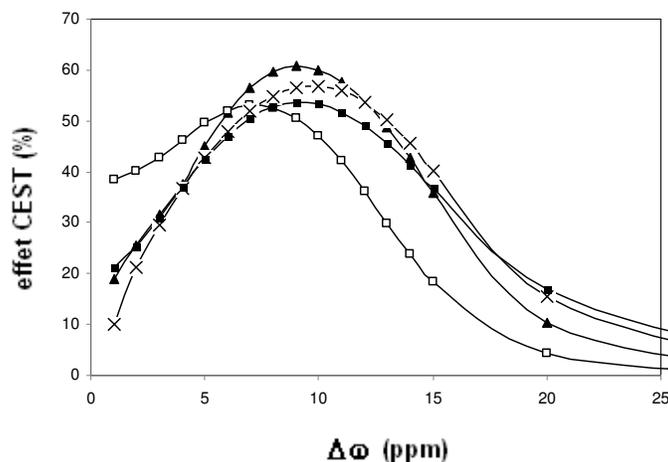


Figure 14 : Effet CEST à $6,7\mu\text{T}$ et 37°C de liposomes LipoCEST de Tm-DO3A de membranes EPC 100 % mol (x; $d_h=250$ nm; 11.6 mM lipides; 304 mM Tm-DO3A), EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol (■; $d_h=192$ nm; 12 mM lipides, 298 mM Tm-DO3A) et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol (▲; $d_h=233$ nm; 10.5 mM lipides, 299 mM Tm-DO3A) et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 60:35:5 % (□; $d_h=211$ nm; 10,2 mM lipides ; 316 mM Tm-DO3A).

Si les membranes EPC, EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ contenant 24 %mol de cholestérol présentent un effet de shift semblable de 9-10 ppm, la membrane plus riche en cholestérol EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (35 %mol de cholestérol) conduit à une différence de fréquence plus faible de 7 ppm. Ce résultat ne peut provenir de la concentration interne en complexe qui est même légèrement supérieure (314 mM) à celles des autres systèmes. Il semblerait que l'effet de shift optimal pour cette membrane ne soit pas atteint à 6,7 μ T. La Figure 15 montre l'évolution de l'effet CEST de ces liposomes à B₁ variable. On constate un comportement similaire à celui observé avec les liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figure 5 de l'article), à savoir une augmentation progressive de $\Delta\omega$ avec la valeur de l'impulsion de présaturation. Il semble donc que la réponse CEST des systèmes liposomes soit retrouvée pour des membranes de composition différente. Malheureusement, nous ne disposons pas d'enregistrement au-delà de 6,7 μ T ce qui aurait peut-être conduit à la mise en évidence d'une sous-population de liposomes supplémentaires déplaçant la fréquence de l'eau interne à plus de 7 ppm.

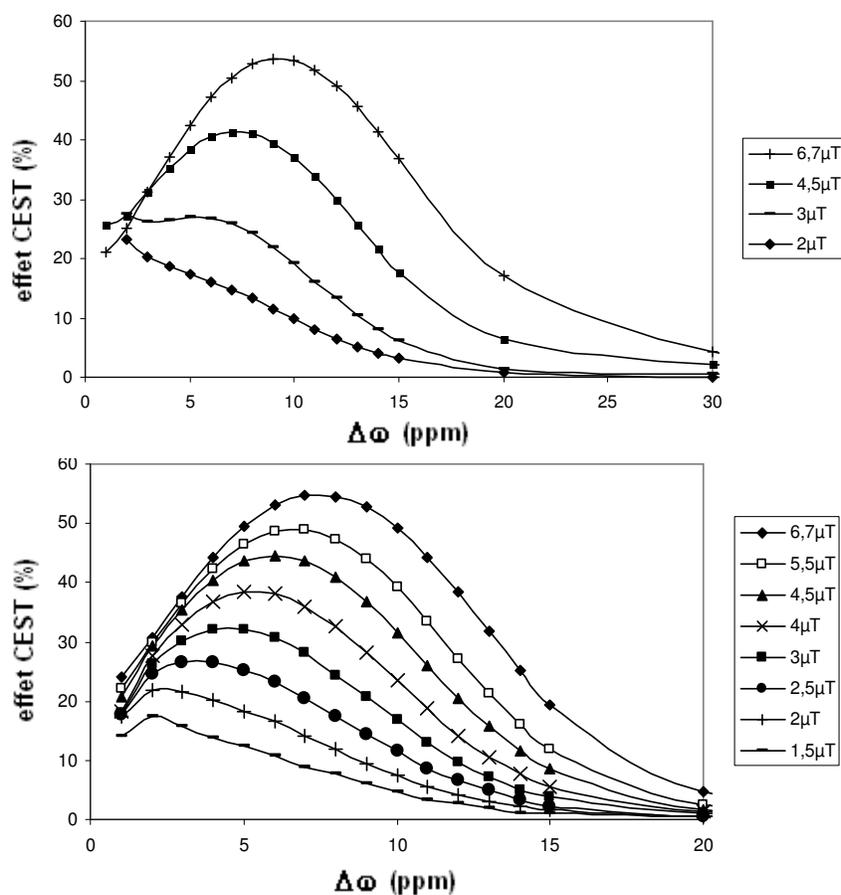


Figure 15 : Effet CEST à 37°C de liposomes LipoCEST de Tm-DO3A mesurés à différents B₁ (voir légende à droite) de membrane EPC/DSPEPEG₂₀₀₀ (95:5 % mol, 12mM lipides, d_h = 192nm) ou EPC/CHOL/DSPE PEG₂₀₀₀ (60:35:5 % mol, 10,2mM lipides; d_h=211nm).

Stabilité du système

En absence de cholestérol dans la membrane d'un liposome encapsulant un complexe cyclique de lanthanide, une fuite du matériel encapsulé a pu être observée [Tilcock et al. 1999]. La température de 37°C a été mise en cause comme provoquant une fluidité des chaînes de phospholipides, facilitant ainsi la fuite des complexes [Fossheim et al. 1999]. Cette fuite de matériel est induite par la différence de potentiel chimique du complexe entre le compartiment intra-liposome et le milieu extérieur. Ainsi, dès lors que le milieu dans lequel baignent les liposomes est débarrassé du complexe non encapsulé, le gradient de potentiel chimique provoque la fuite dont la vitesse est plus ou moins lente selon la perméabilité de la membrane. C'est pourquoi, dans toutes nos expériences, nous avons tenu compte de ce facteur d'instabilité et pour cela nous avons toujours purifié les liposomes sur colonne d'exclusion stérique juste avant les enregistrements de spectres de réponse CEST. Il était cependant important d'examiner l'influence de la fuite du complexe sur l'efficacité de la réponse CEST des liposomes.

Afin d'appréhender la stabilité des systèmes LipoCEST de Tm-DO3A, nous avons suivi l'évolution de leur distribution de tailles sur une période de 120 jours après préparation, lorsque la température de conservation est de 8°C. Les résultats du Tableau 5 montrent que les liposomes EPC 100 %mol ont tendance à former des agrégats dès une semaine. Par contre, les liposomes PEGylés montrent une meilleure stabilité de diamètre hydrodynamique pendant 2 mois. Ces résultats tendent à montrer que la structure vésiculaire est préservée intacte. Au-delà de 2 mois, les liposomes les plus riches en cholestérol montrent l'apparition d'une seconde population d'objets de plus grande taille, certainement liée à un phénomène de séparation de phase du cholestérol à la température de 8°C.

L'acquisition de spectres d'effet CEST de lipoCEST Tm-DO3A de différentes membranes (EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%), EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 mol%); EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (60:35:5 mol%) et EPC (100 mol%) et de différentes concentrations internes en complexe (entre 135 mM et 298 mM) a montré une diminution de 50% en efficacité CEST, 6 jours après passage sur colonne d'exclusion stérique. Pour illustrer ce comportement, la Figure 16 montre l'évolution de la réponse CEST de liposomes LipoCEST conservés à 37°C sur une période de 18 heures.

Tableau 11 : Diamètres hydrodynamiques moyens de liposomes LipoCEST (données QELS).

	EPC (100 mol%)	EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (60:35:5mol%)	EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5mol%)	EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%)
jour j	250±53 nm PdI : 0,113	219±25 nm PdI : 0,112	219±13 nm PdI : 0,059	215±17 nm PdI : 0,08
j+9	217±52 nm 823±793 nm PdI : 0,963	236±24 nm PdI : 0,101	226±14 nm PdI : 0,061	219±11 nm PdI : 0,048
j+26	258±68 nm 1120±302 nm 5430±1322 nm PdI : 0,62	232±15 nm PdI : 0,065	217±14 nm PdI : 0,063	221±24 nm PdI : 0,107
j+60	219±138 nm 1690±803 nm 5250±2345 nm PdI : 0,628	228±32 nm PdI : 0,141	218±21 nm PdI : 0,096	230±18 nm PdI : 0,078
j+120	375±269 nm 4580±3279 nm PdI : 0,716	181±35 nm 868±64 nm PdI : 0,744	221±59nm PdI : 0,131	236±23 nm PdI : 0,184

PdI : indice de poly-dispersité ou Polydispersity Indice

Juste après purification le système montre une différence de déplacement chimique de 8 ppm et une efficacité CEST de 55%, puis $\Delta\omega$ diminue à 6 ppm avec un effet CEST réduit à 45% après 4h et chute radicalement à 3 ppm avec une perte d'effet CEST notable (22%) après 18h. La diminution d'effet de shift est expliquée par la diminution de concentration interne de complexe à laquelle s'ajoute dans une moindre mesure le déplacement de la fréquence de l'eau extérieure en contact avec le complexe qui a fui. La perte d'effet CEST est liée également à une plus faible concentration interne de complexe (cf. Figure 16).

Une seconde expérience, cette fois réalisée sur des liposomes fraîchement préparés en conditions iso-osmotiques mais dont le milieu extérieur contenait des concentrations connues ajoutées de complexe Tm-DO3A a été réalisée pour simuler des conditions de fuites et vérifier l'interprétation des résultats précédents. La Figure 17 qui reporte les spectres de réponse CEST résultants, illustre l'influence de molécules de complexe de lanthanide libres dans la solution extérieures aux liposomes sur leur réponse CEST.

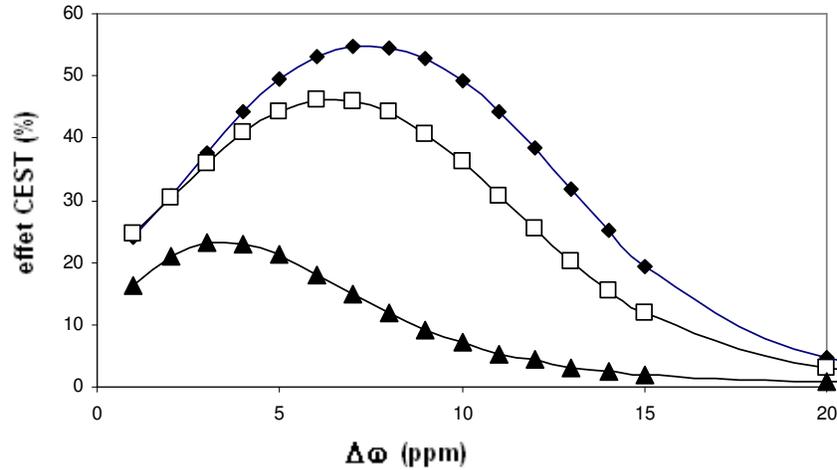


Figure 16: Effet CEST à $6,7\mu\text{T}$ et 37°C de liposomes LipoCEST Tm-DO3A (311mM) EPC/CHOL/DSPE PEG₂₀₀₀ (60:35:5 % mol, 9,9mM lipides; $d_h=221\text{nm}$). Maintenus à 37°C et dont l'acquisition est faite juste après purification (◆), 4h après (□) et 18h après (▲).

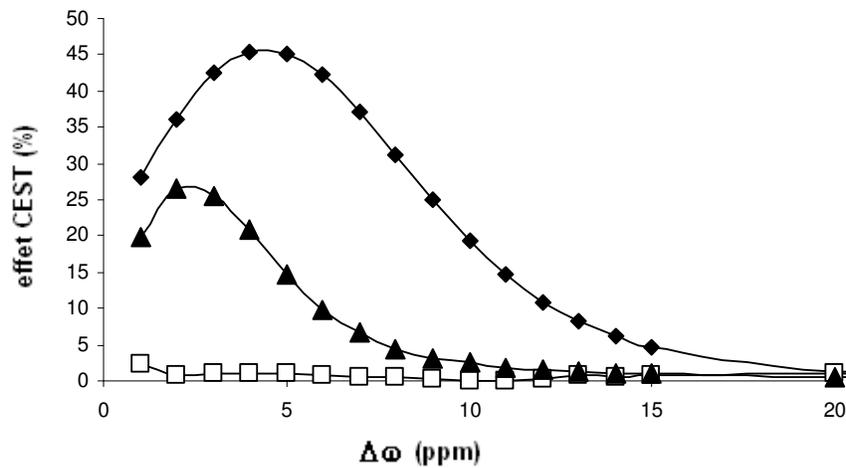


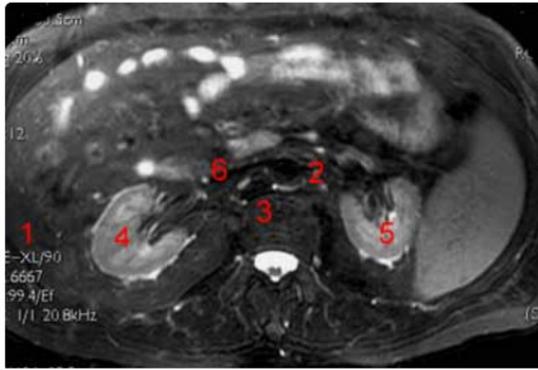
Figure 17 : Effet CEST à 37°C et à $6,7\mu\text{T}$ de liposomes LipoCESTs de Tm-DO3A (135mM interne) de EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) avec des concentrations extérieures de Tm-DO3A de 0mM (12,5mM lipides, ◆); 35mM (13,7mM lipides, ▲) et 135mM (17,6mM lipides, □).

Comme attendu, pour des concentrations interne et externe identiques de complexe Tm-DO3A, aucun signal CEST n'est observé. Pour une concentration externe équivalente à 25% de la concentration interne, l'effet de déplacement chimique mesuré est divisé par 2 (de 5 à 2,5 ppm) tout comme l'efficacité CEST (de 50% à 25%). Cette étude confirme l'influence de la fuite sur la perte de réponse CEST.

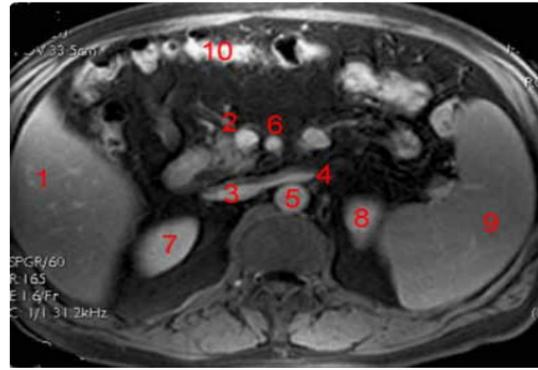
On peut noter toutefois que dans des conditions d'applications *in vivo*, la fuite de complexe va certes entraîner une atténuation de l'effet de shift mais relativement bien préserver l'effet CEST car, une fois le complexe à l'extérieur du liposome son volume de dilution sera très grand et sa concentration locale négligeable dans le compartiment extra-liposome. Par ailleurs, en vue d'une administration systémique, la cinétique de circulation dans le compartiment sanguin est telle que même pour des liposomes PEGylés, il sera important de réaliser des images au cours des premières heures après injection pour avoir une concentration plasmatique suffisante, ce qui reste compatible avec la stabilité physique de notre système LipoCEST EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀. Une amélioration pourrait être d'utiliser des liposomes dont la membrane est plus imperméable par incorporation de cholestérol [Tilcock et al. 1999] ou bien d'utiliser un complexe moins hydrophile comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

II-4 Exploration IRM de la réponse CEST de liposomes PEGylés de Tm-DO3A après injection intraveineuse chez le rat

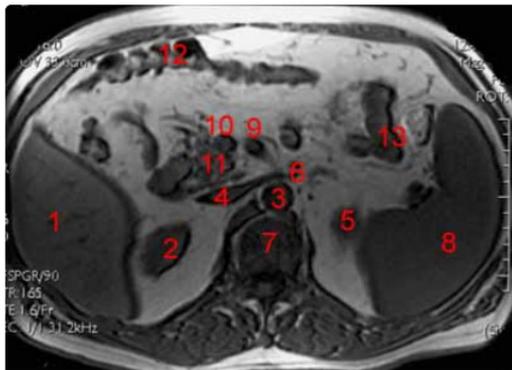
Nous avons pu réaliser une expérience IRM-CEST *in vivo* à 7,05 T tout à fait préliminaire chez le rat. Un seul animal a été imagé après administration intraveineuse, au niveau de la veine caudale, de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) contenant du Tm-DO3A à une concentration intra-liposome isotonique. De manière à visualiser l'anatomie de l'abdomen du rat, la Figure 18 montre différentes images IRM réalisées en pondération T₂ ou T₁ avec ou sans produit de contraste au gadolinium et extraite d'un atlas de référence. A partir de ce dernier nous avons pu situer les organes d'intérêt sur les images IRM-CEST présentées dans la Figure 19. Ces images montrent tout d'abord que les liposomes contenus dans le tube témoin donnent un signal CEST très net et constant sur toute la période d'examen (un peu plus de 2 heures). Néanmoins, il est difficile de conclure à une conservation de l'effet CEST une fois les liposomes injectés (graphe de la Figure 19).



Anatomie IRM de l'abdomen. Coupe axiale, T2FATSAT. Image 27.
1, Foie. 2, Aorte. 3, Corps vertébral. 4, rein droit. 5, rein gauche. 6, Veine cave inférieure.



Anatomie IRM de l'abdomen. Coupe axiale, T1, après gadolinium. Image 18.
1, foie. 2, veine mésentérique supérieure. 3, veine cave inférieure. 4, veine rénale gauche. 5, aorte abdominale. 6, artère mésentérique supérieure. 7, rein droit. 8, rein gauche. 9, rate. 10, gros intestin.



Anatomie IRM de l'abdomen. Coupe axiale, T1. Image 10.
1, foie. 2, rein droit. 3, aorte. 4, veine cave inférieure. 5, rein gauche. 6, veine rénale gauche. 7, rachis. 8, rate. 9, artère mésentérique supérieure. 10, veine mésentérique supérieure. 11, processus uncine du pancréas. 12, gros intestin. 13, petit intestin.

Figure 18: Images IRM de l'abdomen d'un rat en coupe axiale extraite du site web [info-radiologie.ch/atlas_irm_abdomen.php 2012].

D'après la Figure 20, on peut toutefois noter qu'au cours du temps post-injection, les temps de relaxation T_1 et T_2 sont nettement plus courts au niveau du foie et des reins 1h30 après injection, ce qui pourrait indiquer une prise en charge du composé paramagnétique par ces organes qui suivrait alors un chemin d'élimination classiquement rencontré pour des agents de contraste de petite masse moléculaire. Cette observation pourrait suggérer qu'une partie des liposomes sont présentés au foie, certainement après capture par des macrophages où ils perdent leur intégrité, libérant le complexe qui ensuite est éliminé séparément des liposomes. Cette hypothèse mériterait d'être approfondie par une étude pharmacocinétique de l'agent LipoCEST.

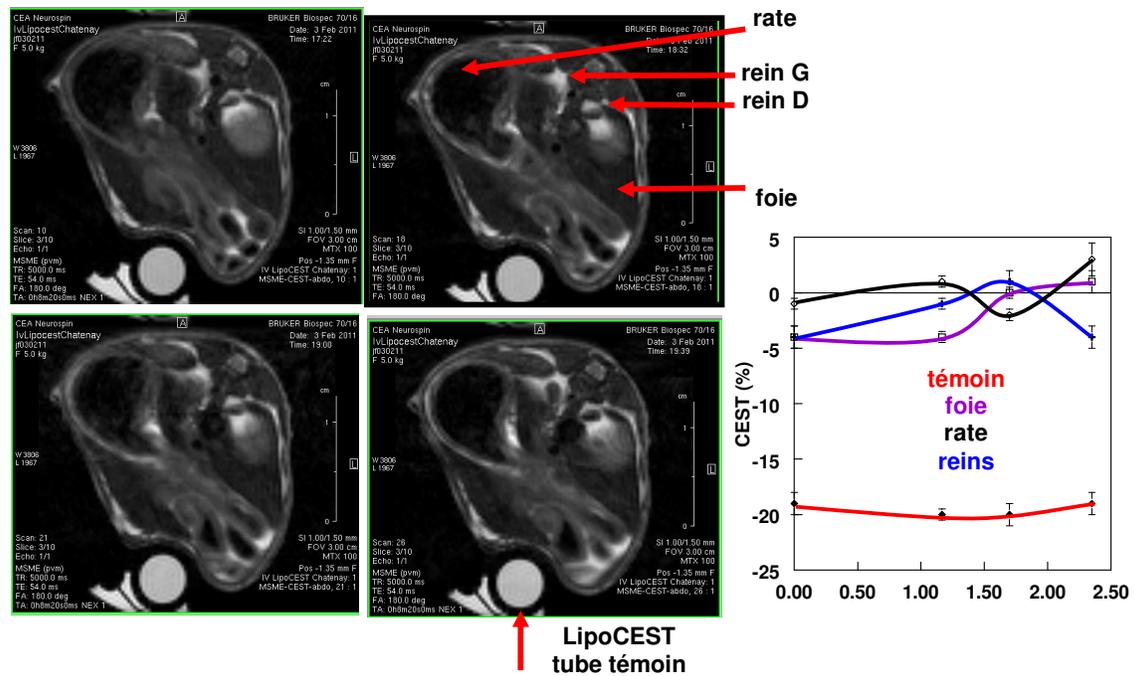


Figure 19 : Images IRM-CEST de l'abdomen d'un rat en coupe axiale avant (image en haut à gauche) et après injection intraveineuse de liposomes LipoCEST EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % mol ; 12 mM lipides ; injection 200 μ L) encapsulant le complexe Tm-DO3A (298 mM) à 1h10, 1h42 et 2h20. Un tube rempli de la préparation de liposomes a été placé à côté de l'animal pour le signal témoin. Le graphe reporte le signal CEST moyenné sur différents organes et le tube témoin. Para mètres de séquence MSME : TR= 5000 ms; 12 échos séparés avec premier TE₁ = 54 ms; résolution spatiale = 150 x 150 x 660 mm³, temps acquisition = 6 min; 10 slices.

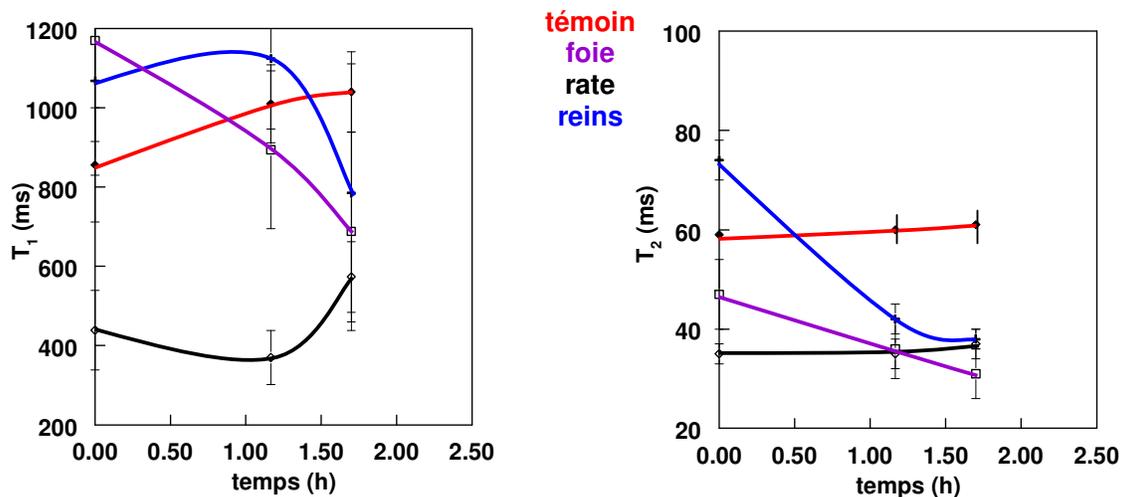


Figure 20 : Evolution des temps de relaxation longitudinale (T₁) et transversale (T₂) des protons contenus dans les organes déduits de l'acquisition IRM effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites Figure 18 et sur le même animal.

III. Influence de la structure du ligand sur l'efficacité et la stabilité des agents LipoCEST

Dans la littérature, les systèmes LipoCEST préparés en conditions iso-osmotiques (liposomes de géométrie sphérique) ont été exclusivement basés sur l'encapsulation de complexes de thulium formés à partir de ligands cycliques ne pouvant lier au plus qu'une molécule d'eau de coordination, le [Tm(III)-DOTA]⁻ [Zhao et al. 2008] et le [Tm(III)-DOTMA]⁻ [Aime et al. 2005] (Figure 1). Il était intéressant de reprendre ces ligands et leurs complexes respectifs pour comparer leur réponse CEST une fois encapsulés dans des liposomes en fonction de la composition membranaire et de certains facteurs tels que la température, la concentration interne ou le temps de stockage des liposomes, à celle apportée par le système basé sur l'encapsulation de [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂] (Figure 1). Dans cet objectif, ces deux complexes ont été synthétisés et tout d'abord caractérisés pour connaître leurs propriétés d'agent de shift et la cinétique d'échange d'eau au niveau de leur sphère de coordination, paramètres qui n'avaient, à notre connaissance, jamais été déterminés. Puis, nous avons réalisé un certain nombre d'expériences de RMN-CEST ou d'IRM-CEST sur les liposomes LipoCEST issus de ces complexes.

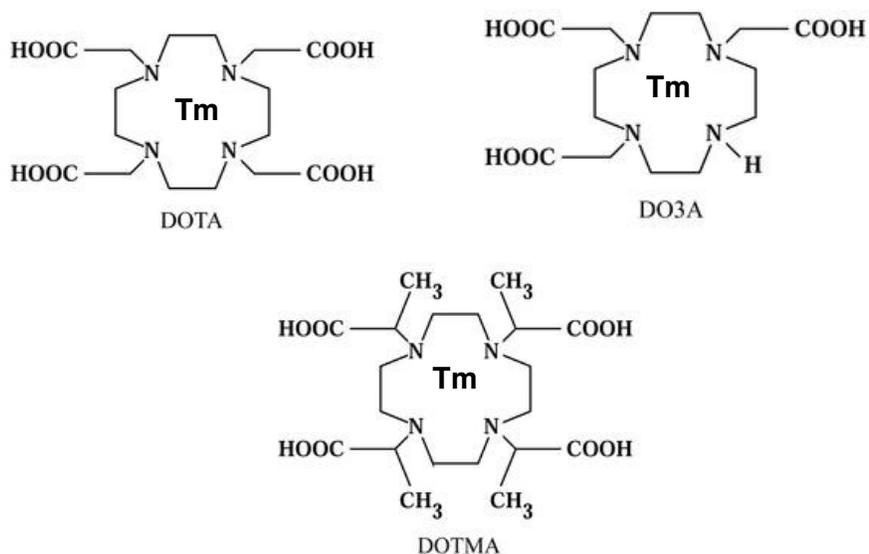


Figure 1 : Structures chimiques des molécules [Tm(III)-DOTA]⁻ ; [Tm(III)-DOTMA]⁻ et [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂]

III-1 Vitesse d'échange de l'eau liée au lanthanide par RMN de l'oxygène-17

Une collaboration avec le Pr. Vander Elst de l'Université de Mons (Belgique), a permis la détermination de la vitesse d'échange de l'eau sur le centre paramagnétique de chaque complexe par la mesure du temps de relaxation transversale (T_2) de l'oxygène ^{17}O de l'eau, en présence et en absence d'agent paramagnétique, à partir de solutions aqueuses à 200 mM de complexes.

Eléments théoriques

Selon la théorie établie par T. J. Swift et R. G. Connick [Swift et Connick 1962 ; Vander Elst et al. 2002 ; Powell et al. 1996], les mesures en O^{17} -RMN des vitesses de relaxation longitudinale et transversale réduites, respectivement $1/T_{1r}$ et $1/T_{2r}$, ainsi que le déplacement chimique réduit $\Delta\omega_r$, permettent, selon les équations [1-3], de déterminer les paramètres cinétiques gouvernant la fixation d'une molécule d'eau sur le site de coordination d'un centre paramagnétique en négligeant la contribution de la relaxivité longitudinale et transversale de la sphère externe [Micskei et al. 1993]:

$$\frac{1}{T_{1r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1d}} \right] = \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad [1]$$

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2d}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad [2]$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_d) = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} \quad [3]$$

Avec :

P_m la fraction molaire de molécules de solvant en première sphère de coordination

T_1 et T_2 les temps de relaxation longitudinale et transversale de l'oxygène-17 en présence d'espèce paramagnétique

T_{id} ($i=1$ ou 2) les temps de relaxation de l'oxygène-17 de l'eau de référence

T_{im} les temps de relaxation de l'oxygène-17 de l'eau liée au lanthanide

ω le déplacement chimique de l'oxygène-17 en présence d'espèce paramagnétique

ω_d le déplacement chimique de l'oxygène-17 pour la référence diamagnétique

$\Delta\omega_m$ la contribution des molécules d'eau en première sphère de coordination

La contribution de sphère interne au **déplacement chimique** $\Delta\omega_m$ est donnée par le déplacement chimique des molécules d'eau liées, déterminé par le couplage hyperfin entre le spin électronique du Ln(III) et le spin nucléaire du noyau ^{17}O (Equation [4]):

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B_0}{3k_B T} \frac{A}{h} \quad [4]$$

où g_L est le facteur de Landé, μ_B le magnéton de Bohr et B_0 le champ magnétique extérieur.

La vitesse de relaxation longitudinale $1/T_{1m}$ de l'oxygène-17 des molécules d'eau liées est régie par les interactions dipôle-dipôle et quadripolaires ($I = 5/2$) et est décrite par l'Equation [5]:

$$\frac{1}{T_{1m}} = \left[\frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{Ln-O}^6} S(S+1) \right] \times 6\tau_{d1} + \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \chi^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \tau_R \quad [5]$$

Avec :

γ_I le rapport gyromagnétique nucléaire de l'oxygène-17

r_{Ln-O} la distance moyenne Ln(III)-O (moyenne à 2,4Å [Benetollo et al. 2003])

I le nombre quantique de spin nucléaire ($I = 5/2$)

χ la constante de couplage quadripolaire

η un paramètre lié au défaut de symétrie axiale du noyau

τ_{d1} est le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage dipolaire. Il est exprimé par l'Equation [6].

$$\frac{1}{\tau_{d1}} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} \quad [6]$$

La vitesse de relaxation transversale $1/T_{2m}$ provient principalement de l'interaction scalaire entre le Ln(III) et les noyaux oxygène du solvant. Elle est décrite par l'Equation [7]:

$$\frac{1}{T_{2m}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \times \tau_{1s} \quad [7]$$

Avec

A/\hbar la constante de couplage scalaire (ou hyperfin) entre le noyau oxygène et le Ln(III)

τ_{1s} le temps de corrélation associé au couplage, définis selon l'Equation [8] :

$$\frac{1}{\tau_{1s}} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_m} \quad [8]$$

Le temps T_{1e} selon la théorie de Bloembergen-Morgan s'écrit:

$$\frac{1}{T_{1e}} = 2C \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad [9]$$

$$C = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_v [4S(S+1) - 3] \quad [10]$$

Où Δ^2 représente le carré de l'énergie associée à la levée de dégénérescence à champ nul (ZFS) et τ_v le temps de corrélation associé à la modulation vibratoire du ZFS. Les dépendances de τ_m et τ_v en fonction de la température sont données respectivement par les équations d'Eyring (Equation [11]) et d'Arrhénius (Equation [12]):

$$\frac{1}{\tau_m} = k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp \left[\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right] = \frac{k_{ex}^{298} T}{298.15} \exp \left[\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad [11]$$

k_{ex}^{298} est la vitesse d'échange à 298,15 K, ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger sont l'entropie et l'enthalpie d'activation du processus d'échange.

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp \left[\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right] \quad [12]$$

où τ_v^{298} est le temps de corrélation à 298,15 K et E_v l'énergie d'activation [Nonat 2007].

Résultats

Des échantillons de 2 mL de solutions à 200mM de complexes [Tm(III)-DOTA, H₂O]⁻, [Tm(III)-DOTMA, H₂O]⁻ et [Tm(III)-DO3A, (H₂O)₂] dans de l'eau Milli-Q ont été placés dans des tubes en verre de 10 mm de diamètre. Un spectromètre Bruker AMX-300 équipé d'une sonde ¹⁷O permet la mesure du déplacement chimique de l'oxygène-17. Les analyses sont menées à des températures allant de 280 K à 315 K tous les 5 K, contrôlées par un flux d'air ou d'azote (Bruker BVT-2000 unit). Les temps de relaxation longitudinale T₁ ont été mesurés par la méthode d'inversion-récupération et les temps de relaxation transversale T₂ par la technique d'échos de spins de Carr-Purcell-Meiboom-Gill, respectivement sur un échantillon d'eau (afin de vérifier les valeurs de la contribution diamagnétique) et sur la solution de complexe.

Le tracé de 1/T_{2r} en fonction de 1/T (T, température) donne généralement une courbe en forme de « cloche » (Equation [2] où τ_M est exprimé selon l'Equation [11]), illustrée Figure 2 dans le cas du complexe Gd-DTPA:

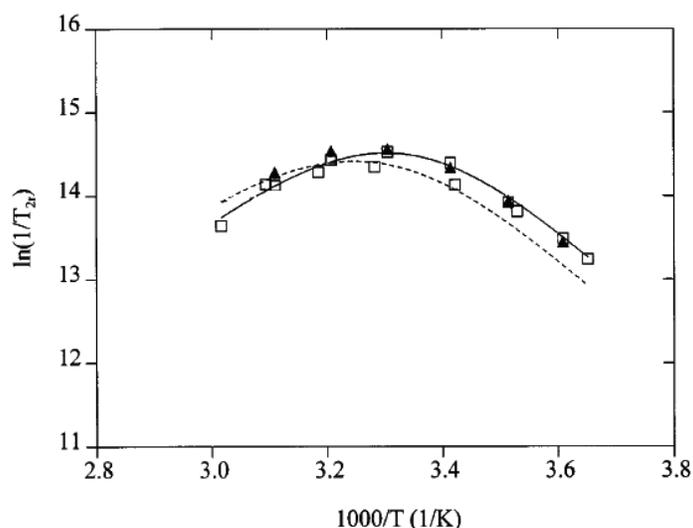


Figure 2 : Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite (14,1 T) des noyaux ¹⁷O de l'eau liée au centre paramagnétique du complexe Gd-DTPA en fonction de l'inverse de la température et obtenue en absence (▲) et en présence (□) d'albumine de sérum bovin [adapté de Toth et al. 1998].

A partir de cette courbe, les équations décrites précédemment permettent de calculer la vitesse d'échange de l'eau sur le centre lanthanide.

Lorsque l'échange de l'eau est trop rapide vis-à-vis de T_{2m} (τ_M << T_{2m}) et de Δω_M (τ_M << 1/Δω_M), la courbe obtenue s'écarte de sa forme habituelle et un tracé pseudo-linéaire

monotone croissant sera observé (augmentation de $1/T_{2r}$ avec une diminution de T). Cette partie de la courbe obtenue représente en fait la variation de $1/T_{2m}$ en fonction de T lorsque T_{2m} et T_{2r} sont équivalentes [Pubanz et al. 1995]. Dans un tel cas, les méthodes de calculs classiques ne peuvent être utilisées et une tentative de corrélation sur les valeurs de T_{1r} et T_{2r} doit être appliquée simultanément [Vander Elst et al. 2002]. Les résultats obtenus lors de notre étude (Figure 3) appartiennent à cette seconde situation et le Tableau 1 donne les valeurs de τ_M obtenues.

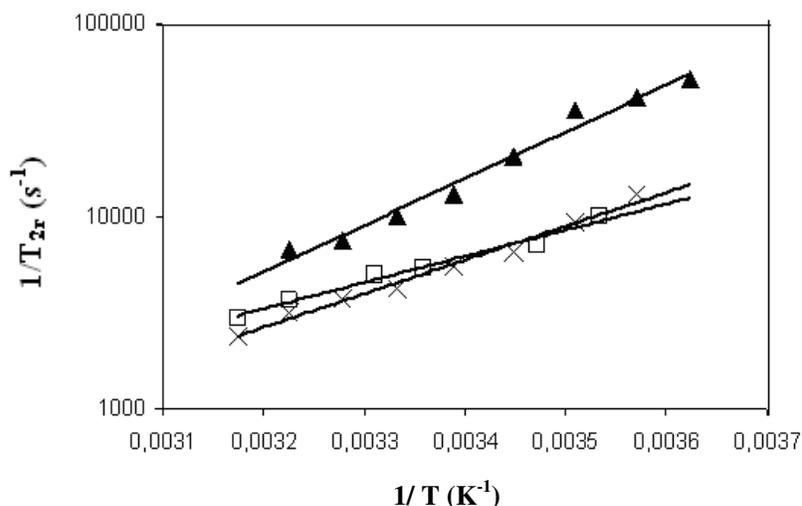


Figure 3 : Variation de la vitesse de relaxation transversale réduite (14,1 T) des noyaux ^{17}O de l'eau liée au centre paramagnétique des complexes Tm-DOTA (\blacktriangle), Tm-DOTMA (\times) et Tm-DO3A (\square), en fonction de l'inverse de la température. Solutions à 200mM dans l'eau (2 mL). Chaque point est la moyenne de trois mesures (moins de 3% d'erreur).

Tableau 12 : Temps d'échange τ_M de l'eau calculés à 37°C par la méthode de corrélation sur les valeurs de T_{1r} et T_{2r} [Vander Elst et al. 2002] pour les différents complexes de thulium étudiés.

Complexe	q	τ_M (ns)
Tm-DOTA	0 ^a	non déterminé
Tm-DOTMA	1	28
Tm-DO3A	2	9,5

^avoir discussion dans le texte

Malheureusement, la procédure de calcul utilisée pour extraire des paramètres pertinents des courbes expérimentales de la Figure 3 n'a pas permis de lever l'indétermination sur le temps de résidence de l'eau pour le complexe Tm-DOTA. Néanmoins, la forme de la courbe

associée à ce complexe peut laisser penser que le temps de résidence, comme pour les deux autres composés, est également très court.

Comme détaillé dans le chapitre III de la partie bibliographie, quatre conformations moléculaires peuvent exister pour tout chélate de lanthanide cyclique, leur probabilité de formation étant liée à la nature du centre lanthanide et la structure chimique du ligand. Les conformations SA (pour *square antiprismatic*) et TSA (pour *twisted square antiprismatic*) diffèrent par l'angle de rotation entre les plans définis par les atomes principaux du cycle chélate et les conformations notées souvent SA' et TSA' définissent des orientations différentes des groupes latéraux fixés sur les atomes du cycle chélatant.

La stabilité de la liaison d'une molécule d'eau au centre lanthanide dépend de la conformation. Tandis que les conformations SA' et TSA' inhibent la fixation d'une molécule d'eau, la conformation TSA permet un échange avec l'eau plus rapide que la conformation SA car la distance entre l'oxygène de l'eau et le centre métallique est plus importante. La littérature nous enseigne que dans le cas du Tm-DOTA, la conformation majoritaire est TSA' [Benetollo et al. 2003]. Autrement dit, même s'il existe un site possible pour lier une molécule d'eau comme dans le cas du Gd-DOTA, dans le cas du thulium la première sphère de coordination est très peu accessible et le temps de résidence de l'eau y est extrêmement court (nombre de molécules d'eau de coordination $q \neq 0$). Ceci explique probablement la difficulté de déterminer expérimentalement ce paramètre. La conséquence de ce comportement est que tout effet de déplacement chimique ne peut donc provenir que de l'eau de seconde sphère d'hydratation. Pour les deux autres cages, les conformations majoritaires sont de type TSA [Hermann et al 2008] et permettent donc l'accès à la sphère de coordination qui lie une molécule d'eau dans le cas du ligand DOTMA ($q=1$) et deux molécules d'eau ($q=2$) pour le DO3A mais avec des temps de résidence rapides, en accord avec nos résultats, puisque ces derniers sont de l'ordre de la dizaine de nanosecondes (Tableau 1).

La méthode de corrélation sur les valeurs de T_{1r} et T_{2r} [Vander Elst et al. 2002] a également permis de déterminer d'autres paramètres de l'équation de Swift-Connick, paramètres qui ont participé au calcul de τ_M et qui sont listés dans le Tableau 2.

Tableau 13 : Valeurs des différents paramètres de l'équation de Swift-Connick calculés à 37°C par la méthode de corrélation sur les valeurs de T_{1r} et T_{2r} [Vander Elst et al. 2002] pour les complexes Tm-DOTMA et Tm-DO3A.

paramètres de l'équation de Swift-Connick	Tm-DOTMA	Tm-DO3A
τ_{so} (ps)	0,2	0,2
E_s (J mol)	79,6	78,7
τ_R^{298} (ps)	75	75
E_R (kJ mol)	31,9	27,9
$ A/\hbar $ (10^6 rad s ⁻¹)	2,86	4,49
r (nm)	0,24	0,24
ΔH (kJ mol)	31,2	28,4
ΔS (J molK ⁻¹)	0,0105	0,007
$(e^2qQ/h) (1+\eta^2/3)^{1/2}$ (MHz)	8.	7,16
τ_M^{310} (ns)	28	9,5

III-2 Variation de déplacement chimique induite par les complexes

Les mesures de déplacement chimique des protons de l'eau de solutions à 300 mOsm de complexes Tm-DOTA et Tm-DO3A (soit 76 mM (compte tenu de la teneur en NaCl non complètement purifiée, cf. partie 2 chapitre II) et 307 mM, respectivement) ont été effectuées sur un spectromètre RMN Bruker AMX-300 (7T) dans un double tube coaxial en verre à 8°C, 20°C et 37°C (températures contrôlées par un flux d'air ou d'azote, Bruker BVT-2000 unit). Le tube interne est rempli d'eau milli-Q tandis que le tube externe contient la solution aqueuse de complexe (la solution Tm-DOTMA n'a pas pu être analysée par manque de matériel au moment des expériences). La Figure 4 reporte les résultats obtenus.

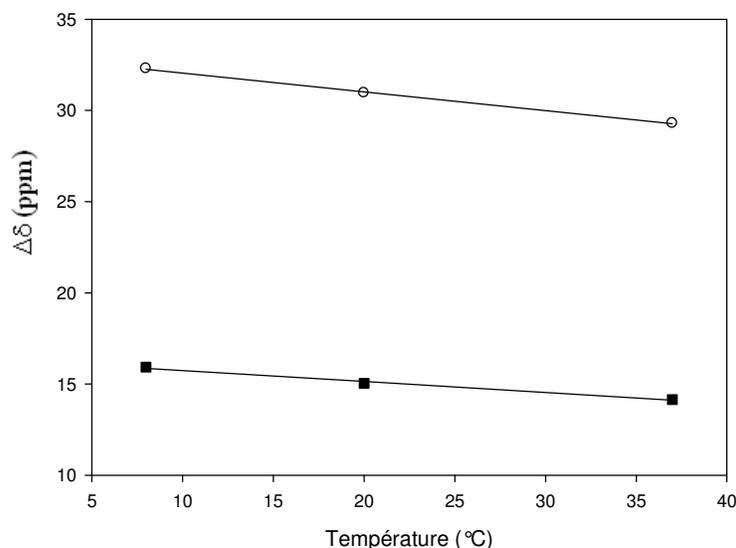


Figure 4 : Evolution du déplacement chimique des protons de l'eau de solutions de Tm-DO3A 307 mM (○) et de Tm-DOTA à 76mM (■) en fonction de la température. La référence ($\delta=0$ ppm) correspond à l'eau MilliQ.

Etant donné que le complexe Tm-DOTA possède une charge négative, la dissociation de son sel de sodium en milieu aqueux implique qu'une osmolarité de 300 mOsm est atteinte pour de plus faibles concentrations que le complexe neutre Tm-DO3A (voir mesures d'osmolarité des complexes partie 2, chapitre II). Nous avons choisi des conditions isotoniques de manière à anticiper sur l'effet de shift dans des conditions d'applications *in vivo* (administration par voie intraveineuse). Il apparaît dans ces conditions que le complexe de Tm-DO3A (augmentation de déplacement chimique de 29,3 ppm à 37°C) est plus efficace car sa concentration peut être plus que doublée par rapport au complexe Tm-DOTA (14,1 ppm à 37°C). Par ailleurs, l'effet de shift diminue avec l'augmentation de la température. A titre comparatif, une solution de complexe Eu-DOTA à 102mM conduit à une augmentation de déplacement chimique de 0,1 ppm à 37°C, montrant que ce dernier n'est pas un agent de shift. La modification de déplacement chimique $\Delta\delta$ des protons de l'eau d'une solution de Tm-DO3A à 108mM a également été mesurée à 37°C et trouvée égale à 12,8 ppm, soit très voisine de la valeur pour le Tm-DOTA à concentration équivalente.

III-3 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTA

Les études reportées dans la littérature sur les systèmes LipoCEST de Tm-DOTA s'accordent pour montrer que ce complexe conduit à l'effet de déplacement chimique le plus petit le plus souvent tel que $\Delta\omega < 3$ ppm [Zhao et al. 2008]. Il s'agit en fait d'un complexe dont la première sphère de coordination est très peu accessible aux molécules d'eau ($q \neq 0$) [Benetollo et al. 2003]. Au cours de notre travail, nous avons synthétisé des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) encapsulant une concentration isotonique de Tm-DOTA (76,3 mM). Le diamètre moyen des liposomes est de 197 ± 93 nm. Les spectres CEST à différentes valeurs de l'impulsion radiofréquence de présaturation B_1 sont présentés Figure 5. On constate que l'effet CEST atteint une valeur maximale de 55% dès 4,5 μ T pour une valeur de $\Delta\omega$ de 2,8 ppm qui n'augmente que très légèrement à 3 ppm pour $B_1 = 6,7$ μ T. Il semble donc que les conditions d'enregistrement de spectres CEST à 6,7 μ T sont raisonnables pour évaluer la réponse du système LipoCEST à base de Tm-DOTA.

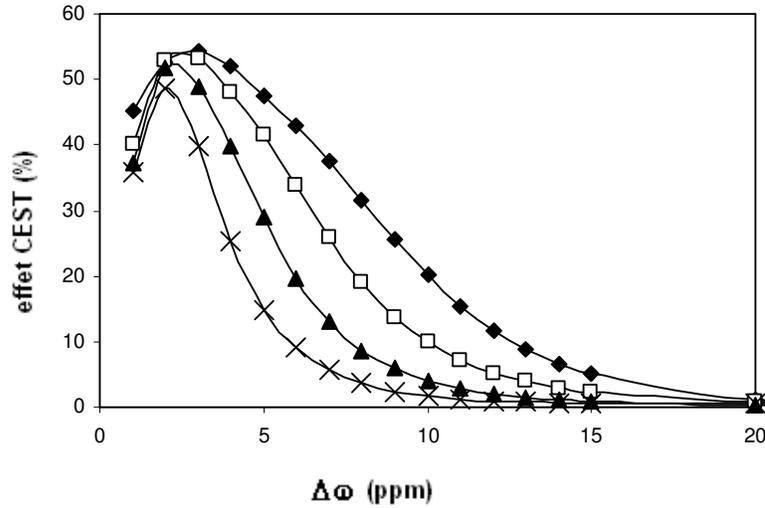


Figure 5 : Effet CEST à 37°C et 7,05T d'un agent LipoCEST de Tm-DOTA (concentration interne 76,3mM) de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 mol% (concentration en lipides 8,1mM, d_h = 197nm) à B₁ de 2μT (×), 4,5μT (□) et 6,7μT (◆).

Les mêmes membranes que celles testées pour les liposomes LipoCEST de Tm-DO3A ont été évaluées dans le cas du complexe Tm-DOTA (Figure 5).

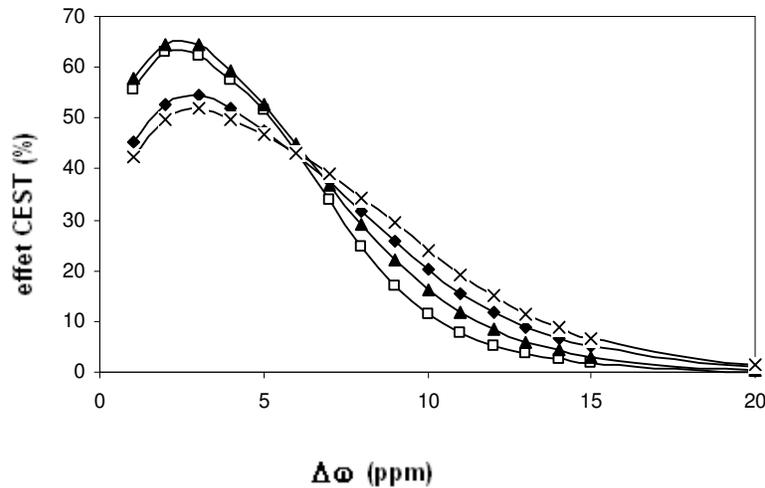


Figure 6 : Effet CEST à 6,7μT et 37°C (7,05T) d'agents LipoCEST de Tm-DOTA de membranes EPC 100 % mol (× ; d_h=227 nm ; 11,5 mM lipides ; 76,3 mM Tm-DOTA), EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol (◆;d_h=197 nm ; 8,1 mM lipides, 76,3 mM Tm-DOTA), EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol (▲;d_h=173 nm ; 10,7 mM lipides, 72,5 mM Tm-DOTA) et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 60:6355 % mol (□; d_h=191nm ;8,4mM lipides ; 72,9 mM Tm-DOTA).

Comme dans le cas du système à base de Tm-DO3A, les membranes sans cholestérol conduisent à une réponse CEST un peu moins efficace que celle des membranes avec 24 % en mole de cholestérol et dans ce dernier cas l'effet CEST optimal de 64% est atteint. La membrane à 35% en cholestérol conduit au même résultat.

Nous avons également examiné la stabilité de la réponse CEST en fonction du temps de stockage des liposomes après leur purification sur colonne d'exclusion stérique. La Figure 6 présente les spectres CEST enregistrés juste après préparation, puis 1h30 et 20 h après conservation à 8°C. Le gradient de potentiel chimique du complexe de part et d'autre de la membrane des liposomes entraîne une fuite de matériel qui conduit à la perte quasi-totale de la réponse CEST au bout de 20h. Ce comportement confirme les observations faites sur le système LipoCEST de Tm-DO3A à savoir qu'une membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ est suffisamment perméable au complexe.

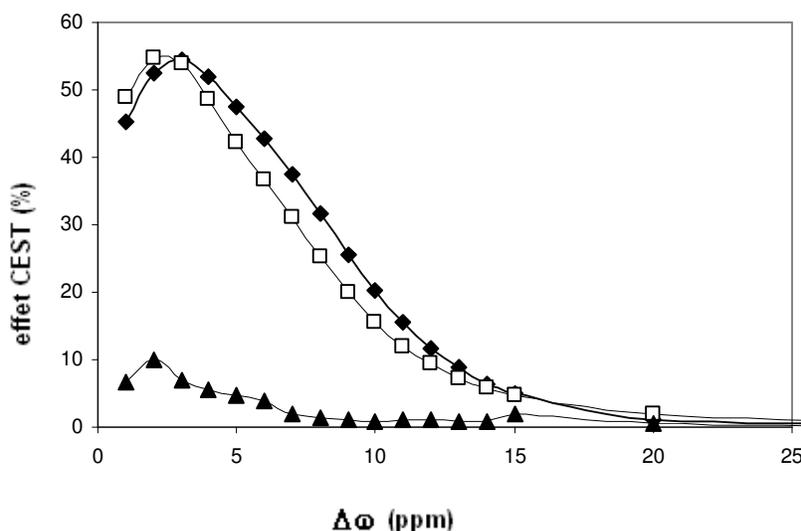


Figure 7 : Effet CEST à 6,7 μ T et 37°C (7,05T) d'agents LipoCEST de Tm-DOTA de membrane EPC/DSPE PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol ($d_h=197$ nm; 8,1 mM lipides, 76,3 mM Tm-DOTA) enregistrés juste après purification (◆) et 1,5h (□) ou 20h (▲) après purification.

Dans l'étude présentée par Zhao et ses collaborateurs [Zhao et al. 2008], un liposome lipoCEST de membrane PC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀/Rhodamine-PE 48,25/48,25/3/0,5 mol% encapsulant 200mM de complexe Tm-DOTA a montré les résultats reportés au tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des mesures de l'efficacité CEST optimale et de la différence de déplacement chimique de liposomes lipoCEST de différentes tailles et de membrane identique (PC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀/Rhodamine-PE 48,25:48,2:3:0,5 mol%) encapsulant une concentration de 200mM Tm-DOTA chacun. [d'après Zhao et al. 2008] avec nos systèmes lipoCEST Tm-DOTA de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 mol% avec 76mM en Tm-DOTA à différent B₁ ainsi

membrane	d _h (nm)	Efficacité CEST (%) ([Liposome] _{tot})	[Tm-DOTA] Intra-liposome (mM)	B ₁ (μT)	Δω (ppm)
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol%	197±10	54 (12,1nM)	76	6,7	3
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 mol%	197±10	48,5 (12,1nM)	76	2	2
PC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Rhodamine-PE 48,25:48,25:3:0,5 mol%	99±38	55 (58nM)	200	1,8	1
PC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Rhodamine-PE 48,25:48,25:3:0,5 mol%	199±110	42 (6,7nM)	200	1,8	0,9

A B₁ comparables (2μT et 1,8μT) et à diamètre de liposomes comparables (197nm et 199nm), le liposome lipoCEST de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 mol%) montre un déplacement chimique deux fois plus important que pour la membrane PC/chol/DSPE-PEG₂₀₀₀/Rhodamine-PE (48,25:48,25:3:0,5 mol%) et ce avec une concentration interne deux fois moins conséquente (76mM pour 200mM).

III-4 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTMA

Le complexe Tm-DOTMA a également été utilisé dans pour la synthèse de liposomes LipoCEST sphériques [Aime et al. 2005]. La première sphère de coordination de ce complexe contient une molécule d'eau qui se lie donc directement au centre Tm(III) (q=1). Dans ce cas, il a été observé un effet de shift maximum de 5-6 ppm pour des agents LipoCEST préparés en conditions isotoniques. Ce complexe a pour particularité de posséder quatre groupes substitutifs latéraux méthyle dont l'hydrophobie relative permet un échange rapide de l'eau liée. Nous avons également préparé des liposomes de Tm-DOTMA ayant différentes compositions membranaires et encapsulant une concentration isotonique de complexe. La Figure 8 présente les spectres CEST enregistrés à B₁=6,7 μT.

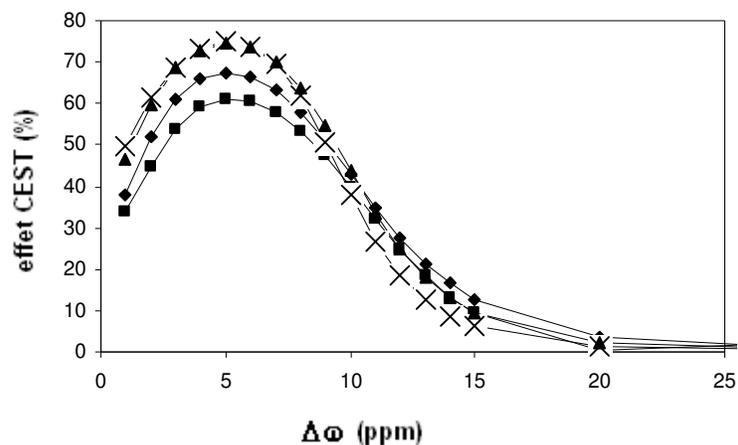


Figure 8 : Spectres CEST à 6,7 μ T et 37°C (7,05T) d'agents LipoCEST de Tm-DOTMA de membranes EPC 100% mol (■; $d_h=253$ nm ; 8,7 mM lipides ; 135 mM Tm-DOTMA), EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5% mol (◆ ; $d_h=197$ nm ; 13,6 mM lipides, 136 mM Tm-DOTMA), EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5% mol (▲; $d_h=184$ nm ; 11,8 mM lipides, 141 mM Tm-DOTMA) et EPC/CHOL/DSPE/PEG₂₀₀₀ 60:35:5% (×; $d_h=197$;6mM lipides ; 144 mM Tm-DOTMA).

Pour toutes les membranes l'effet CEST est excellent et la différence de déplacement chimique est équivalente et égale à 6 ppm. Une fois de plus, les membranes contenant du cholestérol, ont un comportement similaire et une efficacité CEST légèrement supérieure. Toutefois, alors que la théorie s'appuyant sur les équations de Bloch prédit une limite maximale d'efficacité CEST à 64,5% [Woessner et al 2005], limite que respectent les membranes sans cholestérol, il est étonnant de constater que les membranes avec cholestérol atteignent ici un effet CEST de l'ordre de 75%.

L'influence de la température a été étudiée sur des liposomes de Tm-DOTMA de membranes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 %mol et EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5% (Figure 9), l'objectif étant de ralentir les mouvements de l'eau par abaissement de la température. Dans le cas de la membrane sans cholestérol, l'effet CEST augmente avec l'abaissement de température, ce qui est en accord avec un temps de résidence plus long de l'eau dans le compartiment intraliposome (agitation ralentie) auquel pourrait également contribuer la diminution de la perméabilité de la membrane à l'eau. La membrane avec cholestérol quand à elle ne montre pas de gain, voire une légère diminution de la réponse CEST.

Il semblerait que dans ce cas, le ralentissement du déplacement de l'eau ne soit pas le facteur limitant mais bien sa vitesse de diffusion au travers de la membrane, dont la perméabilité en présence de cholestérol serait peu affectée par l'abaissement de la température (l'effet condensant du cholestérol étant quasi-indépendant de la température). Dans les deux cas, la

diminution de température atténue l'effet de shift et il est intéressant d'observer que la forme du spectre CEST devient dissymétrique, surtout à basse température (8°C), mettant en évidence l'existence de deux comportements de réponse CEST à des $\Delta\omega$ distincts. Ceci pourrait provenir d'un changement d'état partiel (conformation ou solubilité) du complexe dans le milieu intra-liposome ces deux états étant en équilibre dans la solution et dont la cinétique d'échange est ralentie par abaissement de la température. A notre connaissance, ce type d'observation n'a pas été reporté dans la littérature.

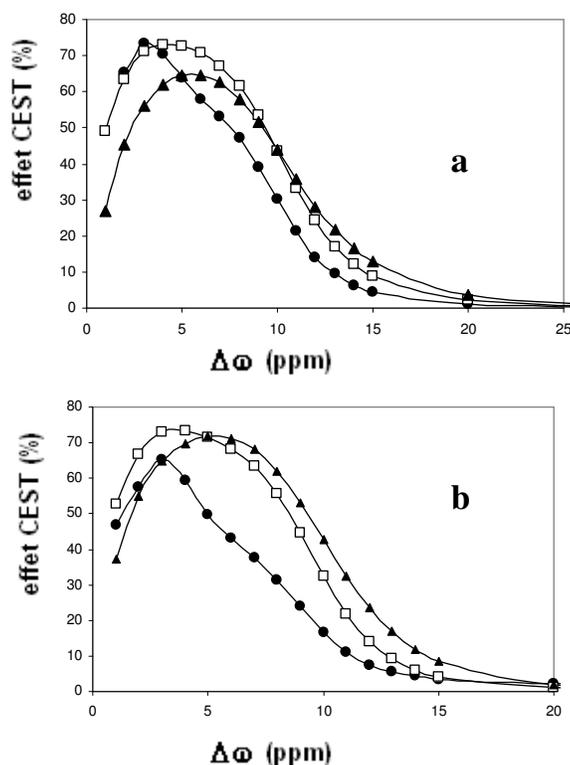


Figure 9 : Spectres CEST à 6,7 μ T d'agents LipoCEST de Tm-DOTMA de membranes (a) EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol ($d_h=197$ nm; 13,6 mM lipides, 136 mM Tm-DOTMA) ; (b) EPC/CHOL-DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol ($d_h=183,9$ nm; 11,8 mM lipides, 141 mM Tm-DOTMA) enregistrés à 8°C (●), 25°C(□) et 37°C(▲).

Nous nous sommes également intéressés à la stabilité de la réponse CEST en fonction du temps de conservation. La Figure 10 démontre l'excellente stabilité des spectres CEST quelle que soit la température de conservation sur une durée pouvant atteindre 48h, contrairement aux autres systèmes étudiés. Ce comportement n'est pas lié à la composition membranaire car sinon on le retrouverait avec les deux autres complexes de Tm(III). Il ne peut donc provenir que du complexe Tm-DOTMA lui-même.

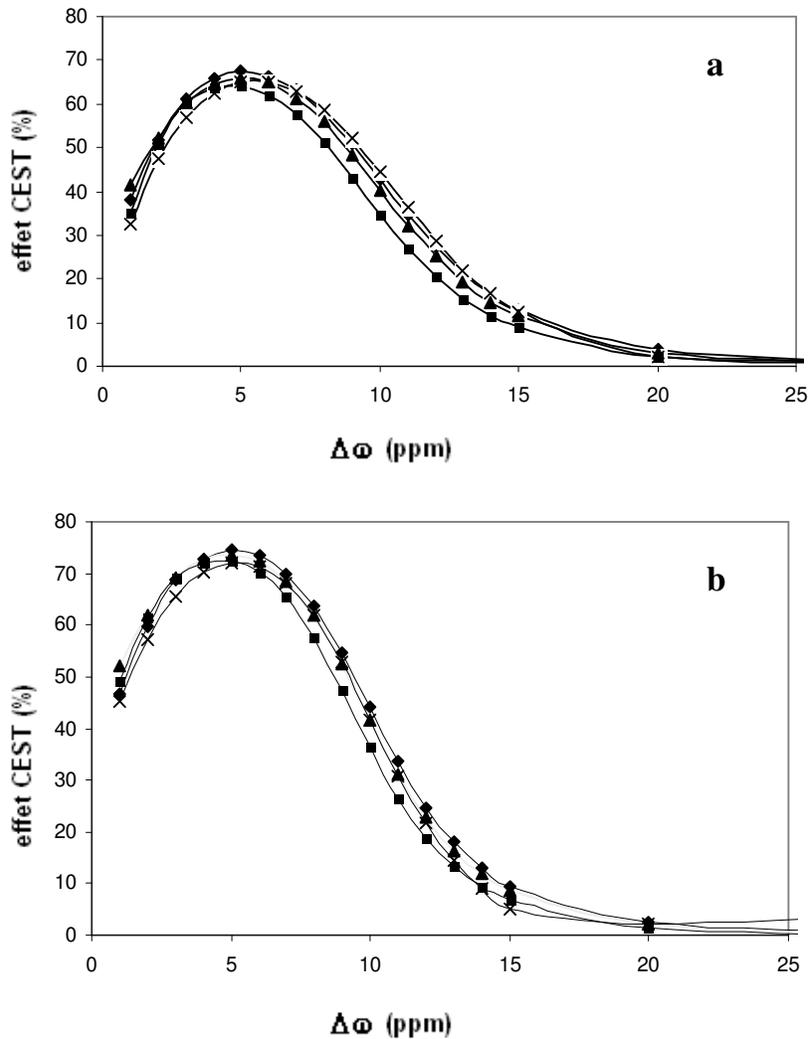


Figure 10 : Spectres CEST à 6,7 μ T d'agents LipoCEST de Tm-DOTMA de membranes (a) EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 %mol (graphique; $d_h=197$ nm; 13,6 mM lipides, 136 mM Tm-DOTMA) et (b) EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 %mol ($d_h=184$ nm; 11,8 mM lipides, 141 mM Tm-DOTMA) enregistrés juste après purification (◆), 20h après conservation à 12°C (×) ou à 37°C (▲) et 44h après conservation à 37°C (■).

Pour aller plus loin sur ce résultat, une étude des mêmes échantillons a été menée sur une période plus longue de conservation de 5 mois à 12°C. Les images IRM CEST de tubes contenant les différentes préparations d'agents LipoCEST sont montrées Figure 11. Alors que le système LipoCEST de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) montre une perte quasi-totale d'efficacité CEST (équivalente à un liposome vide), le système LipoCEST de membrane EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 %mol) quant à lui conserve une réponse CEST élevée, légèrement moins importante qu'un liposome fraîchement préparé. De plus, on peut noter que les liposomes avec cholestérol répondent bien à 5 ppm et présentent encore un

léger effet CEST à 10 ppm. Ceci est favorable à une utilisation *in vivo* puisqu'il serait vraisemblablement possible de discriminer l'effet CEST de l'agent LipoCEST de la réponse endogène attendue à 3-4 ppm.

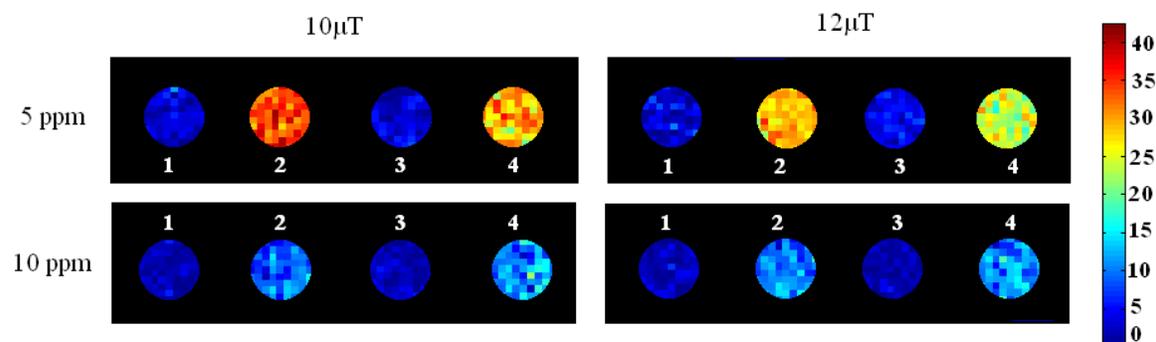


Figure 11 : Images IRM-CEST (7,05 T, 310 K) à des fréquences d'irradiation de 5 ppm et 10 ppm et à des B_1 de 10 μ T et 12 μ T de tubes fantômes contenant des liposomes non chargés de complexe (témoin 1) ou encapsulant du Tm-DOTMA (mêmes concentrations initiales que celles de la figure 9) de membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95 :5 %mol fraîchement préparés (2) et après 5 mois de conservation (3) ou de membrane EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol après 5 mois de conservation (4). Le code couleur indique l'effet CEST (%).

La stabilité des agents LipoCEST PEGylés de Tm-DOTMA, jusqu'à 44 h à 37°C et jusqu'à 5 mois pour la membrane à 25% en mole de cholestérol à 12°C, leur efficacité CEST très élevée (75% pour des membranes avec 24% et 35% de cholestérol et 60-65% sans cholestérol) à une différence de déplacement chimique de 5-6 ppm nous ont encouragés à poursuivre leur caractérisation en effectuant une expérience préliminaire d'imagerie *in-vivo*.

III-5 Image IRM-CEST après injection intra crânienne de liposomes LipoCEST de Tm-DOTMA chez le rat

Le système LipoCEST de Tm-DOTMA de membrane EPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (71:24:5 %mol) a été retenu pour une étude *in vivo*. Le choix s'est porté sur l'imagerie du cerveau, domaine d'exploration que souhaitait aborder la société Guerbet, partenaire industriel de ce travail. Les expériences ont été réalisées sur un appareil IRM 7T (Bruker, Allemagne) dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire NeuroSpin. Un rat a été anesthésié par inhalation d'un mélange air/dioxygène (50:50) additionné d'isoflurane (1-3%). La respiration du rat a été contrôlée par moniteur et sa température maintenue à 37°C en utilisant de l'air thermorégulé pulsé dans l'antenne où était placé l'animal.

Une routine Bruker nommée « mapshim » ainsi qu'une séquence dite « multislice-multiecho » (MSME) a permis d'imager le cerveau et la fréquence d'irradiation de 6 ppm a été sélectionnée à partir des spectres CEST du système LipoCEST injecté. Les paramètres d'acquisition sont détaillés dans la partie 2 (paragraphe VII-3). Pour chaque région d'intérêt, le niveau de réponse CEST ou rapport de transfert d'aimantation RTM a été calculé en % comme la différence de l'intensité du signal avec et sans présaturation de l'aimantation protons de l'eau ramenée à l'intensité du signal de référence pris sur la région controlatérale sans présaturation: $RTM(\%) = (RTM_{ON} - RTM_{OFF}) / RTM_{REF}$.

Avant l'enregistrement des images, 5µL de la préparation de liposomes LipoCEST (concentration en lipides de 12,3 mM et concentration en complexe interne à 299mM) ont été injectés par stéréotaxie (repères/bregma : +1 mm avant +5 mm profondeur/± 3 mm côté) dans le lobe gauche au niveau du striatum de l'animal sous anesthésie générale. Une injection de 5µL de liposomes blancs (non chargés de complexe) a été pratiquée symétriquement dans les mêmes conditions dans le lobe droit. (cf. détails partie Méthodologie, chapitre VII)

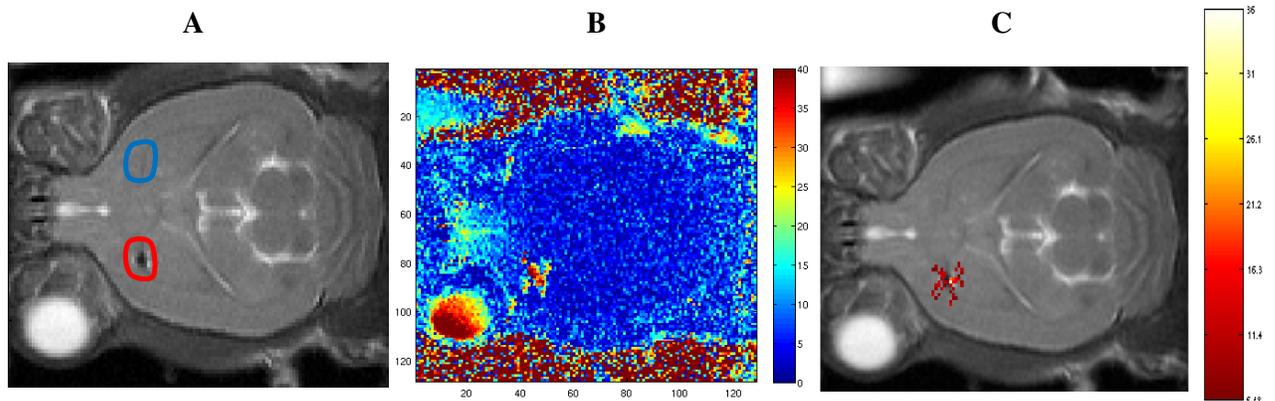


Figure 12 : Images IRM à 7,05 T d'un cerveau de rat en coupe sagittale après injection intra-crânienne de liposomes de Tm-DOTMA (5 μ L, 12,3 mM lipides, 18,4nM de liposomes). (A) Image obtenue en séquence MSME (TR= 5000 ms; 12 échos espacés de 8 ms avec premier $TE_1 = 8$ ms; résolution spatiale = $150 \times 150 \times 660$ mm³, temps acquisition = 6 min; nombre de coupes = 10); les zones d'injection des liposomes blancs et des liposomes de Tm-DOTMA sont entourées respectivement en bleu et rouge. (B) Image CEST obtenue par soustraction des images en séquence MSME avec et sans impulsion radiofréquence ($B_1 = 12$ μ T); l'échelle de couleur correspond au rendement de transfert de saturation RTM (%). (C) Superposition de l'image A et du signal CEST après seuillage à 6,4 % (échelle de lecture de l'intensité CEST à droite).

La Figure 12 montre les images IRM obtenues. On note clairement un signal CEST au niveau de la zone d'injection des liposomes de Tm-DOTMA montrant l'applicabilité de ce système dans des conditions *in vivo*. La concentration injectée de liposomes peut être estimée à partir de la concentration totale en lipides, sachant que le diamètre moyen des vésicules est 198 nm. Un contraste CEST compris entre 10 et 20 % est donc obtenu avec une concentration de **18,4 nM** de liposomes (soit 2 picomoles de liposomes pour 5 μ L injecté) montrant que ce système est très sensible comparé aux agents ParaCEST classiques qui requièrent des concentrations de l'ordre du mM pour atteindre un contraste similaire [Woods et al 2006; Aime et al 2006].

III-6 Systèmes LipoCEST de Tm-DOTMA : Discussion

A la lumière des résultats décrits précédemment, nous pouvons nous interroger tout d'abord sur la stabilité de la réponse CEST des liposomes LipoCEST de Tm-DOTMA au cours du temps en comparaison des deux autres systèmes respectivement basés sur l'encapsulation de Tm-DOTA et de Tm-DO3A.

Ce comportement particulier peut être rapproché des propriétés de solubilité aqueuse du complexe Tm-DOTMA porteur de groupes méthyle hydrophobes. Nous avons remarqué en effet qu'il était difficile de le solubiliser le complexe dans l'eau aux concentrations utilisées pour hydrater les liposomes : alors que le Tm-DO3A et le Tm-DOTA se solubilisent instantanément, le Tm-DOTMA nécessite près de 12h pour que la solution aqueuse ne soit plus trouble. Pour caractériser l'état moléculaire de ce dernier lors de sa mise en solution, nous avons réalisés des spectres d'absorption UV-visible de solutions de complexes Tm-DOTMA à différentes concentrations équivalentes à des osmolarités croissantes comprises entre 9 et 300 mOsm (4 à 140mM) (Figure 13). On peut constater aisément que chaque spectre présente une série de bandes d'absorption réparties dans l'intervalle 250-800 nm adossées à une ligne de base non horizontale et dont l'allure est caractéristique d'un signal de turbidité, c'est-à-dire suivant une loi de puissance décroissante. Ce signal est très certainement lié à l'existence d'agrégats moléculaires dont la quantité et/ou la dimension augmentent avec la concentration en complexe. Ceci témoignerait donc du fait que les solutions aqueuses de Tm-DOTMA sont non idéales et que le complexe s'agrège partiellement en milieu aqueux. Ceci rejoint un résultat décrit dans la littérature concernant les complexes de lanthanide formés avec le ligand méthylé DO3MA, dérivé du DO3A, pour lesquels il a été mis en évidence, en milieu aqueux, une organisation en agrégats de type dimères [Hermann et al, 2008]. Par ailleurs, les mesures d'osmolarité (partie 2, chapitre II) indiquent qu'une osmolarité de 300 mOsm est atteinte à 140 mM de complexe, ce dernier possédant une charge négative, cela implique qu'il est partiellement dissocié dans la solution. Ainsi, dans le cas des liposomes de Tm-DOTMA, le passage transmembranaire sous effet de gradient de potentiel chimique du complexe serait fortement limité par l'existence d'agrégats dont la dimension ralentirait leur diffusion au travers de la bicouche lipidique, ce qui expliquerait la stabilité du taux d'encapsulation dans les liposomes et par conséquent la stabilité de la réponse CEST.

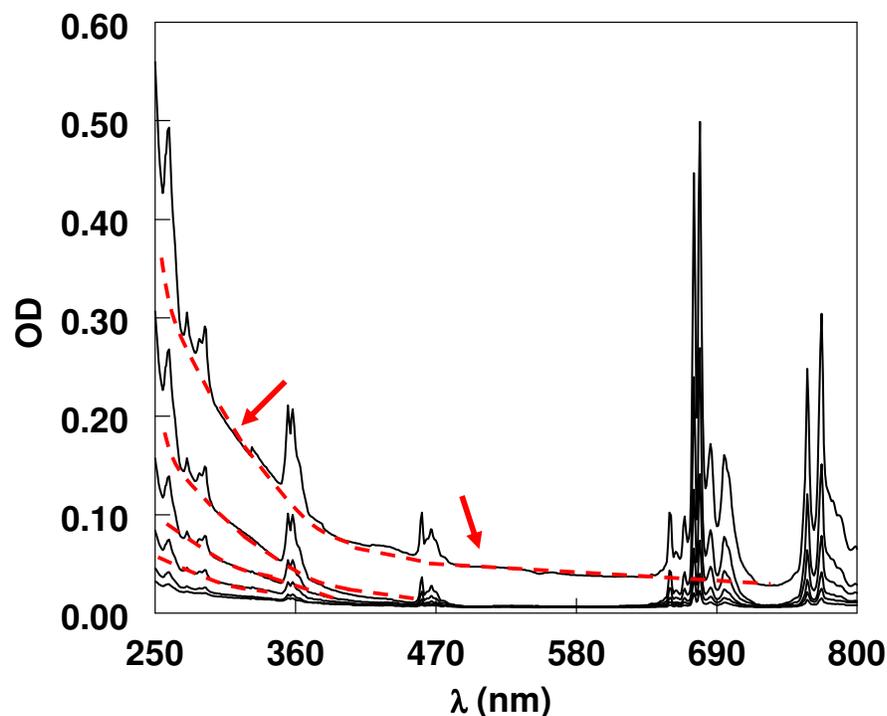


Figure 13 : Spectres d'absorption UV-visible de solutions de complexe Tm-DOTMA d'osmolarités croissantes comprises entre 9 mOsm et 300 mOsm. Les lignes en trait pointillé rouge (voir flèches) visualisent la réponse liée à la turbidité des échantillons (fit des points en dehors des bandes d'absorption par une loi polynômiale d'ordre 4, coefficient de corrélation = 0.9999).

Intrinsèquement, la stabilité de réponse CEST du système LipoCEST est un paramètre essentiel si l'on considère qu'un examen clinique par IRM-CEST peut nécessiter plusieurs heures. De ce point de vue, le complexe Tm-DOTMA est intéressant mais présente un effet de déplacement chimique nettement moins prononcé que le complexe Tm-DO3A. Nous avons vu que l'introduction de cholestérol dans la membrane des liposomes contribuait à ralentir le phénomène de fuite sous gradient d'espèce tout en optimisant l'effet CEST. Une approche alternative pourrait être d'utiliser l'analogue méthylé Tm-DO3MA à tendance agrégative, pour à la fois stabiliser la réponse CEST et conserver une forte différence de fréquence de résonance des protons échangeables. Néanmoins, la littérature rapporte que le complexe Gd-DO3MA présente les deux conformations SA et TSA, la première conformation permettant l'échange avec 2 molécules d'eau tandis que la seconde avec une seule [Hermann et al, 2008].

Les conformations étant dépendante du lanthanide inséré, une étude expérimentale mériterait d'être menée avec le Tm(III) pour vérifier que la propriété ($q=2$) est bien conservée et ainsi préserve l'effet de shift et l'efficacité CEST obtenus avec le Tm-DO3A.

Le Tableau 4 permet de comparer les résultats que nous avons obtenus sur les systèmes LipoCEST de Tm-DOTMA avec ceux étudiés par [Aime et al. 2005].

Tableau 4 : Différence de fréquence des protons de l'eau intra-liposome $\Delta\omega$ et effet CEST (ST%) obtenus à 37°C pour les agents LipoCEST de Tm-DOTMA étudiés dans la thèse et par [Aime et al. 2005], dans des conditions iso-osmotiques.

membrane	d_h (nm)	Efficacité CEST (%) ($[Lip]_{tot}$)	[Tm-DOTMA] Intra-liposome (mM)	B_1 (μT)	$\Delta\omega$ (ppm)
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 %mol	197±10	54 (12,1 liposomes)	136	6,7	6
EPC/CHOL/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 71:24:5 %mol	184±9	75 (17,7nM liposomes)	141	6,7	6
POPC/DPPG/CHOL 40:3,5:46,5 %mol	270± 2,5	55 (2,5 nM liposomes)	190	12	3.2

Après avoir évalué les concentrations en liposomes (2,5nM correspondant à un optimum d'effet CEST [Aime et al. 2005]) et hormis les différences en B_1 , les différentes efficacités CEST mesurées semblent provenir de la différence de composition membranaire. En effet, le chapitre II a démontré que la perméabilité de la membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ est différente de celle de la membrane POPC/DPPG/CHOL (cf chapitre II). Cependant, la différence de shift ne semble pas perturbée par la composition membranaire, mais bien plus par le diamètre du liposome (3,2 ppm pour 270 nm contre 6 ppm pour 184 ou 197 nm, d'autant plus que la concentration interne plus élevée pour les liposomes de 270 nm devrait au contraire favoriser une augmentation de $\Delta\omega$).

III-7 Rôle des chaînes de poly(éthylène glycol) sur la réponse CEST

La Figure 14 montre les spectres CEST de liposomes EPC (100 %mol) et EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) encapsulant le complexe Tm-DO3A (308mM), réalisés sur l'imager 7,05 T du laboratoire NeuroSpin. L'effet CEST a été calculé en prenant le rapport de la différence des intensités du signal avec et sans application d'une impulsion de présaturation B_1 à l'intensité d'un signal de référence constant (formalisme différent de celui appliqué pour tous les autres spectres CEST présentés). Les concentrations en lipides étaient respectivement de 11,2mM et 9,3 mM. .

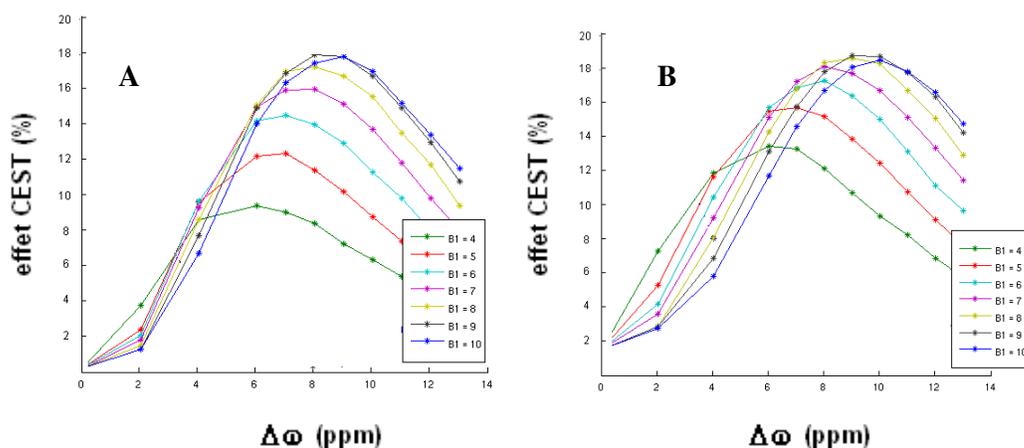


Figure 14: Spectres CEST à 7,05 T et 37°C de liposomes LipoCEST de Tm-DO3A (concentration interne 308mM) de membranes EPC 100 %mol (A, $d_h = 231\text{nm}$) ou EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) (B, $d_h = 191\text{nm}$) à différentes valeurs d'impulsions radiofréquence B_1 comprises entre 4 μT et 10 μT (code couleur dans l'encadré en bas à droite de chaque figure).

On note sur ces enregistrements que l'effet CEST est plus élevé dans le cas des liposomes PEGylés, en particulier aux faibles valeurs de B_1 . Notamment à une différence de fréquence $\Delta\omega$ de 2 ppm l'effet CEST est presque double.

Cette différence de résultat peut provenir tout au moins en partie de la différence de distribution de taille entre les deux systèmes LipoCEST accompagnée d'un écart de diamètre hydrodynamique moyen, les liposomes EPC 100 %mol étant plus grands (231nm contre 191nm pour les liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀). On peut également évoquer la différence de perméabilité entre les deux préparations qui viendrait accentuer les écarts liés à la taille des vésicules.

A ce stade de nos observations, la question d'un rôle éventuel du lipide PEGylé s'est posée puisque la présence ou non de chaîne de poly(éthylène glycol) en surface des bicouches lipidiques était aussi un paramètre distinguant les deux systèmes LipoCEST.

La Figure 15 présente le spectre CEST réalisé à 6,7 μ T de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) à 19,9mM en lipides, soit 0,99 mM de lipide PEGylé, exempts de complexe paramagnétique et de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ seul à concentration équivalente de 1 mM et cinquante fois plus concentrées (50mM).

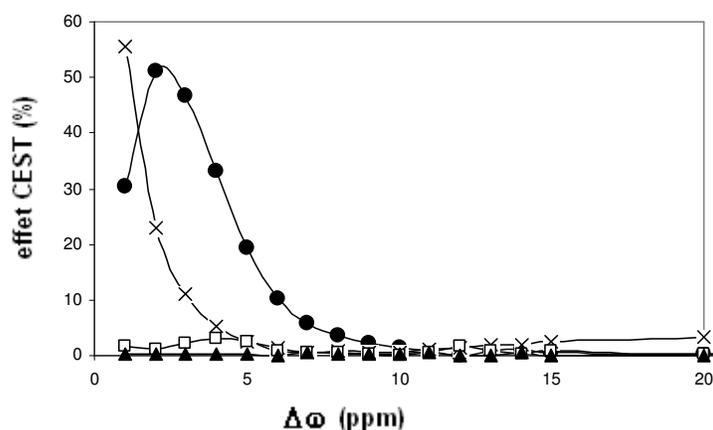


Figure 15 : Spectres CEST à 6,7 μ T et 37°C de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % mol, $d_h = 203$ nm) et 19,9mM lipides totaux (0,99 mM DSPE-PEG₂₀₀₀) ne contenant pas de complexe paramagnétique (▲), de micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ à 1mM (□) et 50mM (●). Le spectre CEST des micelles de concentration 50 mM enregistré à 2 μ T et 37°C est également reporté (×).

On constate que, dans nos conditions d'acquisition des spectres CEST, les liposomes PEGylés « blancs » n'ont pas d'effet CEST. Par contre, les micelles de DSPE-PEG₂₀₀₀ présentent une réponse CEST très faible à 1 mM (de l'ordre de 3-4 %) mais atteignant plus de 50 % d'efficacité à 50 mM. Ainsi, ce lipide possède un comportement DiaCEST. Sa structure (Figure 16) met en évidence un seul proton susceptible de s'échanger avec le milieu aqueux, celui du groupe amide servant d'ancre de greffage du polymère. Dans ce cas, le modèle théorique prédictif de l'effet CEST escompté est de 4% (Effet CEST %) pour 1 mM d'agent DiaCEST échangeant 1 seul atome d'hydrogène [Delli Castelli et al 2008b]. Expérimentalement, les petites molécules DiaCEST possédant un groupe NH montrent des effets CEST souvent compris entre 20% et 35% à une concentration de quelques dizaines de mM.

Ces données semblent en accord avec notre résultat, toutefois, l'effet CEST de 50% obtenu à une concentration de 50 mM et la variation de $\Delta\omega$ avec la concentration de DSPE-PEG₂₀₀₀ (de

4 ppm à 2,5 ppm) suggère une autre source de réponse CEST qui viendrait s'ajouter à celle du proton amide de la molécule. Cette autre réponse pourrait être attribuée aux molécules d'eau d'hydratation des chaînes de polymère, au nombre voisin de 200 molécules par chaîne de masse 2000g/mole greffée sur la même ancre lipidique [Tirosch et al. 1998]. Cette eau de constitution de la couronne de PEG, liée par interactions faibles de type liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène des fonctions éther-oxyde [Branca et al 2002], présente un environnement différent de celui de l'eau libre justifiant l'effet de shift et pourrait s'échanger avec le milieu aqueux environnant à une vitesse compatible avec l'échelle de la RMN comme cela a déjà été mentionné pour d'autres macromolécules hydrophiles [Goffeney et al. 2001 ; Snoussi et al. 2003]. Le déplacement du spectre CEST à très faible $\Delta\omega$ lorsque l'on diminue la valeur de B_1 (Figure 15), semble indiquer l'existence de plusieurs réponses CEST dont la cinétique d'échange chimique associée est différente.

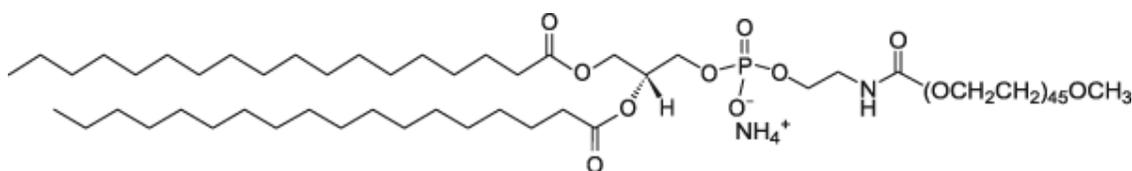


Figure 16 : structure chimique du DSPE-PEG₂₀₀₀

L'absence de réponse CEST dans le cas des liposomes blancs peut provenir d'une modification de conformation des chaînes de PEG à la surface des vésicules par comparaison aux micelles, modifiant le processus d'échange des protons NH et/ou des protons des molécules d'eau d'hydratation avec le continuum aqueux. L'exploration d'autres conditions de pré-saturation lors de l'acquisition de spectres CEST sur des liposomes blancs PEGylés serait informative à ce sujet.

Par ailleurs, en présence de complexe paramagnétique, il n'est pas totalement exclu que les propriétés d'aimantation des protons liés au(x) site(s) échangeable(s) DiaCEST du poly(éthylène glycol) puissent être influencées par le centre paramagnétique, modifiant, entre autres paramètres, la différence de fréquence de ces protons et apportent une contribution non nulle à l'effet CEST du système LipoCEST PEGylé [Aime et al. 2003]. Cette situation correspondrait à un système CEST à trois « pools » de protons, ceux de l'eau libre, de l'eau liée au centre paramagnétique et les protons liés au PEG, conduisant à une modulation de l'effet CEST selon les cinétiques de transfert d'aimantation entre les trois pools [Woessner et al 2005].

III-8 Comparaison des trois systèmes LipoCEST à membrane équivalente

La Figure 17 résume les résultats concernant la réponse CEST des trois systèmes étudiés au cours de la thèse pour des conditions RMN équivalentes (7,05 T, $B_1 = 6,7 \mu\text{T}$, 37°C), à concentration interne en complexe équivalente à 300 mOsm (systèmes préparés en régime iso-osmotique) et à membranes de liposomes semblables. Les concentrations choisies pour cette représentation sont comprises entre 6 mM et 13,6 mM en lipides, soit dans le domaine de concentration correspondant à un effet CEST constant et maximal dans le cas des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ de DO3A (Figure 18).

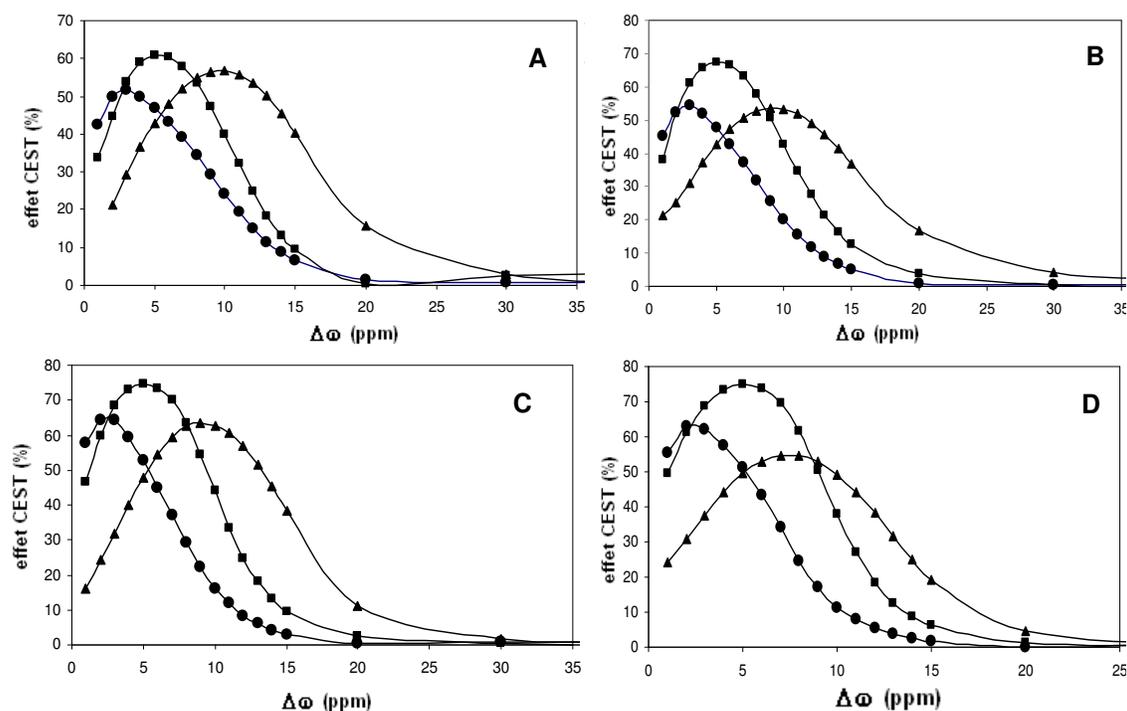


Figure 17 : Spectres CEST à $6,7\mu\text{T}$ et 37°C des systèmes LipoCEST de Tm-DOTA (●), Tm-DOTMA (■) et Tm-DO3A (▲) et de membranes EPC 100 % mol (A), EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 % mol (B), EPC/CHOL/DSPE PEG₂₀₀₀ 71:24:5 % mol (C) et EPC/CHOL/DSPE PEG₂₀₀₀ 60:35:5 % mol (D). Le tableau suivant indique les diamètres hydrodynamiques moyens de chacune des préparations ainsi que la concentration en lipides.

Membrane	Tm-DOTA	Tm-DOTMA	Tm-DO3A
EPC 100 % mol	227±11 nm 11,5 mM	253±13 nm 8,7 mM	250±53 nm 11,6 mM
EPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 95:5 % mol	197±10 nm 8,1 mM	197±10 nm 13,6 mM	192± 9 nm 12,0 mM
EPC/CHOL/DSPE PEG ₂₀₀₀ 71:24:5 % mol	173±9 nm 10,7 mM	184±9 nm 11,8 mM	233±12 nm 10,5 mM
EPC/CHOL/DSPE PEG ₂₀₀₀ 60:35:5 % mol	191±8nm 8,4mM	197±10 nm 6,0 mM	211±11 nm 10,2 mM

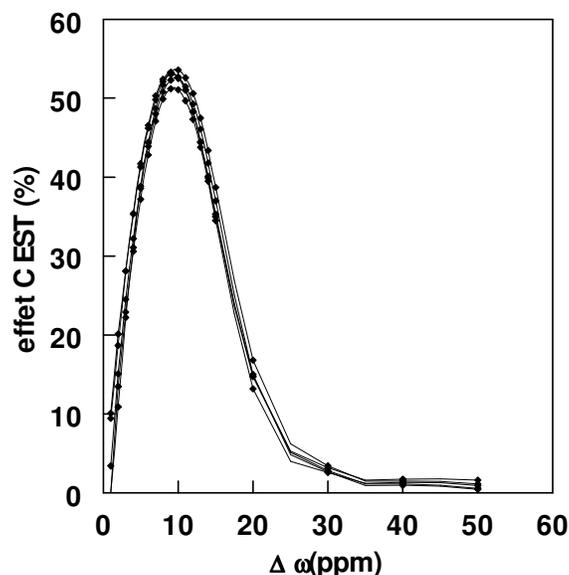


Figure 18 : Spectres CEST de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % mol) enregistrés à 7,05 T et 6,7 μ T en fonction de la concentration en liposomes comprises entre 0,75 et 12 mM (#2-18nM de liposomes) et une concentration interne en complexe de 298 mM (300 mOsm).

Quelle que soit la composition membranaire, les trois systèmes présentent une réponse CEST élevée, les liposomes à base de Tm-DOTMA semblant présenter systématiquement une meilleure efficacité à leur valeur $\Delta\omega$ optimale. Par contre l'intégration de la réponse CEST sur la gamme de fréquences accessibles 3-15 ppm est plus importante pour les liposomes de DO3A.

Compte tenu du fait que les préparations de liposomes puissent être composées de sous-populations de diamètres et de proportions variables, l'effet de déplacement chimique est clairement différent et croissant dans l'ordre Tm-DOTA < Tm-DOTMA < DO3A. Ce comportement peut être expliqué par la quantité de centre paramagnétique encapsulé qui est différent selon le ligand pour atteindre une osmolarité de 300 mOsm. La Figure 19 illustre cet aspect en comparant des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 %mol) encapsulant respectivement 136 mM de Tm-DOTMA et 135 mM de Tm-DO3A. La différence de déplacement chimique des protons échangeables est très voisine pour les deux systèmes et égale à 5 ppm. On peut également constater une diminution de l'effet CEST dans le cas des liposomes de Tm-DO3A qui pourrait être liée partiellement à la valeur de B_1 de 6,7 μ T moins optimisée par rapport au diamètre des liposomes et à leur concentration que pour les liposomes de Tm-DOTMA. Néanmoins, nos résultats démontrent que l'utilisation de systèmes LipoCEST à base de Tm-DO3A apporte un gain d'efficacité non négligeable car le complexe neutre permet de doubler sa concentration tout en respectant des conditions physiologiquement compatibles (300 mOsm) et d'atteindre ainsi une valeur de $\Delta\omega_{\max}$ de 11

ppm ainsi qu'une réponse CEST encore importante à 15 ppm. Il semble, à ce stade de l'étude que la nature du ligand n'influence pas l'effet de déplacement chimique obtenu (Figure 20).

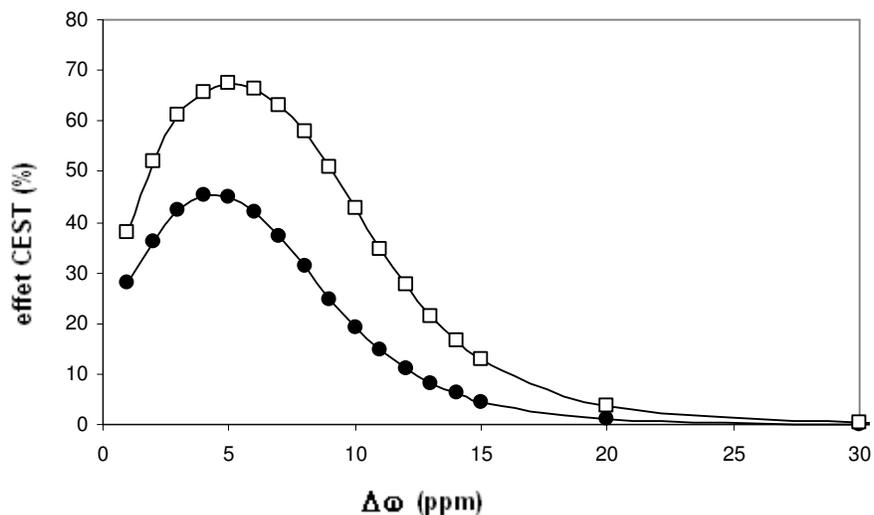


Figure 19 : Spectres CEST de liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (95:5 % mol) enregistrés à 7,05 T et 6,7 μ T et encapsulant 136 mM de Tm-DOTMA (□ ; 13,6 mM lipides, $d_h = 197$ nm) ou 135 mM de Tm-DO3A (● ; 12,5 mM lipides, $d_h = 184$ nm).

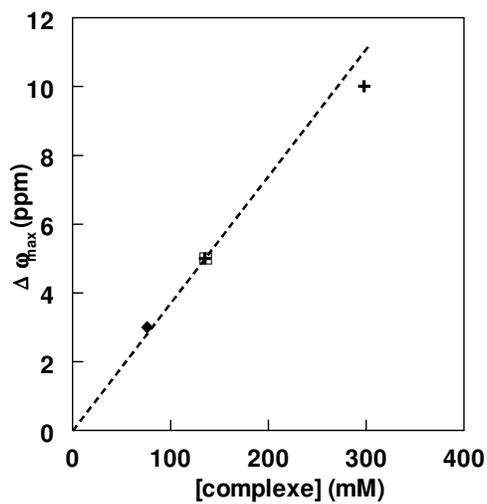


Figure 20 : Déplacement chimique induit (référence à 0 ppm : eau libre) par les liposomes LipoCEST, exprimé en fonction de la concentration interne de complexe paramagnétique encapsulé : Tm-DOTA (◆), Tm-DOTMA (□) et Tm-DO3A (+). Conditions RMN-CEST : 7,05 T, 6,7 μ T.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de la thèse était de concevoir, synthétiser et caractériser de nouveaux agents de contraste nanoparticulaires ultrasensibles pour une imagerie moléculaire par résonance magnétique à haut champ et administrables par voie intraveineuse. Ces systèmes ont été élaborés à partir de lipides organisés en vésicules et de complexes paramagnétiques de thulium afin de produire un contraste des images IRM par transfert de saturation de l'aimantation par échange chimique, d'où leur désignation d'agents LipoCEST.

Le concept LipoCEST sur lequel nous avons appuyé notre démarche était réellement novateur puisqu'il n'avait été proposé dans la littérature que deux ans avant le début de nos travaux et qu'une partie des articles cités en référence dans ce manuscrit sont parus pendant le déroulement de la thèse. L'idée directrice était d'encapsuler un complexe de lanthanide induisant un fort déplacement de la fréquence de résonance des noyaux d'hydrogène, ou protons, de l'eau contenue dans le volume interne de liposomes submicroniques, cette eau étant le siège d'un échange avec le continuum aqueux externe par diffusion passive au travers des bicouches lipidiques formant liposomes. La faisabilité de tels agents LipoCEST avait été montrée par le groupe de Silvio Aime (Centre d'Imagerie Moléculaire, laboratoire de RMN, Université de Turin) sur un seul système, publié en 2005, constitué de vésicules dont la membrane lipidique était composée de deux phospholipides, POPC et DPPG, et de cholestérol, vésicules contenant une solution du complexe [Tm(III)-DOTMA, H₂O]. Une telle membrane ne pouvant conférer une stabilité suffisante dans le compartiment sanguin, nous avons envisagé de travailler sur ce concept mais à partir de liposomes stabilisés stériquement par des chaînes de polymère hydrophile en incorporant 5 % en mole de DSPE-PEG₂₀₀₀ dans un mélange lipidique simple à base d'EPC, supplémenté ou non de cholestérol, formule parfaitement validée pour des liposomes transporteurs de principes actifs ayant une longue demi-vie plasmatique, comme par exemple le Doxil® ou le Caelix® commercialisés par Janssen. Concernant le complexe de lanthanide, nous avons conservé le centre Tm(III) reconnu pour son excellente efficacité en tant qu'agent de déplacement chimique. Nous avons repris le ligand DOTMA mais nous avons également essayé deux autres cages : les ligands DOTA et DO3A. Si le complexe Tm(III)-DOTA a été étudié par d'autres auteurs parallèlement à nos travaux, l'étude relative au complexe Tm(III)-DO3A est encore unique à ce jour.

La première étape de la thèse a consisté à construire les agents de contraste LipoCEST que nous voulions étudier. Les trois complexes de thulium précités ont été tout d'abord synthétisés et caractérisés individuellement du point de vue de leurs propriétés d'hydratation et leurs comportements magnétique et osmotique. Leur encapsulation au sein de liposomes de

diamètre moyen voisin de 200 nm et de distribution en taille monomodale a fait ensuite l'objet d'une mise au point soignée pour assurer le contrôle des concentrations intra-liposomes de ces complexes et produire des systèmes exempts de matériel non encapsulé en respectant l'équilibre osmotique entre le compartiment interne des vésicules et le milieu externe. Pour ce faire, un quatrième complexe, cette fois avec un centre europium, le complexe Eu(III)-DOTA a été spécialement synthétisé pour ses propriétés de fluorescence. Il a permis de caractériser au mieux l'objet LipoCEST issu de sa purification sur colonne d'exclusion stérique. En effet, l'étape de purification est cruciale puisque les deux groupes d'eau nécessaires à l'émergence d'un effet CEST doivent être distincts du point de vue de la RMN: le premier groupe est en contact avec le complexe paramagnétique (eau à l'intérieur du liposome) et le second ne doit présenter aucune interaction avec le complexe (l'eau à l'extérieur du complexe). La double détection en sortie de colonne d'exclusion de l'émission de fluorescence du complexe et du diamètre hydrodynamique des particules par DQEL a permis de déterminer les conditions optimales de séparation entre les liposomes et la fraction de complexe non encapsulé. La procédure de dosage des phospholipides et du lanthanide avant et après passage sur colonne d'exclusion stérique a également conduit à une détermination fiable du rendement d'encapsulation du complexe qui s'est révélée en bon accord avec la prédiction théorique de la valeur de la fraction volumique piégée par les vésicules lors de leur formation.

L'un des paramètres clés dans le fonctionnement d'un agent LipoCEST qui dépend de composition lipidique de la structure vésiculaire est la perméabilité à l'eau de la membrane du liposome qui va en effet gouverner la cinétique d'échange des protons et donc l'efficacité du transfert de saturation d'aimantation. Pour appréhender le rôle de ce paramètre, nous avons repris une méthodologie décrite dans la littérature, reposant sur des mesures de relaxivité en présence d'un composé paramagnétique, le Prohance®, mais à laquelle nous avons apporté quelques modifications, notamment en introduisant dans le traitement des données la fraction volumique intra-liposome mesurée par dosage couplé à la séparation par chromatographie d'exclusion stérique et non sa valeur calculée. A quelques exceptions près, liées à la forte perméabilité membranaire des objets, nous avons pu déterminer le temps de résidence de l'eau dans le compartiment intra-liposome pour les compositions de bicouches des futurs systèmes LipoCEST. Nous avons ainsi mis en évidence l'influence du lipide PEGylé DSPE-PEG₂₀₀₀ et celle du cholestérol sur une membrane EPC, le cholestérol contribuant nettement à l'imperméabilisation de celle-ci, les écarts obtenus étant accentués par le diamètre des vésicules dans l'expression du coefficient de perméabilité. Il était intéressant de remarquer à ce stade de l'étude que les membranes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ présentaient une perméabilité

membranaire à l'eau moins grande que la membrane EPC, ce que nous avons attribué à la barrière d'hydratation des chaînes du polymère. Ces résultats dans leur ensemble ne compromettaient pas le principe LipoCEST d'autant plus que les coefficients de perméabilité trouvés étaient du même ordre de grandeur que celui de la membrane POPC/DPPG/Cholestérol déjà exploitée par Silvio Aime. Nous avons donc orienté nos études en réponse CEST principalement sur des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ et examiné le rôle éventuel de l'incorporation de cholestérol dans la bicouche lipidique.

Pour continuer d'affiner notre approche, nous nous sommes intéressés aux complexes paramagnétiques de thulium pour définir leur efficacité en tant qu'agent de déplacement chimique et également leur aptitude à échanger rapidement des molécules d'eau au niveau de leurs sites de coordination. Nous avons montré par RMN de l'oxygène-17 que les trois ligands DOTA, DOTMA et DO3A permettent un échange de molécules d'eau avec un temps de résidence sur le centre lanthanide très court et bien inférieur au temps de diffusion de l'eau à travers la membrane des liposomes. Ce point explique en grande partie l'efficacité CEST des liposomes que nous avons étudiés. Les mesures de RMN du ¹H selon la technique du double tube ont mis en évidence un effet important de décalage de la fréquence de résonance des protons de l'eau rendant possible la sélectivité de la saturation de l'aimantation de l'eau intra-liposome. Par ailleurs, comme le décalage de déplacement chimique induit par le composé paramagnétique dépend de sa concentration et que cette dernière est limitée par les conditions isotoniques à respecter pour de futurs agents LipoCEST injectables, nous avons sélectionné le complexe neutre Tm(III)-DO3A qui permettait de doubler le nombre de centres paramagnétiques comparativement aux deux autres complexes porteurs d'une charge négative. De plus, ce complexe présentait la particularité de lier deux molécules d'eau de coordination, ce qui n'avait jamais été envisagé dans le cadre des systèmes LipoCEST.

La première étude de réponse CEST sous un champ magnétique de 7,05 T a été menée sur le système non décrit dans la littérature: les liposomes LipoCEST EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ chargés de Tm(III)-DO3A à une concentration de 298 mM, soit iso-osmotique avec le plasma sanguin (300 mOsm). La majorité de nos résultats ont pu faire l'objet d'un article que nous comptons soumettre prochainement. Ces liposomes présentent une excellente efficacité avec un maximum d'effet CEST voisin de 60% lorsque l'impulsion de saturation est de 10 μT. L'effet reste élevé à 6,7 μT (50 %), conditions tout à fait compatibles pour des applications *in vivo*. La sensibilité de la réponse est également importante et figure parmi les meilleurs résultats relevés pour des agents LipoCEST, avec un effet CEST maintenu à son maximum pour une concentration de liposomes de 2 nM. De manière très intéressante, le signal de

résonance des protons de l'eau intra-liposome atteint 11 ppm, ce qui est de loin supérieure aux résultats reportés pour d'autres systèmes LipoCEST limités à 4 ppm. Ce comportement est particulièrement intéressant car un décalage de 11 ppm permet de distinguer le signal CEST apporté par l'agent de contraste du signal CEST de protons endogènes, souvent voisin de 3 ppm.

La cartographie des spectres CEST réalisée par le balayage en fréquence de résonance à différentes impulsions de saturation a par ailleurs mis en évidence l'existence probable de sous-populations LipoCEST ayant chacune un comportement distinct. Ainsi, un système LipoCEST serait en fait un mélange d'agents de contraste différant par le nombre de protons échangeables, par la fréquence du signal de résonance de ces protons et par la cinétique de l'échange chimique auquel il participe. Ceci peut être expliqué raisonnablement par la largeur de distribution en taille des liposomes sans exclure totalement une variabilité du taux d'encapsulation du complexe d'un liposome à l'autre. Quoiqu'il en soit, nos observations posent le problème de l'équivalence des molécules d'eau intra-liposome vis-à-vis d'une réponse CEST, ceci au sein du même compartiment aqueux ou d'un compartiment à l'autre. L'introduction de cholestérol dans la membrane des liposomes apporte une stabilité physique aux objets tout en préservant leur efficacité de contraste. En complément de cette première étude, nous avons examiné certains facteurs tels que l'influence de la concentration interne en régime iso-osmotique ou de conditions hyper-osmotique entraînant une déformation des vésicules. Comme attendu, ces facteurs modifient la réponse CEST en accord avec certaines études reportées dans la littérature. Les images IRM-CEST effectuées à 7,05 T sur des tubes fantômes contenant les préparations de liposomes LipoCEST ont confirmé leur efficacité en tant qu'agent de contraste. Nous avons pour finir tenté une expérience *in vivo* et réalisé des images IRM-CEST de l'abdomen d'un rat après administration intraveineuse des liposomes. Bien que l'expérience ne soit que très préliminaire, les résultats ne mettent pas en évidence de contraste CEST mais l'analyse des temps de relaxation suggère une prise en charge au niveau du foie et une élimination rénale.

De manière à établir une comparaison avec les deux autres systèmes envisagés, nous avons réalisé une série d'études portant sur la caractérisation de liposomes de Tm(III)-DOTA et de Tm(III)-DOTMA, encapsulés à des concentrations respectant une osmolarité de 300 mOsm. De fait le nombre de centres paramagnétiques était inférieur à celui atteint avec le complexe Tm(III)-DO3A. Comme attendu, le décalage de déplacement chimique des protons de l'eau intra-liposome a été trouvé systématiquement plus faible, avec toutefois une valeur acceptable pour les liposomes de Tm(III)-DOTMA qui induisent une différence en fréquence

de 6 ppm. De manière intéressante, ces liposomes présentent une excellente réponse CEST et sont physiquement stables même lorsque leur membrane ne contient pas de cholestérol. Nous expliquons ce phénomène par le comportement du complexe dans l'eau. Ce dernier forme en effet une solution aqueuse non idéale avec une tendance à former des agrégats, certainement en raison de la présence de groupes méthyle dans la structure du ligand. Ainsi la fuite passive des molécules de Tm(III)-DOTMA pour équilibrer leur potentiel chimique de part et d'autre de la membrane des liposomes est ralentie comparativement aux deux autres complexes étudiés, beaucoup plus solubles. Cette stabilité a permis d'envisager une expérience préliminaire *in vivo* chez le rat qui a montré que les liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ de Tm(III)-DOTMA produisent un contraste CEST après avoir été injectés au niveau du striatum.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des systèmes, nous avons examiné plusieurs aspects tels que l'influence de la concentration interne en complexe, la présence de composé paramagnétique dans le milieu extérieur aux liposomes pour mimer un état de fuite de matériel et la température. Ces différentes expériences sont informatives quant au mécanisme de réponse CEST et les résultats sont pour la plupart conformes aux prédictions théoriques. Indirectement, nous avons montré qu'il était parfaitement possible de manipuler les agents LipoCEST lorsque la méthodologie de leur fabrication est bien contrôlée. Le dernier point qui mériterait d'être approfondi est la participation éventuelle au signal CEST du DSPE-PEG₂₀₀₀ et de sa chaîne de polymère dont nous avons mis en évidence le comportement DiaCEST.

D'un point de vue physico-chimique, l'ensemble de la thèse permet d'énoncer une sorte de cahier des charges de l'agent de contraste LipoCEST performant, répondant à une future utilisation systémique et ne présentant pas de contrainte osmotique. En effet, sur ce dernier point, certes un régime hyper-osmotique entraîne une déformation des liposomes et donc améliore l'effet de déplacement chimique des protons intra-liposome par effet de susceptibilité magnétique mais nous avons montré que l'efficacité CEST était diminuée du fait de la perte d'eau interne. Une solution pourrait consister à mettre au point des liposomes non sphériques mais de géométrie stable en régime iso-osmotique et de volume interne satisfaisant, en adaptant par exemple la composition lipidique pour obtenir une courbure hétérogène de la bicouche. En partant de liposomes sphériques, il est clair à présent qu'il est préférable d'utiliser un complexe neutre, le ligand DO3A étant un bon candidat. Cependant, l'encapsulation du complexe Tm(III)-DO3A dans des liposomes EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀, performants d'un point de vue réponse CEST, pose le problème de la fuite de matériel au cours du temps. Ceci peut être corrigé en introduisant 25 % en mole de cholestérol dans la

membrane des liposomes PEGylés. Une autre solution pourrait être de modifier le ligand en lui greffant des groupes méthyle pour rejoindre le comportement du DOTMA et ainsi ralentir le processus de fuite. Ce nouveau ligand mériterait d'être étudié. Le dernier paramètre concerne le centre lanthanide. Notre choix s'est orienté sur le thulium qui s'est montré selon nos attentes un bon candidat. D'après certaines études de Silvio Aime, il semble que le dysprosium induise également un décalage significatif de la fréquence du signal des protons de l'eau. Il serait donc intéressant d'examiner les propriétés de liposomes encapsulant par exemple du Dy(III)-DO3A ou du Dy(III)-DOTMA. Etant donné que le dysprosium entraîne un décalage opposé à celui observé avec le thulium, il pourrait même être envisagé de tester un mélange de deux complexes à centre Tm(III) ou Dy(III) soit conjointement encapsulés dans les mêmes liposomes, soit dans des liposomes différents.

Du point de vue de futures applications en IRM-CEST clinique, la membrane EPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ supplémentée ou non de cholestérol est déjà utilisée dans des systèmes vecteurs de principes actifs thérapeutiques. Néanmoins, il apparaît nécessaire d'étudier sur modèle animal, la pharmacocinétique des systèmes LipoCEST ainsi que leur biodistribution. Cette étape franchie, pour atteindre l'objectif d'une imagerie moléculaire sélective d'un tissu, d'un organe ou de cellules, il est indispensable à terme de modifier la surface des liposomes en y fixant par exemple un ligand spécifique d'un récepteur identifié. A cet égard, la société Guerbet vient de publier une étude sur des liposomes LipoCEST porteurs du peptide RGD pour le ciblage actif de tumeurs cérébrales. Néanmoins, pour mieux contrôler l'établissement d'un contraste CEST *in vivo* et ce au niveau cellulaire, il apparaît nécessaire de conduire une ou plusieurs études *in cellulo* pour définir l'influence du milieu intracellulaire sur l'efficacité de contraste des systèmes LipoCEST, notamment lorsque les liposomes se retrouvent confinés dans des endosomes, ce qui ajoute un compartiment d'eau (l'eau « endosomale ») et une barrière membranaire supplémentaire contrôlant l'échange chimique des protons intra-liposome avec l'eau du cytoplasme. La question qui pourrait être soulevée serait dans quelle mesure, une fois le complexe paramagnétique introduit dans une cellule peut-il faire de celui-ci un agent de contraste CEST.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aime, S., Botta, M., Terreno, E., Anelli, P. L., Uggeri, F. (1993). "Molecular Recognition of R- and T-States of Human Adult Hemoglobin by a Paramagnetic Gd(III) Complex by Means of the Measurement of Solvent Water Proton Relaxation Rate." Magn. Reson. Med. **30**: 583–591.

Aime, S., Barge A., Bruce J.I., Botta M., Howard J.A.K. (1999). "NMR, relaxometric, and structural studies of the hydration and exchange dynamics of cationic lanthanide complexes of macrocyclic tetraamide ligands." J. Am. Chem. Soc. **121**: 5762–5771.

Aime, S., Barge A., Castelli D.D., Fedeli F., Mortillaro A. (2002). "Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications." Magn. Reson. Med. **47**: 639–648.

Aime, S., Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Terreno, E. (2002). "A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration." J Am Chem Soc. **124**(32): 9364-5.

Aime, S., Delli Castelli D., Terreno E. (2003). "Supramolecular adducts between poly-L-arginine and [TmIII]dotp]: a route to sensitivity-enhanced magnetic resonance imaging-chemical exchange saturation transfer agents." Angew. Chem. **42**(37): 4527-9.

Aime, S., Calabi, L., Cavallotti, C., Gianolio, E., Giovenzana, G.B., Losi, P., Maiocchi, A., Palmisano, G., Sisti M. (2004). "[Gd-AAZTA] A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents." Inorg. Chem. **43**(24): 7588–7590.

Aime, S. (2005). "High sensitive liposome MRI chem exchange saturation transfer CEST PARACEST LIPOCEST." Angew. Chem. **44**: 5513.

Aime, S., Delli Castelli D., Terreno E. (2005). "Highly sensitive MRI chemical exchange saturation transfer agents using liposomes." Angew. Chem. **44**(34): 5513-5.

Aime, S., Geninatti Crich, S., Gianolio E., Giovenzana, G.B., Tei, L., Terreno, E. (2006). "High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging." Coordination Chemistry Reviews **250**(11-12): 1562-1579.

Aime, S., Delli Castelli, D., Lawson, D., Terreno, E. (2007). "Gd-loaded liposomes as T1, susceptibility, and CEST agents, all in one." J Am Chem Soc. **129**(9): 2430-2431.

Aime, S. (2007). "Osmotic shrink paramagnetic liposome impr LIPOCEST CEST MRI agent." Angew. Chem. **46**(6): 966.

Aime, S., Delli Castelli, D., Terreno, E. (2009). "Lanthanide-Loaded Paramagnetic Liposomes as Switchable Magnetically Oriented Nanovesicles." Methods in Enzymology **464**.

Aime, S., Delli Castelli, D., Geninatti Crich S., Gianolio E., Terreno E. (2009). "Pushing the Sensitivity Envelope of Lanthanide-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents for Molecular Imaging Applications." Acc. Chem. Res **42**(7): 822–831.

Alexander, S. (1977). "Adsorption of chain molecules with a polar head: a scaling description." J. Physique (Paris) **38**: 983–987.

Alexiou, C., Schmid, R.J., Jurgons, R., Kremer, M., Wanner, G., Bergemann, C., Huenges, E., Nawroth, T., Arnold W., Parak F.G. (2006). "Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers " European Biophysics Journal **35**(5): 446-450.

Allen, T., Christian B. Hansen, Daniel E. Lopes de Menezes (1995). "Long-circulating Drug Delivery Systems Pharmacokinetics of long-circulating liposomes." Adv. Drug Deliv. Rev. **16**(2-3): 267–284.

Allen, T., Martin FJ. (2004). "Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. ." Semin. Oncol. **31**: 5–15.

Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C., Yau-Young, A. (1991). "Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo." Biochim. Biophys. Acta. **1066**(1): 29-36.

Allen, T. M., Hansen, C.B., Lopes de Menezes, D.E. (1995). "Pharmacokinetics of long-circulating liposomes " Adv. Drug. Deliv. Rev. **16**(18): 267-284.

Al-Radaideh, A., Mougine, O., Lim, S-Y., Tench, C., Constantinescu, C., Gowland P. "Magnetization transfer (MT) and endogenous Chemical exchange saturation transfer (CEST) effects in patients with clinically isolated syndrome." Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. **18** : 4310

Amodio, J., Fefferman, N., Rivera, R., Pinkney L., Strubel N. (2004). "Idiopathic intraparenchymal hematoma of the liver in a neonate" Pediatric Radiology **34**(4): 358-361.

Aranda-Espinoza, H., Bermudez, H., Bates, F.S., Discher, D.E (2001). "Electromechanical limits of polymersomes." Phys. Rev. **87**: 208-301.

Arsov, Z., Quaroni, L. (2007). "Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy." Chem. Phys. Lipids **150**: 35–48.

Artemov, A. (2003). "Molecular Magnetic Resonance Imaging With Targeted Contrast Agents." Journal of Cellular Biochemistry **90**: 518–524.

Ayyagari, A. L., Zhang, X., Ghaghada, K.B., Annapragada, A., Hu, X., Bellamkonda R.V. (2006). "Long-circulating liposomal contrast agents for magnetic resonance imaging." Magn. Reson. Med. **55**(5): 1023-1029.

- Bakshi, R. (2005). "Functional magnetic resonance imaging and multiple sclerosis: the evidence for neuronal plasticity." Journal of neuroimaging **15**(4): 82S-93S.
- Bangham , A. D., Standish, M.M., Watkins, J.C. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." J. Mol. Biol. **13**(1): 238–252.
- Barles, C. (2005). "Les problematiques d'échauffement et sar en IRM 3 Tesla." Journal de Radiologie **86**(10): 1278.
- Benachir, T., Lafleur, M. (1996). "Osmotic and pH Transmembrane Gradients Control the Lytic Power of Melittin." Biophys J. **70**: 831-840.
- Beugin, S., Edwards, K., Karlsson, G., Ollivon, M., Lesieur S. (1998). "New sterically stabilized vesicles based on nonionic surfactant, cholesterol, and poly(ethylene glycol)-cholesterol conjugates." Biophys J. **74**(6): 3198–3210.
- Beugin-Deroo, S., Ollivon, M., Lesieur, S. (1998). "Bilayer Stability and Impermeability of Nonionic Surfactant Vesicles Sterically Stabilized by PEG–Cholesterol Conjugates." Journal of Colloid and Interface Science **202**(2): 324-333.
- Bianco-Peled, H., Dori, Y., Schneider, J., Sung, L. P., Satija, S., Tirrell, M. (2001). "Structural study of Langmuir monolayers containing lipidated poly(ethylene glycol) and peptides." Langmuir **17**: 6931–6937.
- Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M. (1946). "Nuclear induction." Phys. Rev. **69**: 127.
- Boroske, E., Elwenspoek, M., Helfrich, W. (1981). " Osmotic shrinkage of giant egg-lecithin vesicles" Biophys. J. **34**: 95-109.
- Botta, M. (2000). "Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes. Implications for MRI Contrast Agent." Eur. J. Inorg. Chem.: 399-407.
- Branca, C., Magazu, S. , Maisano,G., Migliardo, F. , Migliardo, P., Romeo, G. (2002). "Hydration Study of PEG/Water Mixtures by Quasi Elastic Light Scattering, Acoustic and Rheological Measurements." J. Phys. Chem. B **106**: 10272-10276.
- Bulte, J., Peter, C.M., Van Zijl, P. Mori, S. (2002). "Magnetic resonance microscopy and histology of the CNS." Trends in Biotechnology **20**(8): S26-S28.
- Bulte, J. W. M., Cuyperb, M., Despresc, D., Franka, J.A. (1999). "Preparation, relaxometry, and biokinetics of PEGylated magnetoliposomes as MR contrast agent." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **194**(1-3): 204–209.
- Burai, L., Tóth, E., Moreau, G., Sour, A., Scopelliti, R., Merbach, A.E. (2003). "Novel macrocyclic Eull complexes: fast water exchange related to an extreme M-O water distance." Chemistry **9**(6): 1394-404.

Burdinski, D., Pikkemaat, J.A., Emrullahoglu, M., Costantini, F., Verboom, W., Langereis, S., Grull, H., Huskens, J. (2010). "Targeted LipoCEST Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Alignment of Aspherical Liposomes on a Capillary Surface." Angew. Chem. **49**(12).

Cai, K., Singh, A., Grasley, K., Haris, M., Reddy, D., Hariharan, H., Reddy, R. (2011). "CEST MRI of Human Liver at 3T." Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. **19**.

Cai, K., Haris, M., Singh, A., Kogan, F., Greenberg, J.H., Hariharan, H., Detre, J.A., Reddy, R. (2012). "Magnetic resonance imaging of glutamate." Nature Medicine **18**(2): 302-6.

Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J., Lauffer, R. B. (1999). "Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications." Chem. Rev. **99**: 2293-2352.

Carvalho, R. A., Peters, J.A., Geraldes, C. F.G.C (1997). "Intermolecular interactions of highly stable paramagnetic lanthanide(III) chelates as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy." Inorganica Chimica Acta **262**: 167-176.

Cheng, T., Forsyth, P., Chaudhry, A., Morris, D., Glück, S., Russell, J.A., Stewart, D.A. (2003). "High-dose thiotepa, busulfan, cyclophosphamide and ASCT without whole-brain radiotherapy for poor prognosis primary CNS lymphoma." Bone Marrow Transplantation **31**: 679–685.

Chertok, B., Moffat, B.A., David, A.E., Yu, F., Bergemann, C., Ross, B.D., Yang V.C., (2008). "Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors." Biomaterials **29**: 487–496.

Cho, C. H., Hong, Y.S., Kang, K., Volkov, V.I., Skirda, V., Lee, C.Y. J., Lee, C.H. (2003). "Water self-diffusion in *Chlorella* sp. studied by pulse field gradient NMR." Magn. Reson. Imaging **21**: 1009–1017.

Clément, O., De Kerviler, E., Cuenod, C., Siauve, N., Frija, G. (1995). "Agents de contraste en IRM." Feuillets de Radiologie **35**(3): 366-88.

Cofield, C. (2008). "Particle physics' key role in producing breathtaking images of the human body." Symmetry Magazine **5**(6).

Colet, J. M., Piérart, C., Seghi, F., Gabric, I., Muller, R.N. (1998). "Intravascular and intracellular hepatic relaxivities of superparamagnetic particles: an isolated and perfused organ pharmacokinetics study." J. Magn. Reson. **134**(2): 199-205.

Colowick, S. P., Kaplan, N.O., Kastin K. (1960). "Rapid mixing: stopped flow fast reactions." Methods in Enzymology. **16**: 187–227.

Costa, J., Ruloff, R., Burai, L., Helm, L., Merbach, A. E. (2005). "Rigid MII₂Gd₂II (M = Fe, Ru) complexes of a terpyridine based heteroditopic chelate: a class of candidates for MRI contrast agents." J. Am. Chem. Soc. **127**: 5147-5157.

Crowell, K. J., Macdonald, P. M. (2001). "Europium III binding and the reorientation of magnetically aligned bicelles: Insights from deuterium NMR spectroscopy." Biophys. J. **81**: 255–265.

De Gennes, P. G. (1980). "Conformations of polymers attached to an interface." Macromolecules **13**(1069–1075).

De Kerviler, E., Leroy-Willig, A., Clément, O., Frija, J. (1998). "Fat suppression techniques in MRI: an update." Biomedicine & pharmacotherapy **52**(2): 69-75.

De León-Rodríguez, L. M., Kovacs, Z. (2008). "The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates." Bioconjug. Chem. **19**(2): 391-402.

Delli Castelli, D., Terreno, E., Carrera, C., Giovenzana, G.B., Mazzon, R., Rollet, S., Visigalli, M., Aime, S. (2008). "Lanthanide-loaded paramagnetic liposomes as switchable magnetically oriented nanovesicles." Inorg. Chem. **47**(8): 2928-30.

Delli Castelli, D., Gianolio, S., Geninatticrich, E., Terreno, E., Aime S. (2008). "Metal containing nanosized systems for MR-Molecular Imaging applications." Coordination Chemistry Reviews **252**(21-22): 2424-2443.

Delli Castelli, D., Terreno, E., Cabella, C., Chaabane, L., Lanzardo, S., Tei, L., Visigalli, M., Aime S. (2009). "Evidence for in vivo macrophage mediated tumor uptake of paramagnetic/fluorescent liposomes." NMR in Biomedicine **22**(10): 1084-1092.

Delli Castelli, D., Dastrù, W., Terreno, E., Cittadino, E., Mainini, F., Torres, E., Spadaro, M., Aime, S. (2010). "In vivo MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes." Journal of Controlled Release **144**(3): 271-279.

DeMartini, W., Lehman, C., Partridge S. (2008). "Breast MRI for cancer detection and characterization: a review of evidence-based clinical applications." Acad. Radiol. **15**(4): 408-416.

Dennis, L., Parker, H.R., Buswell, K., Goodrich, C., Alexander, A. L., Keck, N., Tsuruda J.S. (1995). "The application of magnetization transfer to MR angiography with reduced total power." Magn. Reson. Med. **34**(2): 283–286.

Discher, B. M., Won, Y.Y., Ege, D.S., Lee, J.C.M., Bates, F.S., Discher, D.E., Hammer, D.A. (1999). "Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers." Science **284**: 1143-1146.

Dordas, C., Brown, P.H. (2000). "Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it." J. Membr. Biol. **175**(2): 95-105.

Drummond, D., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D.B., Papahadjopoulos, D. (1999). "Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors." Pharmacol. Rev. **51**(4): 691-743.

Durand, E., Guillot, G., Darrasse, L., Tastevin, G., Nacher, P.J., Vignaud, A., Vattolo, D., Bittoun, J. (2001) "Cpmg measurements and ultrafast imaging in human lungs with hyperpolarised helium-3 at low field (0.1t)." Magn. Reson. Med. **47** (1): 75-81

Elizondo, G., Fretz, C. J., Stark, D. D., Rocklage, S. M., Quay, S. C., Worah, D., Tsang, Y. M., Chen, M. C. M., Ferrucci, J. T. (1991). Radiology **178**: 73.

Finkelstein, A. (1976). "Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes." J. Gen. Physiol. **68**: 127-135.

Fortin-Ripoche, J. P., Martina, M.S., Gazeau, F., Ménager, C., Wilhelm, C., Bacri, J.C., Lesieur, S., Clément, O. (2006). "Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: feasibility." Radiology **239**: 415-424.

Fossheim, S. L., Fahlvik, A.K., Klaveness, J., Muller, R.N. (1999). "Paramagnetic liposomes as MRI contrast agents: influence of liposomal physicochemical properties on the in vitro relaxivity. ." Magn. Reson. Imaging **17**: 83–89.

Fulton, D. A., Elemento, E. M., Aime, S., Chaabane, L. Botta, M., Parker, D. (2006). "Glycoconjugates of gadolinium complexes for MRI applications." Chem. Commun.: 1064-1066.

Gabizon, A., Shmeeda, H., Horowitz, A.T., Zalipsky, S. (2004). "Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates." Adv. Drug Deliv. Rev. **56**(8): 1177-92.

Ghaghada, K., Hawley, C., Kawaji, K., Annapragada, A., Mukundan, S. (2008). "T1 relaxivity of core-encapsulated gadolinium liposomal contrast agents—effect of liposome size and internal gadolinium concentration." Acad. Radiol. **15**(10): 1259–1263.

Gilad, A. A., McMahon, M.T., Walczak, P., Winnard, P.T. Jr, Raman V. (2007). "Artificial reporter gene providing MRI contrast based on proton exchange." Nat. Biotech. **25**: 217–219.

Gillies, R. J., Raghunand, N., Garcia-Martin, M.L/, Gatenby, R.A. (2004). "pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers." IEEE Eng Med Biol Mag. **23**(5): 57-64.

Goffeney, N., Bulte, J.W., Duyn, J., Bryant, L.H. Jr, van Zijl, P.C. (2001). "Sensitive NMR detection of cationic-polymer-based gene delivery systems using saturation transfer via proton exchange." J Am Chem Soc. **123**(35): 8628-9.

Göhr-Rosenthal, S., Schmitt-Willich, H., Ebert, W., Conrad, J. (1993). "The demonstration of human tumors on nude mice using gadolinium-labelled monoclonal antibodies for magnetic resonance imaging." Invest. Radiol. **28**(9): 789-95.

- Goldstein, H., Lumma, W., Rudzik, A. (1989). Ann. Rep. Med. Chem. **24**: 265.
- Grad, J., Bryant, R.G. (1990). "Nuclear magnetic cross-relaxation spectroscopy." J. Magn. Reson. **90**: 1-8.
- Grassi, M., Mann, B.E., Pickup, B.T., Spencer, C.M. (1969). "The determination of individual rates from magnetization-transfer measurements." Journal of Magnetic Resonance **69**(1): 92–99.
- Grossman, R. I., Gomori, J.M., Ramer, K.N., Lexa, F.J., Schnall, M.D. (1994). "Magnetization transfer: theory and clinical applications in neuroradiology." Radiographics **14**(2): 279-90.
- Groth, C., Bender, J., Nydén, M. (2003). "Diffusion of water in multilamellar vesicles of dialkyl and di alkyl ester ammonium surfactants " Colloids and Surfaces A **228**: 64–73.
- Grüll, H., Langereis, S., Messenger, L., Delli Castelli, D., Sanino, A., Torres, E., Terreno, E., Aime, S. (2010). "Block copolymer vesicles containing paramagnetic lanthanide complexes: a novel class of T1- and CEST MRI contrast agents " Soft Matter **6**: 4847-4850.
- Guivel-Scharen, V., Sinnwell, T., Wolff, S.D., Balaban, R.S. (1998). "Detection of proton chemical exchange between metabolites and water in biological tissues." Journal of Magnetic Resonance **133**(1): 36-45.
- Gupta, H., Wilkinson, R.A., Bogdanov, A.A. Jr, Callahan, R.J., Weissleder, J.R. (1995). "Inflammation: imaging with methoxy poly(ethylene glycol)-poly-L-lysine-DTPA, a long-circulating graft copolymer." Radiology **197**(3): 665-9.
- Hall, L. M., Krauthauser, C.M., Wexler, R.S., Hollingshead, M.G., Slee, A.M., Kerr, J.S. (2000). "The hollow fiber assay: Continued characterization with novel approaches." Anticancer Res. **20**: 903-911.
- Hancu, I., Dixon, W.T., Woods, M., Vinogradov, E., Sherry, A.D., Lenkinski, R.E. (2010). "CEST and PARACEST MR contrast agents." Acta. Radiol. **51**(8): 910-23.
- Hansen, P. L., Cohen, J. A., Podgornik, R., Parsegian, V. A. (2003). "Osmotic properties of poly(ethylene glycols): quantitative features of brush and bulk scaling laws." Biophys. J. **84**: 350–355.
- Harisinghani, M. G., Barentsz, J., Hahn, P.F., Deserno, W.M., Tabatabaei, S., Hulsbergen van de Kaa, C. (2003). "Non invasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer." N. Engl. J. Med. **348**: 2491–9.
- Hashizaki, K., Taguchi, H., Itoh, C., Sakai, H., Abe, M. (2003). "Effect of poly(ethylene glycol) (PEG) chain length of PEG-lipid on the permeability of liposome bilayer membranes." Chem. Pharm. Bull. **51**(7): 815-820.

Heger, M., Salles, I. I., Bezemer, R., Cloos, M.A., Mordon, S. R., Begu, S., Deckmyn, H., Beek, J. F. (2011). "Laser-induced primary and secondary hemostasis dynamics and mechanisms in relation to selective photothermolysis of port wine stains." Journal of Dermatological Science **63**: 139–147.

Heidemann, R.M., Seiberlich, N., Griswold, M.A., Wohlfarth, K., Krueger, G., Jakob, P.M. (2006). "Perspectives and limitations of parallel MR imaging at high field strengths." Neuroimaging clinics of North America. **16**(2): 311-320.

Henkelman, R. M., Stanisz, G. J., Graham, S. J. (2001). "Magnetization transfer in MRI: a review." NMR in Biomedicine **14**(1): 57–64.

Hermann, P., Kotek, J., Kubíček V., Lukeš, I. (2008). "Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes " Dalton Trans.: 3027-3047.

Hinckley, C. C. (1969). "Paramagnetic shifts in solutions of cholesterol and the dipyrindine adduct of trisdipivalomethanatoeuropium. 3. A shift reagent." J Am Chem Soc. **91**(18): 5160-2.

Hinckley, C. C., Heftman, E. (1973). "Applications of lanthanide shift reagents, modern methods of steroid analysis." Academic Press: 265.

Hinckley, C. C., Kerane C.J., Moeller, T. (1973). "Lanthanide shift reagents." Eds., U. S. Atomic Energy Commission: 326.

Hindman, J. C. (1966). "Proton resonance shift of water in the gas and liquid states." J. Chem. Phys. **44**(12): 4582-92

Hodzic, A., Rappolt, M., Amenitsch, H., Laggner, P., Pabst, G. (2008). "Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol." **94**: 3935-3944.

Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C., Gillet, B., Sebrie, C., Baati, T., Eubank, J. F., Heurtaux, D., Clayette, P., Kreuz, C., Chang, J.S., Kyu Hwang, Y., Marsaud, V., Bories, P.N., Cynober, L., Gil, S., Férey, G., Couvreur, P., Gref, R. (2010). "Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging." Nature Materials **9**: 172–178.

Hsieh, P. S., Balaban, R.S. (1987). "31P Imaging of in vivo creatine kinase reaction rates." J. Magn. Reson. **74**: 574-579.

Huang, C., Mason, J.T. (1978). "Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **75**(1): 308–310.

Huang, C. H., Morrow, J.R. (2009). "A PARACEST agent responsive to inner- and outer-sphere phosphate ester interactions for MRI applications." J Am Chem Soc. **131**(12): 4206-7.

Huster, D., Jin, A.J., Arnold, K., Gawrisch, K. (1997). "Water permeability of polyunsaturated lipid membranes measured by 170 NMR." Biophys J. **73**: 855-864.

Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L.V., Ojima, I. (2005). "Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates." Chem. Inform. **36**(47).

Johnston, M. J. W., Semple, S.C., Klimuk, S. K., Edwards, K., Eisenhardt, M. L., Leng, E.C., Karlsson, G., Yanko, D., Cullis, P.R. (2006). "Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations." Biochim. Biophys. Acta. **1758**(1): 55–64.

Jones, C. K., Schlosser, M.J., van Zijl, P.C.M., Pomper, M.G., Golay, X., Zhou, J. (2006). "Amide proton transfer imaging of human brain tumors at 3T." Magn. Reson. Med. **56**: 585–592.

Karcher, G. (2011). "Cours d'imagerie Médicale de l'école Supélec Metz."

Karp, E. S., Inbaraj, J. J., Lryukhin, M., and Lorigan, G. A. (2006). "Electron paramagnetic resonance studies of an integral membrane peptide inserted into aligned phospholipid bilayer nanotube arrays." J. Am. Chem. Soc. **128**: 12070–12071.

Kenworthy, A. K., Hristova, K., Needham, D., McIntosh, T. J. (1995a). "Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol)." Biophys. J. **68**(1921–1936).

Kenworthy, A. K., Simon, S. A., McIntosh, T. J. (1995b). "Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol)." Biophys. J. **68**: 1903–1920.

Kim, M. U., Hyung Kim, S., Cheol Kim, H., Young Lee, J., A Kim, M., Koo Han, J., Ihn Choi, B. (2010). "Hepatic Angiomyolipoma: Dual-Contrast MRI Findings Using Superparamagnetic Iron Oxide (SPIO) and Gadolinium Agents." J. Korean Soc. Radiol. **63**: 537-546.

Koh, D. M., Collins, D.J. (2007). "Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology." AJR **188**: 1622-1635.

Kotek, J., Lebduskova, P., Hermann, P., Vander Elst, L., Muller, R.N., Geraldès, C.F.G.C., Maschmeyer, T., Luke, I., Peters J.A. (2003). "Lanthanide (III) complexes of novel mixed carboxylic phosphorus acid derivatives of diethylenetriamine. A step towards more efficient MRI contrast agents." Eur. J. Inorg. Chem. **9**: 5899-5915.

Kuhl, T. L., Leckband, D. E., Lasic, D. D., Israelachvili, J. N. (1994). "Modulation of interaction forces between bilayers exposing shortchained ethylene oxide headgroups." Biophys. J. **66**: 1479–1488.

Lande, M. B., Donovan, J.M., Zeidel, M.L. . (1995). "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons." J. Gen. Physiol. **106**: 67–84.

Langereis, S., de Lussanet, Q.G., van Genderen, M.H. Meijer, E.W., Beets-Tan, R.G., Griffioen, A.W., van Engelshoven, J.M., Backes, W.H. (2006). "Evaluation of Gd(III)DTPA-terminated poly(propylene imine) dendrimers as contrast agents for MR imaging." NMR Biomed. **19**(1): 133-41.

Langereis, S., Keupp, van Velthoven, J.L.J., de Roos, I.H.C., Burdinski, D., Pikkemaat, J. A., Grull, H. (2009). "A temperature-sensitive liposomal 1H CEST and 19F contrast agent for MR image-guided drug delivery." J. Am. Chem. Soc. **131**(4): 1380–1381.

Lasic, D. D., Needham, D. (1995). "The "stealth" liposome: a prototypical biomaterial." Chem. Rev. **95**: 2601–2628.

Lauterbur, P. (1973). "Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance." Nature **242**: 190-191.

Le Bas, J. F. (2012). "Cours de « imagerie par résonance magnétique » CHU Grenoble

Lee, S. J., Muthiah, M., Jin Lee, H., Lee, H.J., Moon, M.J., Che, H.L., U Heo, S., Lee, H.C., Yeon Jeong, Y., Park, I.K. (2012). "Synthesis and characterization of magnetic nanoparticle-embedded multi-functional polymeric micelles for MRI-guided gene delivery." Macromolecular Research **20**(2): 188-196.

Lehéricy, S. (2010). "Danger de l'IRM, contre-indications, Directive Européenne." cours DES radiologie Université Pierre et Marie Curie – Paris 6.

Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., Paternostre, M., Ollivon, M. (1993). "Study of size distribution and stability of liposomes by High performance gel exclusion chromatography." Chem. Phys. Lipids. **64**(57–82).

Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C.; Menager, C.; Cabuil, V.; Dadhi, D.; Pierrot, P.; Edwards, K. (2003). "Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes." J. Am. Chem. Soc. **125**: 5266–5267.

Lewis, B. A., Engelman, D. M. (1983). "Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles." J. Mol. Biol. **166**: 211–217.

Li, W. H., Parigi, G., Fragai, M., Luchinat, C., Meade, T.J. (2002). "Mechanistic Studies of a Calcium-Dependent MRI Contrast Agent." Inorg. Chem. **41**: 4018–4024.

Lim, K. O., Stark, D.D., Leese, P.T., Pfefferbaum, A., Rocklage, S.M., Quay, S.C. (1991). "Hepatobiliary MR imaging: first human experience with MnDPDP." Radiology **178**(1): 79-82.

Lindner, L. H., Eichhorn, M.E., Eibl, H. (2004). "Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time." Clin. Cancer Res. (10): 2168-2178.

Liu, G., Li, Y., Pagel, M.D. (2007). "Design and characterization of a new irreversible responsive PARACEST MRI contrast agent that detects nitric oxide." Magn. Reson. Med. **58**(6): 1249-56.

Lund-Katz, S., Laboda, H.M., McLean, L.R., Phillips, M.C. (1988). "Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange." Biochemistry **27**(9): 3416-23.

Mabrouk, E., Cuvelier, D., Brochard-Wyart, F., Li, M.H., Nassoy, P. "Les polymersomes, des vésicules robustes et stimulables pour la libération contrôlée des médicaments." publications CNRS.

Mabrouk, E., Cuvelier, D., Brochard-Wyart, F., Nassoy, P., Li M.-H. (2009). "Bursting of sensitive polymersomes induced by curling " Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**: 7294-7298

Majewski, J., Kuhl, T. L., Kjaer, K., Gerstenberg, M. C., Als-Nielsen, J., Israelachvili, J. N., Smith, G. S. (1998). "An x-ray synchrotron study of packing and protrusions of polymer lipid monolayers at the air-water interface." J. Am. Chem. Soc. **120**: 1469 – 1473.

Mani, T., Tircso, G., Togao, O., Zhao, P., Soesbe, T., Takahashi, M., Sherry, A. D. (2009). "Modulation of water exchange in Eu(III) DOTA-tetraamide complexes: considerations for in vivo imaging of PARACEST agents." Contrast Media Mol. Imaging. **4**(4): 183–191.

Marcotte, I., Belanger, A., and Auger, M. (2006). "The orientation effect of gramicidin A on bicelles and Eu³⁺-doped bicelles as studied by solid-state NMR and FT-IR spectroscopy." Chem. Phys. Lipids **139**: 137–149.

Martina, M., Fortin, J.P., Ménager, C., Clément, O., Barratt, G., Grabielle-Madellmont, C., Gazeau, F., Cabuil, V., Lesieur, S. (2005). "Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging." J Am Chem Soc. **127**(30): 10676-85.

Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagel, J.F., Zeidel, M. L. (2008). "Structural determinants of water permeability through the lipid membrane." J. Gen. Physiol. **131**(1): 69–76.

McMahon, M. T., Gilad, A.A., DeLiso, M.A., Cromer Berman, S. M., Bulte, J.W.M., van Zijl, P.C.M. (2008). "New "multi-color" polypeptide DIACEST contrast agents for MR imaging." Magn. Reson. Med. **60**(4): 803–812.

Ménager, C., Cabuil, V. (2002). J. Phys. Chem. B **106**: 7913 – 7918.

Merkle, D. "Abdominal MRI at 3.0 T: the basics revisited." AJR **186**(6): 1524-32. .

Micskei, K., Helm, L., Brucher, E., Merbach, A. E. (1993). "Oxygen-17 NMR study of water exchange on gadolinium polyaminopolyacetates [Gd(DTPA)(H₂O)]²⁻ and [Gd(DOTA)(H₂O)]⁻ related to NMR imaging." Inorg. Chem. **32**(18): 3844.

Mitsche, M. A., Wang L.M., Small, D.M. (2010). "Adsorption of egg-PC to an air/water and triolein/water bubble Interface: use of the 2-dimensional phase rule to estimate the surface composition of a phospholipid/triolein/water surface as a function of surface pressure." Journ. Phys. Chem.

Moffat, B. A., Reddy, G.R., McConville, P., Hall, D.E., Chenevert, T.L., Kopelman, R.R., Philbert, M., Weissleder, R., Rehemtulla, A., Ross, B.D. (2003). "A novel polyacrylamide magnetic nanoparticle contrast agent for molecular imaging using MRI." Mol. Imaging. **2**(4): 324-32.

Mosher, T.J. (2006). "Musculoskeletal imaging at 3T: current techniques and future applications." Magn. Reson. Med. **14**(1): 63-76.

Nagle, J. F., Tristram-Nagle, S. (2000). "Structure of lipid bilayers." Biochim. Biophys. Acta **1469**: 159-195.

Nagle, J. F., Mathai, J.C., Zeidel, M.L., Tristram-Nagle, S. (2008). "Theory of passive permeability through lipid bilayers." J. Gen. Physiol. **131**(1): 77-85.

Needham, D., Hristova, K., McIntosh, T.J., Dewhirst, M., Wu, N., Lasic, D.D. (1992). "Polymer-grafted liposomes: physical basis for the stealth property " J. Liposome Research(2): 411-430

Nonat, A. (2007). "Complexes de Lanthanide (III) pour le développement de nouvelles sonde magnétiques et luminescentes." Thèse Université JOSEPH FOURIER Grenoble 1.

Okuhata, Y. (1999). "Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging." Adv Drug Deliv Rev. **37**(1-3): 121-137.

Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., Evans, E. (2000). "Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers." Biophys J. **79** 321-327.

Oliva, M. R., Saini, S. (2004). "Liver cancer imaging: role of CT, MRI, US and PET." Cancer Imaging **4**: S42-S46.

Pan, J., Heberle, F.A., Tristram-Nagle, S., Szymanski, M., Koepfinger, M., Katsaras, J., Kučerka, N. (2012). "Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering." Biochim Biophys Acta **1818**: 2135-2148.

Parasassi, T., Giusti, A.M., Raimondi, M., Gratton, E. (1995). "Abrupt Modifications of Phospholipid Bilayer Properties at Critical Cholesterol Concentrations." biophys J. **68**: 1895-1902.

Park, S. H., Loudet, C., Marassi, F. M., Dufourc, E. J., and Opella, S. J. (2008). "Solid-state NMR spectroscopy of a membrane protein in biphenyl phospholipid bicelles with the bilayer normal parallel to the magnetic field." J. Magn. Res. **193**: 133–138.

Päuser, S., Reszka R, Wagner S, Wolf KJ, Buhr HJ, Berger G. (1997). "Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carriers." Anticancer Drug Des. **12**(2): 125-35.

Petrache, H. I., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F. (1998). "Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers." Chem. Phys. Lipids **95**: 83–94.

Pikkemaat, J., Wegh, R.T., Lamerichs, R., van de Molengraaf, R.A., Langereis, S., Burdinski, D., Raymond, A.Y., Janssen, H.M., de Waal, B.F., Willard, N.P., Meijer, E.W., Grüll, H. (2007). "Dendritic PARACEST contrast agents for magnetic resonance imaging." Contrast Media Mol Imaging. **2**(5): 229-39.

Plassat, V., Martina, M.S., Barratt, G., Ménager, C., Lesieur, S. (2007). "Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: pharmacokinetics and biodistribution." International Journal of Pharmaceutics **344**(1-2): 118-127.

Plassat, V., Wilhelm, C., Marsaud, V., Ménager, C., Gazeau, F., Renoir, J.M., Lesieur, S. (2011). "Anti-estrogen-loaded superparamagnetic liposomes for intracellular magnetic targeting and treatment of breast cancer tumors." Adv. Funct. Mater. **21**: 83–92.

Polasek, M., Rudovsky, J., Hermann, P., Lukes, I., Vander Elst, L., Muller, R.N. (2004). "Lanthanide(III) complexes of a pyridine N-oxide analogue of DOTA: exclusive M isomer formation induced by a six-membered chelate ring." Chem. Commun. **22**: 2602- 2603.

Port, M., Corot, C., Rousseaux, O., Raynal, I., Devoldere, L., Idée, J.M., Dencausse, A., Le Greneur, S., Simonot, C., Meyer, D. (2001). "P792: a rapid clearance blood pool agent for magnetic resonance imaging: preliminary results." MAGMA **12**(2-3): 121-7.

Powell, D. H., Ni Dhubhghaill, O.M., Pubanz, D., Helm, L., Lebedev, Y.S. (1996). "High-pressure NMR kinetics. Part Structural and dynamic parameters obtained from ¹⁷O NMR, EPR, and NMRD studies of monomeric and dimeric Gd³⁺ complexes of interest in magnetic resonance imaging: an integrated and theoretically self-consistent approach." J. Am. Chem. Soc **118**: 9333–9346.

Powell, D. H., Ni Dhubhghaill, O.M., Pubanz, D., Helm, L., Lebedev, Y.S., Schlaepfer, W., Merbach, A.E. (1996). "Structural and Dynamic parameters obtained from ¹⁷O NMR, EPR, and NMRD studies of monomeric and dimeric Gd³⁺ complexes of interest in magnetic resonance imaging: an integrated and theoretically self-consistent approach." J. Am. Chem. Soc. **118**: 9333-9346.

Prosser, R. S., Bryant, H., Bryant, R. G., and Vold, R. R. (1999). "Lanthanide chelates as bilayer alignment tools in NMR studies of membrane-associated peptides." J. Magn. Res. **141**: 256–260.

Prosser, R. S., Shyianovskaya, I. V. (2001). "Lanthanide ion assisted magnetic alignment of model membranes and macromolecules." Concepts Magnetic Res. **13**: 19–31.

Prosser, R. S., Evanics, F., Kitevski, L., and Al-Abdoul-Wahid, M. S. (2006). "Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins." Biochemistry **45**: 8453–8465.

Pubanz, D., Gonzalez, G., Powell, D. H., Merbach, A. E. (1995). Inorg. Chem. **34** (17): 4447-4453.

Purcell, E. M., Torrey, H. C, Pound, R. V. (1946). "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid." Phys. Rev. **69**: 37.

Rand, R. P., Parsegian, V. A. (1989). "Hydration forces between phospholipid bilayers." Biochim. Biophys. Acta. **988**: 351–376.

Rappolt, M., Laggner, P., Pabst, G.. (2004). "Structure and elasticity of phospholipid bilayers in the L_α phase: a comparison of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine membranes." Recent Research Developments in Biophysics **3**(2): 365–394.

Ratnakar, J., Woods, M., Lubag, A.J.M., Kovacs, Z., Sherry, A.D. (2008). "Modulation of water exchange in europium (III) DOTA-tetraamide complexes via electronic substituent effects." J. Am. Chem. Soc **130**: 6–7.

Rawicz, W., Smith, B. A., McIntosh, T. J., Simon, S. A., Evans, E. (2008). "Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids." **94**: 4725-4736.

Raymond, K. N., Pierre, V. C. (2005). "Next generation, high relaxivity gadolinium MRI agents." Bioconjug. Chem. **16**: 3-8.

Reimer, P., Tombach, B., Daldrup, H., Hesse, T., Sander, G., Balzer, T., Shamsi, K., Berns, T., Rummeny, E.J., Peters, P.E. (1996). "New MR contrast media in liver diagnosis. Initial clinical results with hepatobiliary Eovist (gadolinium-EOB-DTPA) and RES-specific Resovist (SH U 555 A)." Radiologie **36**(2): 124-33.

Ren, J., Trokowski, R., Zhang, S., Malloy, C.R., Sherry, A.D. (2008). "Imaging the tissue distribution of glucose in livers using a PARACEST sensor." Magn. Reson. Med. **60**(5): 1047-55.

Riviere, C., Martina, M.S., Tomita, Y., Wilhelm, C., Tran Dinh, A., Menager, C., Pinard, E., Lesieur, S., Gazeau, F., Seylaz, J. (2007). "Magnetic Targeting of Nanometric Magnetic Fluid-loaded Liposomes to Specific brain Intravascular Areas: A Dynamic Imaging Study in Mice." Radiology **244**(2).

Robinson, A. J., Richards, W.G., Thomas, P.J., Hann, M.M. (1995). "Behavior of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: A molecular dynamics study." Biophys J. **68**: 164-170.

Rondeau, R. E., Sievers, R.E. (1971). "New superior paramagnetic shift reagents for nuclear magnetic resonance spectral clarification." J. Am. Chem. Soc. **93**(6): 1522.

Rudovsky, J., Cigler, P., Kotek, J., Hermann, P., Vojtisek, P., Lukes, I., Peters, J.A., Vander Elst, L., Muller, R.N. (2005). "Lanthanide(III) complexes of a mono(methylphosphonate) analogue of H4DOTA: the influence of protonation of the phosphonate moiety on the TSAP/SAP isomer ratio and the water exchange rate." Chem. Eur. J **11**: 2373-2384.

Saar, G., Zhang, B., Ling, W., Regatte, R.R., Navon, G., Jerschow, A. (2012). "Assessment of glycosaminoglycan concentration changes in the intervertebral disc via chemical exchange saturation transfer." NMR Biomed. **25**(2): 255-61.

Saint-Jalmes, H. (2010). "Cours de RMN." Cours LTSI (Inserm U642) PRISM Villejean, Faculté de Médecine Université de Rennes 1.

Saito, H., Shinoda, W. (2011). "Cholesterol effect on water permeability through DPPC and PSM lipid bilayers: a molecular dynamics study." J. Phys. Chem. B **115**: 15241-15250.

Sanders, J. K. M., Hanson, S. W., Williams, D.H. (1972). "Paramagnetic shift reagents. the nature of the interactions." J Am Chem Soc. **94**: 15.

Sandre, O., Moreaux, L., Brochard-Wyart, F. (1999). "Dynamics of transient pores in stretched vesicles." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 10591-10596

Sanson, Diou, O., Thévenot, J., Ibarboure, E., Soum, A., Brûlet, A., Miraux, S., Thiaudière, E., Tan, S., Brisson, A., Dupuis, V., Sandre, O., Lecommandoux, S. (2011). "Doxorubicin loaded magnetic polymersomes: theranostic nanocarriers for MR imaging and magneto-chemotherapy." ACS Nano **5**(2): 1122-1140.

Sapra, P., Allen, T.M. (2003). "Ligand-targeted liposomal anticancer drugs." Progress in Lipid Research **42**(5): 439-462.

Schaefer, P. W., Grant, P.E., Gonzalez, R.G. (2000). "State of the Art: Diffusion-weighted MR Imaging of the Brain." Radiology **217**: 331-345.

Schmitt, B., Zbýň, Š., Stelzeneder, D., Jellus, V., Paul, D., Lauer, L., Bachert, P., Trattnig, S. (2011). "Cartilage Quality Assessment by Using Glycosaminoglycan Chemical Exchange Saturation Transfer and Na MR Imaging at 7 T." Radiology **260** : 257-264.

Selb, J. (2002). "Source virtuelle acousto-optique pour l'imagerie des milieux diffusants THÈSE de DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ PARIS XI."

Sevigny Brown, K. R., Loren, M.D., Yamamoto, G., Kapiolani, M.P.H. (1995). "Moyamoya Disease." Radiology Cases in Pediatric Emergency Medicine **3**(9).

Sherry, A. D., Woods, M. (2008). "Chemical Exchange Saturation Transfer Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging." Annu. Rev. Biomed. Eng. **10**: 391–411.

Sheth, S. R., Leckband, D. (1997). "Measurements of attractive forces between proteins and end-grafted poly(ethylene glycol) chains." Proc.Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 8399–8404.

Silver, N. C., Lai, M., Symms, M.R., Barker, G.J., McDonald, W.I., Miller, D.H. (1998). "Serial magnetization transfer imaging to characterize the early evolution of new MS lesions." Neurology **51**(3): 758-64.

Small, D. M., Hanahan, D. (1986). "The physical chemistry of lipids from alkanes to phospholipids." Handbook of Lipid Research Series **4**: 1-672.

Smirniotopoulos, J. G., Murphy, F. M., Rushing, E.J., Rees, J.H., Schroeder, J.W. (2007). "Patterns of contrast enhancement in the brain and meninges." Radiological Society of North America Inc. **27**(2): 525-551.

Snoussi, K., Bulte, J.W., Guéron, M., van Zijl, P.C. (2003). "Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: detection of poly(rU) and of a dendrimer-poly(rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology." Magn. Reson. Med. **49**(6): 998-1005.

Stancanello, J., Terreno, E., Delli Castelli, D., Cabella, C., Uggeri, F., Aime, S. (2008). "Development and validation of a smoothing-splines-based correction method for improving the analysis of CEST-MR images." Contrast Media Mol. Imaging. **3**(4): 136-149.

Stanisz, G. J., Odrobina, E.E., Pun, J., Escaravage, M., Graham, S.J., Bronskill, M.J., Henkelman, R. M. (2005). "T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T." Magn. Reson. Med. **54**: 507–512

Strijkers, G. J., Kluza, E., Van Tilborg, G.A. F., van der Schaft, D.W.J., Griffioen, A.W., Mulder, W.J. M., Nicolay, K. (2010). "Paramagnetic and fluorescent liposomes for target-specific imaging and therapy of tumor angiogenesis." Angiogenesis **13**: 161–173.

Swift, T. J., Connick, R.E. (1962). "NMR relaxation mechanisms of O17 in aqueous solutions of paramagnetic cations and the lifetime of water molecules in the first coordination sphere." J. Chem. Phys. **37**: 307-312.

Tanenbaum, L.N. "Clinical 3T MR imaging: mastering the challenges." Magnetic resonance imaging clinics of North America **14**(1): 1-15.

Terreno, E., Castelli, D.D., Cravotto, G., Milone, L., Aime, S. (2004). "Ln(III)-DOTAMGly complexes: a versatile series to assess the determinants of the efficacy of paramagnetic chemical exchange saturation transfer agents for magnetic resonance imaging applications." Investig. Radiol. **39**: 235–243.

Terreno, E., Cabella, C., Carrera, C., Delli Castelli, D., Mazzon, R., Rollet, S., Stancanello, J., Visigalli, M., Aime, S. (2007). "From spherical to osmotically shrunken paramagnetic liposomes: an improved generation of LIPOCEST MRI agents with highly shifted water protons." Angew. Chem. **46**(6): 966-968.

Terreno, E., Sanino, A., Carrera, C., Castelli, D.D., Giovenzana, G.B., Lombardi, A., Mazzon, R., Milone, L., Visigalli, M., Aime, S. (2008). "Determination of water permeability of paramagnetic liposomes of interest in MRI field." J Inorg. Biochem. **102**(5-6): 1112-9.

Terreno, E., Delli Castelli, D., Milone, L., Rollet, S., Stancanello, J., Violante, E., Aime, S. (2008). "First ex-vivo MRI co-localization of two LIPOCEST agents." Contrast Media Mol. Imaging. **3**(1): 38-43.

Terreno, E., Barge, A., Beltrami, L., Cravotto, G., Delli Castelli, D., Fedeli, F., Jebasingh, B., Aime, S. (2008). "Highly shifted LIPOCEST agents based on the encapsulation of neutral polynuclear paramagnetic shift reagents." Chem. Commun.(5): 600-602.

Terreno, E., Delli Castelli, D., Cabella, C., Dastru` , W., Sanino, A., Stancanello, J., Tei, L., Aime, S. (2008). "Paramagnetic liposomes as innovative contrast agents for magnetic resonance (MR) molecular imaging applications.." Chem. Biodivers. (5): 1901-1912.

Terreno, E., Stancanello, J., Longo, D., Delli Castelli, D., Milone, L., Sanders, H.M.H.F., Kok, M.B., Uggeri, F., Aime, S. (2009). "Methods for an improved detection of the MRI-CEST effect." Contrast Media Mol Imaging. **4**(5): 237-247.

Terreno, E., Delli Castelli, D., Violante, E., Sanders, H.M.H.F., Sommerdijk, N.A.J.M., Aime, S. (2009). "Osmotically shrunken LIPOCEST agents: an innovative class of magnetic resonance imaging contrast media based on chemical exchange saturation transfer." Chemistry **15**(6): 1440-1448.

Terreno, E., Boffa, C., Menchise, V., Fedeli, F., Carrera, C., Delli Castelli, D., Digilio, G., Aime, S. (2011). "Gadolinium-doped LipoCEST agents: a potential novel class of dual 1H-MRI probes." Chem. Commun. **47**(16): 4667-4669.

Tilcock, C., Unger, E., Cullis, P. (1989). "Liposomal Gd-DTPA: preparation and characterization of relaxivity." Radiology **171**: 77-80.

Tilcock, C., MacDougall, P., Unger, E. (1990). "The effect of lipid composition on the relaxivity of Gd- DTPA entrapped in lipid vesicles of defined size." Biochim. Biophys. Acta **1022**: 181-186.

Tirosh, O., Barenholz, Y., Katshandler, J., Prie, A. (1998). "Hydration of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes." Biophys J. **74**: 1371-79.

Tonomura, B., Naketani, H., Osnishi, M., Yomaguchi-Ho, J., Hiromi, K. (1978). "Test reactions for a stopped flow apparatus. Reduction of 1,6 dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by Lascorbic acid." Anal. Biochem. **84**: 370-383.

Torchilin, V. P., Levchenko, T.S., Lukyanova, A.N., Khawa, B.A., Klivanov, A.L., Rammohana, R., Samokhinc, G.P., Whitemana, K.R. (2001). "p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups." Biochim. Biophys. Acta **1511**(2): 397–411.

Tóth, E., Ni Dhubhghaill, O. M., Besson, G., Helm, L., Merbach, A.E. (1999). "Coordination equilibrium— a clue for fast water exchange on potential magnetic resonance imaging contrast agents?" Magn. Reson. Chem **37**(10): 701–708.

Tóth, É., Connac, F., Helm, L., Adzamlı, K., Merbach, A.E. (1998). "Direct assessment of water exchange on a Gd(III) chelate bound to a protein " Journal of Biological Inorganic Chemistry **3**(6): 606-613.

Trokowski, R., Zhang, S., Sherry, A.D. (2004). "Cyclen-based phenylboronate ligands and their Eu³⁺ complexes for sensing glucose by MRI." Bioconjug. Chem **15**: 1431–1440.

Trokowski, R., Ren, J., Kálmán, F.K., Sherry, A.D. (2005). "Selective sensing of zinc ions with a PARACEST contrast agent." Angew. Chem. **44**(42): 6920-3.

Trokowski, R., Ren, J.M., Kalman, F.K., Sherry, A.D. (2005). "Selective sensing of zinc ions with a PARACEST contrast agent." Angew. Chem. **44**: 6920–6923.

Unger, E. C., Winokur, T., MacDougall, P. (1989). "Hepatic metastases: liposomal Gd-DTPA-enhanced MR imaging." Radiology **171**: 81–85.

Van der Heide, T., Stuart, M.C.A., Poolman, B. (2001). "On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine." The EMBO Journal **20**: 7022 - 7032

Van der Molen, A. J., Bellin, M.F. (2008). "Extracellular gadolinium-based contrast media: differences in diagnostic efficacy." Eur J Radiol. **66**(2): 168-74.

Van Zijl, P. C., Jones, C.K., Ren, J., Malloy, C.R., Sherry, A.D. (2007). "MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST)." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **104**(11): 4359-64.

Vander Elst, L., Rocha, A., Gillis, P., Laurent, S., Botteman, F., Bulte, J.W.M., Muller, R.N. (2002). "Dy-DTPA Derivatives as Relaxation Agents for Very High Field MRI: The Beneficial Effect of Slow Water Exchange on the Transverse Relaxivities." Magn. Reson. Imaging **47**: 1121-1130.

Vats, N., Wilhelm, C., Rautou, P.E., Poirier-Quinot, M., Péchoux, C., Devue, C., Boulanger, C.M., Gazeau, F. (2010). "Magnetic tagging of cell-derived microparticles: new prospects for imaging and manipulation of these mediators of biological information." Nanomedicine **5**(5): 727-738.

Viallat, A., Dalous, J., Abkanrian, M. (2004). "Giant lipid vesicles filled with a gel : shape instability induced by osmotic shrinkage." Biophys. J. (86): 2179-2187.

Vinogradova, E., Soesbec, T.C., Balschid, J.A., Sherry, A. D., Lenkinskia, R. E. (2012). "pCEST: Positive contrast using Chemical Exchange Saturation Transfer." J Magn Reson. **215**: 64–73.

Viswanathan, S., Kovacs, Z., Green, K.N., Ratnakar, S.J., Sherry, A.D. (2010). "Alternatives to gadolinium-based metal chelates for magnetic resonance imaging." Chem Rev. **110**(5): 2960-3018.

Vojtíšek, P., Cígler, P., Kotek, J., Rudovský, J., Hermann, P., Lukeš, I (2005). "Crystal Structures of Lanthanide(III) Complexes with Cyclen Derivative Bearing Three Acetate and One Methylphosphonate Pendants." Inorg. Chem. **44**: 5591-5599

Voss, Zevin (2006). "Functional MR imaging at 3.0 T versus 1.5 T: a practical review." Neuroimaging clinics of North America. **16**(2): 285-97, x. .

Waldeck, A., Kuchell, P.W., Lennon, A.J., Chapman, B.E. (1997). "NMR diffusion measurements to characterise membrane transport and solute binding." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **30**: 39-68.

Waldeck, R. A., Nouri-Sorkhabi, M.H., Sullivan, D.R., Kuchel, P.W. (1995). "Effects of cholesterol on transmembrane water diffusion in human erythrocytes measured using pulsed field gradient NMR." Biophysical Chemistry **55**: 197-208.

Ward, K. M., Balaban, R.S. (2000). "Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST)." Magn Reson Med. **44**(5): 799-802.

Wasterby, P., Oradd, G., Lindblom, G. (2002). "Anisotropic Water Diffusion in Macroscopically Oriented Lipid Bilayers Studied by Pulsed Magnetic Field Gradient NMR " J Magn Reson. **157**: 156–159.

Weinmann, H. J., Ebert, W., Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H. (2003). "Tissue-specific MR contrast agents." Eur J Radiol. **46**(1): 33-44.

Weishaupt, D. (2003). "Radiologie: Imagerie cellulaire spécifique par tomographie en résonance magnétique:nouvelles possibilités de diagnostic." HIGHLIGHTS Forum Med. Suisse **51/52**: 1279.

White, S. H., King, G. I. (1985). "Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 6532-6536.

Wiener, E. C., Konda, S., Shadron, A., Brechbiel, M., Gansow, O. (1997). "Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor." Invest. Radiol. **32**(12): 748-54.

Winter, P. M., Cai, K., Chen, J., Adair, C.R., Kiefer, G.E., Athey, P.S., Gaffney, P.J., Buff, C.E., Robertson, J.D., Caruthers, S.D., Wickline, S.A., Lanza, G.M. (2006). "Targeted PARACEST nanoparticle contrast agent for the detection of fibrin." Magn. Reson. Med. **56**(6): 1384-8.

Woessner, D. E., Zhang, S., Merritt, M.E., Sherry, A.D. (2005). "Numerical solution of the Bloch equations provides insights into the optimum design of PARACEST agents for MRI." Magn. Reson. Med. **53**(4): 790-9.

Wojciechowski, F., Suchy, M., Li, A.X., Azab, H.A., Bartha, R., Hudson, R.H. (2007). "A robust and convergent synthesis of dipeptide-DOTAM conjugates as chelators for lanthanide ions: new PARACEST MRI agents." Bioconjug. Chem. **18**(5): 1625-36.

Wolff, S., Balaban, R.S. (1994). "Magnetization transfer imaging: practical aspects and clinical applications." Radiology **192**(3): 593-9.

Wolff, S. D., Balaban, R.S. (1989). "Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo." Magn. Reson. Med. **10**(1): 135-144.

Woods, M., Woessner, D.E., Sherry, A.D. (2006). "Paramagnetic lanthanide complexes as PARACEST agents for medical imaging." Chem. Soc. Rev. **35**: 500.

Wu, Y., Zhou, Y., Ouari, O., Woods, M., Zhao, P., Soesbe, T.C., Kiefer, G.E., Sherry, A.D. (2008). "Polymeric PARACEST agents for enhancing MRI contrast sensitivity." J. Am. Chem. Soc. **130**(42): 13854-5.

Xu, X., Khan, M.A., Burgess, D.J. (2012). "A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishments of design space at laboratory scale." Int. J. Pharm. **423**(2): 543-53.

Yang, Y., Wei, X., Sun, P., Wan, J. (2010). "Preparation, Characterization and Adsorption Performance of a Novel Anionic Starch Microsphere." Molecules **15**(4): 2872-2885.

Zanca, M. (2007). "Molecular and metabolic imaging techniques in magnetic resonance imaging." Médecine Nucléaire **31**(4): 173-182.

Zavoisky, E. (1946). "Spin magnetic resonance in the decimetre-wave region." J. Phys. Chem. B **10**: 197-198

Zhang, A. S., Jiang X., Sherry, A. D. (2005). "Modulation of the lifetime of water bound to lanthanide metal ions in complexes with ligands derived from 1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetate (DOTA)." Helv. Chim. Acta **88**: 923-935.

Zhang, S., Winter, P., Wu, K., Sherry, A.D. (2001). "A novel europium(III)-based MRI contrast agent. The first demonstration of a paramagnetic CEST agent as a MRI agent." J. Am. Chem. Soc. **123**: 1517-1518.

Zhang, S., Merritt, M., Woessner, D.E., Lenkinski, R.E., Sherry, A.D. (2003). "PARACEST agents: modulating MRI contrast via water proton exchange." Acc. Chem. Res. **36**: 783-790.

Zhang, S., Trokowski, R., Sherry, A.D. (2003). "A paramagnetic CEST agent for imaging glucose by MRI." J. Am. Chem. Soc. **125**(50): 15288-9.

Zhang, S., Malloy, C.R., Sherry, A.D. (2005). "MRI thermometry based on PARACEST agents." J. Am. Chem. Soc. **127**(50): 17572-3.

Zhao, J. M., Yah-el Har-el, McMahon, M.T., Zhou, J., Sherry, A.D., Sgouros, G., Bulte, J.W.M., Van Zijl, P.C.M (2008). "Size-induced enhancement of chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast in liposomes." J. Am. Chem. Soc. **130**(15): 5178-5184.

Zhao, M., Beauregard, D.A., Loizou, L., Davletov, B., Brindle, K.M.. (2001). "Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent." Nature Medicine **7**: 1241–1244.

Zhou, J., Lal, B., Wilson, D.A., Laterra, J., van Zijl, P.C. (2003). "Amide proton transfer (APT) contrast for imaging of brain tumors." Magn. Reson. Med. **50**(6): 1120-6.

Zhou, J., van Zijl, P. (2006). "Chemical exchange saturation transfer imaging and spectroscopy." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **48**(2-3): 109-136.

ANNEXE

|

|

Annexe : Etude de toxicité par test MTT à 24h

Matériels :

Macrophages J774A.1 adhérents

Milieu RPMI 85% Penn Strep 5% FCS 10%

boîtes en polystyrène

Atmosphère: air, 95%; carbon dioxide (CO₂), 5%

Température: 37.0°C

Réactifs : MTT (ref M5655 SIGMA, Thiazolyl blue) ; PBS ; DMSO

Méthode :

Les macrophages de la lignée J774 sont cultivés dans les mêmes conditions avant d'être divisés en 3 populations différentes qui sont incubées pendant 24h en présence de différentes concentrations de :

- Complexe Eu(III)-DOTA
- Liposomes Egg PC 60% DSPE PEG 5% CHOL 35%
- Liposomes Egg PC 60% DSPE PEG 5% CHOL 35% encapsulant du complexe Eu(III)-DOTA à une concentration interne constante de 10 mM.

Le test MTT permet de révéler par colorimétrie la fraction de cellules viables. Le complexe Eu-DOTA libre ne présente aucune toxicité apparente jusqu'à une concentration de 10 mM. Par contre, lorsque le complexe est encapsulé dans les liposomes, la viabilité cellulaire diminue dès 0,1 mM compte-tenu de l'effet des lipides (Figure 1).

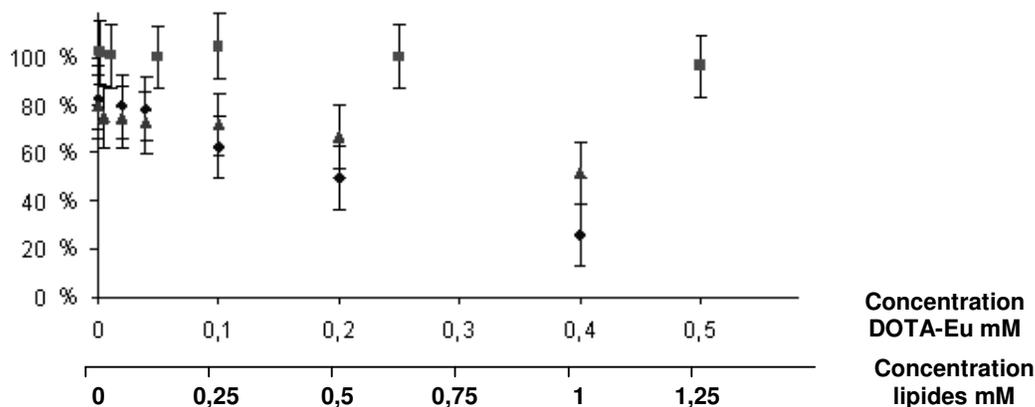


Figure 1 : viabilité cellulaire en % par rapport au nombre de cellules total en fonction de la concentration en complexe Eu-DOTA (■), en liposomes blancs (▲) et en liposomes chargés de complexe Eu-DOTA (◆). Les concentrations sont rapportées au volume total échantillon.

Ainsi, il semble que la structure liposome favorisant probablement une internalisation du complexe par les macrophages induise une baisse de viabilité plus prononcée que dans le cas où le complexe est présenté libre en solution. La conduite du test MTT au cours du temps (Figure 2) montre que l'effet de toxicité est prépondérant pendant les 10 premières heures d'incubation.

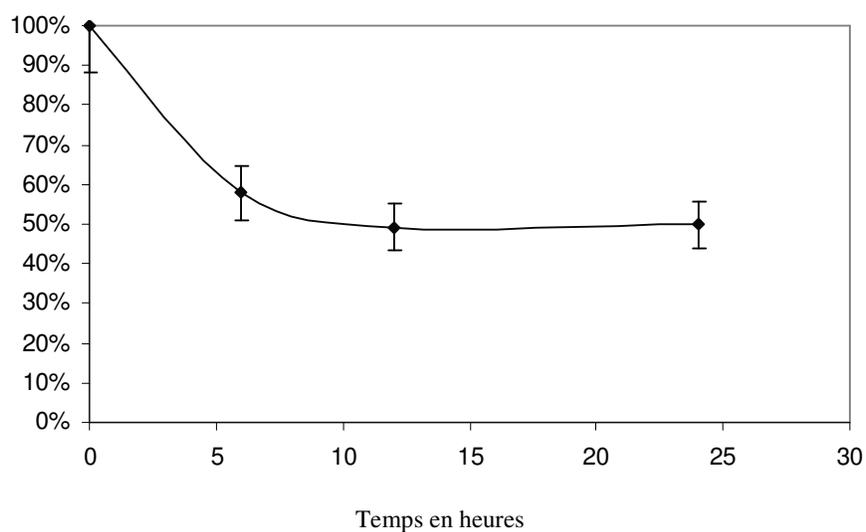


Figure 2 : viabilité cellulaire en % par rapport au nombre de cellules total en fonction du temps en présence de liposomes chargés en complexe Eu-DOTA à 0,5mM lipides et 0,2mM Eu-DOTA.

◆ Résumé :

L'effet des composés paramagnétiques sur le déplacement chimique des protons, c'est-à-dire sur leur fréquence de résonance propre, beaucoup utilisé en RMN conventionnelle, peut également être un outil de contraste en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) pour réaliser des images encodées en fréquence et donc sélectives selon la nature ou l'environnement de l'entité que l'on cherche à révéler. Cette approche fait intervenir le transfert d'aimantation par échange chimique de protons mobiles, en anglais « *Chemical Exchange Saturation Transfer* » (CEST). Le principe consiste à saturer sélectivement un signal donné de protons labiles appartenant à la structure-même de l'agent de contraste ou aux molécules d'eau qui lui sont transitoirement liées, à l'aide d'une impulsion radiofréquence bien choisie. L'image résulte alors de l'altération du signal des protons échangés. Le fonctionnement de la méthode repose sur l'existence effective de deux ensembles ou réservoirs de protons, celui correspondant aux protons associés à l'agent de contraste et celui représenté par le milieu environnant, autrement dit l'eau des tissus, ces deux réservoirs présentant une fréquence de résonance bien distincte.

Les systèmes LipoCEST, liposomes encapsulant un complexe paramagnétique de lanthanide, permettent une telle différenciation de deux réservoirs de protons constitutifs d'une part de l'eau contenue dans la cavité interne des liposomes (dont la fréquence de résonance est modifiée par l'agent paramagnétique) et d'autre part de l'eau présente à l'extérieur de la structure. La sensibilité de tels systèmes est principalement due au grand nombre de protons contenus dans le réservoir interne. La nature de l'agent paramagnétique joue un rôle déterminant dans la sélectivité de l'effet CEST et la nature de la membrane des liposomes dont la perméabilité permet un échange plus ou moins rapide entre les deux réservoirs d'eau doit être sélectionnée de manière à conduire à une réponse CEST efficace.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur une telle mise au point avec pour objectif l'optimisation de systèmes destinés à une IRM-CEST après administration par voie intraveineuse. De ce fait, le diamètre des liposomes a été fixé inférieur à 200 nm et leur surface recouverte de chaînes de poly(éthylène glycol) pour assurer leur future stabilité dans le compartiment sanguin. Le choix des agents de déplacement chimique à centre lanthanide, principalement des complexes de thulium, a été fixé à partir de leurs propriétés structurales et magnétiques. La méthodologie spécialement développée pour encapsuler ces entités au sein de liposomes de compositions lipidiques induisant des perméabilités membranaires distinctes a permis la mise au point d'un nouvel agent de contraste LipoCEST.

◆ Mots clés : CEST, paraCEST, LipoCEST, IRM, imagerie moléculaire, complexes de lanthanides, agents de contraste, liposomes.

◆ Laboratoire de Physico-Chimie des Systèmes Polyphasés

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex