



HAL
open science

Mise au point de microparticules polysaccharides injectables pour l'imagerie moléculaire de pathologies artérielles

Thomas Bonnard

► **To cite this version:**

Thomas Bonnard. Mise au point de microparticules polysaccharides injectables pour l'imagerie moléculaire de pathologies artérielles. Imagerie médicale. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2014. Français. NNT : 2014PA132015 . tel-01262288

HAL Id: tel-01262288

<https://theses.hal.science/tel-01262288>

Submitted on 26 Jan 2016

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.



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Sciences de l'ingénieur

Mention : Génie Biologique et Médical

Mise au point de microparticules polysaccharides injectables pour l'imagerie moléculaire de pathologies artérielles

Présentée et soutenue publiquement par

M. Thomas BONNARD

Le 17 Mars 2014

Directeur de thèse : Dr. Catherine LE VISAGE

Co-directeur de thèse : Dr. Cédric CHAUVIERRE

Membres du Jury

Dr. Vincent DIVE

Dr. Laurent RIOU

Pr. Anne PELLE

Pr. Denis VIVIEN

Pr. Jean-François DEUX

Dr. Catherine LE VISAGE

Dr. Cedric CHAUVIERRE

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au terme de cette thèse, je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail, de près ou de loin, qui m'ont aidé et qui m'ont soutenu tout au long de ces trois ans et demi.

Pour commencer, je tiens à exprimer ma gratitude envers Catherine Le Visage et Didier Letourneur pour m'avoir fait confiance dès notre premier entretien, pour m'avoir donné ma chance au sein du laboratoire de Bio-ingénierie Cardiovasculaire et pour m'avoir confié ce projet de recherche passionnant. Catherine, je te remercie aussi pour ton encadrement auquel je dois beaucoup, pour ton suivi assidu et l'habileté avec laquelle tu as su me guider. Je voudrais aussi faire part de ma reconnaissance à l'égard de mon Co-directeur, Cédric Chauvierre, dont les précieux conseils et la bienveillance ont également été essentiels. Je tiens à exprimer à Jean-Baptiste Michel ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son unité Inserm.

Je souhaite également remercier mes deux rapporteurs, Vincent Dive et Laurent Riou d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et je suis très reconnaissant à Denis Vivien, Jean-François Deux et Anne Pellé d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont ensuite à toutes ces personnes qui m'ont guidé dans mon projet et qui ont partagé spontanément toutes leurs connaissances. Je pense particulièrement à Mohammed Derkaoui qui m'a apporté une aide capitale sur le procédé qu'il a mis au point pour la synthèse des microparticules polysaccharides. Je pense également à Anne Petiet qui m'a grandement et continuellement aidé tout au long des expériences liées au radiomarquage des microparticules et à la scintigraphie. Je remercie aussi Benoît Ho Ti Noé, Véronique Ollivier, Clément Journé, Laure Bachelet-Violette, Liliane Louedec, Martin Rouer et Oualid Haddad qui ont pris volontiers de leur temps pour me transmettre leur savoir-faire.

Au cours de ce projet, j'ai eu la chance de travailler en étroite collaboration avec des praticiens hospitaliers de l'hôpital Xavier Bichat, et je tiens plus précisément à remercier le radiologue Jean Michel Serfaty et la cardiologue Brigitte Escoubet pour l'expertise et les précieux conseils qu'ils m'ont apportés.

J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes qui n'ont pas forcément participé à mon projet de thèse mais qui ont globalement rendu très agréables ces trois ans et demi au labo. J'entends par là l'ensemble de l'unité 698 et plus particulièrement Caroline Roques (ma voisine de bureau, merci d'avoir toujours si bien répondu à toutes mes petites questions !), Cécilia Delattre, Rachida Aïd, Denis Arnaud, Julia Ino, Gonord Yang, Elise Emond, Jean-Baptiste Gorgeu, Anne Beilvert, Frédéric Belotte, Louis Hatte, Maya Juenet, Bo Li et ceux que j'oublie !

Je souhaite enfin remercier chaleureusement l'ensemble de mes proches dont le soutien a également beaucoup compté pendant ces années de thèse. Un grand merci notamment à mes parents qui m'ont toujours aidé, y compris pour la relecture de ce manuscrit de thèse !

Table des matières

Liste des illustrations	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
INTRODUCTION	13
ETAT DE L'ART	15
1. Les pathologies artérielles	15
1.1. La physiologie de l'artère	15
1.2. Les principales pathologies des artères.....	16
1.2.1. L'athérosclérose	16
1.2.2. La thrombose artérielle	17
1.2.3. L'anévrisme	19
1.3. Prise en charge clinique.....	21
1.3.1. Diagnostic	21
1.3.2. Traitement.....	21
1.3.3. Limites des méthodes actuelles	23
2. L'imagerie moléculaire	24
<i>Pourquoi l'imagerie moléculaire ?</i>	24
2.1. Les modalités d'imagerie médicale et les agents de contraste.....	24
2.1.1. La tomodensitométrie	24
2.1.2. L'imagerie optique.....	25
2.1.4. La scintigraphie.....	25
2.1.5. L'IRM.....	26
2.1.3. L'échographie	27
2.2. Les cibles des pathologies artérielles	31
2.2.1. Les composants du sang.....	31
2.2.2. Les cibles moléculaires	31
2.2.3. La P-Sélectine	34

2.3. Les nano/microparticules au service de l'imagerie moléculaire	36
2.3.1. Les différents supports pour l'imagerie moléculaire	36
2.3.2. Les nano/microparticules, supports idéaux pour l'application clinique ?	38
2.3.3. Les différents types de nano/microparticules	40
3. Les polysaccharides pour la conception d'outils d'imagerie moléculaire	42
3.1. Conception d'un hydrogel polysaccharide	42
3.1.1. Le dextrane	42
3.1.2. Le pullulane	42
3.1.3. Un hydrogel réticulé	43
3.2. Les fucoïdanes	44
3.2.1. Des polysaccharides sulfatés	44
3.2.2. Les nombreuses propriétés du fucoïdane	45
3.2.3. Une forte affinité pour la P-Sélectine	46
Stratégie du projet :	47
TRAVAUX DE THESES	49
Contexte :	49
Procédé d'émulsion-réticulation	50
Réaction de réticulation	50
Emulsion de type eau dans huile	50
Synthèse de microparticules injectables	51
Fonctionnalisation et ajout d'agents de contraste	52
Projet 1. Microparticules polysaccharides radiomarquées ciblant l'AAA chez le rat : nouvel outil pour l'imagerie TEMP	55
Avant propos	55
Graphical Abstract	56
Abdominal Aortic Aneurysms Targeted by Functionalized Polysaccharide Microparticles: a new Tool for SPECT Imaging	57

Projet 2. Microparticules polysaccharides chargées en oxyde de fer (MPIO) présentant un comportement mimant les leucocytes imagé <i>in vivo</i> en IRM et en microscopie intravitale.....	80
Avant propos	80
Graphical Abstract	81
Leukocyte Mimetic Polysaccharide Microparticles tracked <i>in vivo</i> on Activated Endothelium and in Abdominal Aortic Aneurysm	82
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	105
CONCLUSION GENERALE	115
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXE : BREVET	125

Liste des illustrations

Figure 1 : Structure de la paroi artérielle	15
Figure 2 : Mécanismes de l'athérosclérose.....	17
Figure 3 : Formation du thrombus.....	19
Figure 4 : Physiopathologie de l'Anévrisme de l'Aorte Abdominale	20
Figure 5 : Imageries anatomiques de pathologies artérielles	21
Figure 6 : Méthodes chirurgicales pour le traitement des pathologies artérielles.....	23
Figure 7 : Molécules d'adhésion entre cellules endothéliales activées, plaquettes activées et leucocytes.....	32
Figure 8 : Les cibles de l'imagerie moléculaire aux différents stades de l'athérombose.	34
Figure 9 : Schéma des processus d'adhésions impliquant les sélectines.....	35
Figure 10 : Spécificité des ligands des sélectines.....	35
Figure 11 : Les différents types de nanoparticules	41
Figure 12 : Structures du dextrane et du pullulane	43
Figure 13 : Matrices pullulane dextrane.	44
Figure 14 : Structure des fucoïdanes.....	45
Figure 15 : Le fucoïdane comme outil d'imagerie moléculaire de la P-Sélectine.	46
Figure 16 : Réaction de réticulation des chaînes polysaccharides en un hydrogel.....	50
Figure 17 : Observation au MEB et distribution en tailles des microparticules.....	52
Figure 18 : Schéma des procédés de fabrication des 2 outils d'imagerie moléculaire	54
Figure 19 : 3 méthodes d'imagerie moléculaire TEMP de l'AAA chez le rat.....	106
Figure 20 : Etudes pharmacocinétiques des ^{99m} Tc-MP-Fucoïdane.....	109
Figure 21 : Microparticules polysaccharides échogènes (MP-PFOB-Fucoïdane).....	112

Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des modalités d'imagerie et de leurs apports dans les pathologies artérielles 30

Tableau 2. L'état d'avancement de l'imagerie moléculaire des pathologies artérielles 38

Liste des abréviations

¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-fluoro-deoxy-glucose
AAA	Anévrisme de l'aorte abdominale
ADP	Adénosine diphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
CML	Cellules musculaires lisses
CT	Computed tomography / Tomodensitométrie
EGF	Epidermal Growth Factor / Facteur de croissance épidermique
ESL-1	E-Selectin Ligand-1
EVAR	Endovascular aneurysm reparation / Réparation endovasculaire des anévrismes
FITC	Fluorescein isothiocyanate / Isothiocyanate de fluorescéine
FT	Facteur tissulaire
Gly-CAM-1	Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1
GP	Glycoprotéine
HTA	Hypertension artérielle
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 / Protéine d'adhésion intercellulaire-1
IFN	Interféron
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDL	Low-density lipoprotein / Lipoprotéine de basse densité
LEE	Limitante élastique externe
LEI	Limitante élastique interne
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MEB	Microscope électronique à balayage
MMP	Métalloprotéinases matricielles
MPIO	Micro-sized particle of iron oxide
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NIRF	Near Infrared Fluorescence / Fluorescence proche infrarouge
PEG	Polyéthylène glycol
PFOB	Bromure de perfluorooctyle
PMSI	Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
protéines CR	Complement regulatory protein
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

SLe-X	<i>Sialyl lewis X</i>
SPR	<i>Résonance plasmon de surface</i>
STMP	<i>Trimétaphosphate de sodium</i>
TEMP	<i>Tomographie par émission de positon</i>
TEP	<i>Tomographie par émission de positon</i>
TGF	<i>Transformal growth factor / Facteur de croissance transformant</i>
TIL	<i>Thrombus intraluminal</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator / Activateur tissulaire du plasminogène</i>
USPIO	<i>Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide</i>
VCAM-1	<i>Vascular-cell adhesion molecule / Protéine vasculaire d'adhésion cellulaire</i>
vWF	<i>Facteur de von Willebrand</i>

INTRODUCTION

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. D'après les statistiques 2013 de l'organisation mondiale de la santé [1], elles sont responsables de 30 % des décès enregistrés au cours de l'année 2008 dans le monde, et de 50 % en Europe [2].

Actuellement, les méthodes d'imagerie couramment utilisées en clinique n'apportent que des informations morphologiques et anatomiques sur le cœur et la paroi vasculaire et ne permettent qu'un diagnostic limité. Un des enjeux actuels de l'imagerie médicale est de développer des dispositifs injectables capables de cibler les premiers signes de ces pathologies afin d'améliorer, d'une part, leur diagnostic précoce et de mieux évaluer, d'autre part, leur évolution de façon non invasive. Ces cibles sont des protéines membranaires ou autres molécules dont la présence est identifiée comme étant liée à un état pathologique et cette stratégie est appelée **imagerie moléculaire**.

Des précédents travaux de notre laboratoire ont démontré qu'un polysaccharide sulfaté d'origine végétale, le **fucoïdane**, avait une forte affinité pour la **P-Sélectine**, qui est une protéine d'adhésion cellulaire exprimée à la surface des plaquettes et des cellules activées et constitue donc une cible moléculaire intéressante pour l'imagerie moléculaire des pathologies artérielles. L'objectif de mon projet de thèse est de mettre au point, caractériser et valider *in vitro* puis *in vivo* des outils d'imagerie moléculaire des pathologies artérielles basés sur un support associant du fucoïdane et des **agents de contraste**. Après avoir formulé des **microparticules polysaccharides** à partir d'un procédé d'émulsion-réticulation, j'ai développé 2 outils de diagnostic propres à 2 modalités d'imagerie médicale différentes en associant à ce support microparticulaire des agents de contraste adaptés.

La première partie de ce manuscrit de thèse est consacrée à une étude bibliographique des domaines de recherche couverts par ce projet de thèse. Après avoir résumé l'état des connaissances actuel sur les pathologies artérielles, je décrirai l'ensemble des techniques médicales utilisées pour leur diagnostic. J'aborderai alors l'imagerie moléculaire et les différentes stratégies rencontrées dans cet axe de recherche. Je présenterai enfin les polysaccharides avec lesquels nous avons développé les 2 outils d'imagerie moléculaire.

La deuxième partie présentera les 2 projets menés pendant mon doctorat, correspondant aux 2 outils d'imagerie moléculaire développés.

- Au cours du 1^{er} projet, j'ai dans un premier temps démontré que les microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane présentent une forte affinité pour des plaquettes activées, *in vitro* en cytométrie en flux. Puis, afin d'obtenir un outil d'imagerie moléculaire pour la tomodensitométrie par émission monophotonique (TEMP), j'ai développé un radio-marquage au technétium 99m des microparticules fonctionnalisées. J'ai alors validé *in vivo* l'efficacité de ce nouvel outil sur un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) chez le rat.

- Le 2nd projet s'est focalisé sur le développement d'un outil d'imagerie moléculaire pour l'IRM. J'ai obtenu des MPIOs (*microparticles of iron oxide*) en ajoutant des nanoparticules de fer dans la phase aqueuse du procédé d'émulsion-réticulation. J'ai ensuite validé les propriétés de ciblage de ces microparticules sur un modèle d'endothélium activé chez la souris et les propriétés d'imagerie sur le modèle d'AAA chez le rat.

La troisième et dernière partie de ce manuscrit sera consacrée à une analyse détaillée de l'ensemble des résultats obtenus avec les 2 outils d'imagerie moléculaire. Nous ferons le point sur l'avancée de chaque projet et nous tâcherons de déterminer où nous nous situons par rapport aux autres outils de diagnostic en cours de développement et par rapport à l'application clinique. Nous examinerons les avantages et les inconvénients de chaque modalité d'imagerie et nous aborderons un 3^{ème} outil d'imagerie moléculaire en cours de développement pour une 3^{ème} modalité : l'échographie. Enfin, nous discuterons de l'avenir de ces microparticules en tant qu'outil de théranostic (thérapie + diagnostic). Nous expliquerons en quoi il pourrait être intéressant de combiner à ces microparticules polysaccharides des molécules thérapeutiques qui seraient alors vectorisées directement vers la paroi artérielle pathologique.

ETAT DE L'ART

1. Les pathologies artérielles

1.1. La physiologie de l'artère

Les artères sont les vaisseaux qui conduisent le sang du cœur aux autres tissus et organes. Chez l'homme, leur diamètre peut varier de plusieurs dizaines de micromètres pour les plus petites artérioles, à environ 2,7 cm pour l'aorte. Elles sont caractérisées par une paroi plus épaisse et plus rigide que celle des veines et sont ainsi adaptées aux variations de pression du sang issu des ventricules cardiaques.

La paroi artérielle est schématisée Figure 1. Elle est constituée de 3 tuniques différentes.

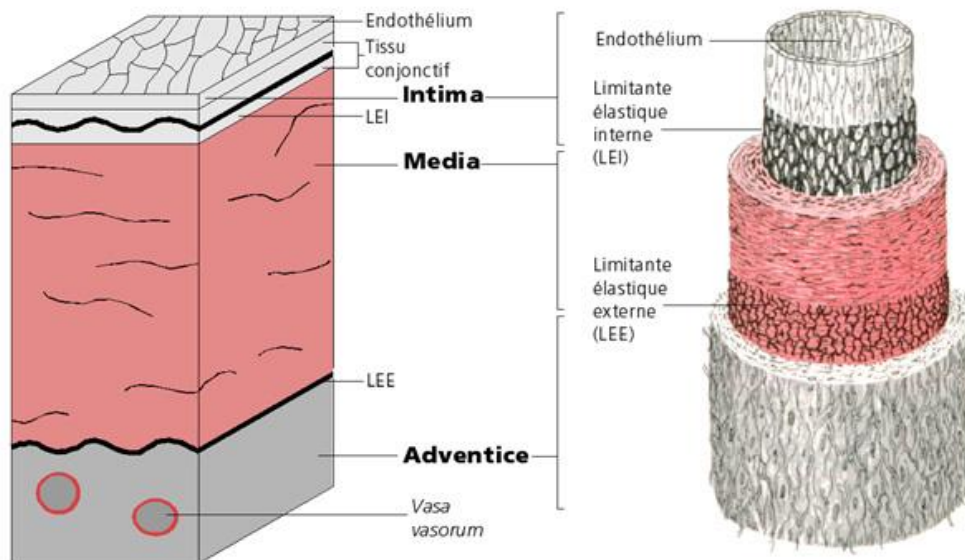


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle [3]

- **L'intima** est la tunique la plus fine et la plus interne de la paroi artérielle. Elle est composée d'une monocouche étanche de cellules épithéliales formant l'endothélium et d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique. L'endothélium, en contact direct avec le sang, est le lieu d'activités métaboliques et joue un rôle thromborésistant et immunitaire.
- **La média** est la tunique intermédiaire et la plus épaisse. Elle est séparée de l'intima et de l'adventice par d'épaisses lames d'élastine appelées respectivement limitante élastique interne (LEI) et limitante élastique externe (LEE). Elle est constituée d'un large empilement concentrique de cellules musculaires lisses (CML) associées à une matrice extracellulaire composée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de polysaccharides acides appelés muco-polysaccharides. Ces cellules musculaires assurent les fonctions de vasoconstriction et de vasodilatation.

- **L'adventice** est la tunique la plus externe. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé et d'une enveloppe qui assure l'ancrage de l'artère aux structures voisines. Elle est riche en collagène, fibres élastiques et comprend des fibroblastes et des adipocytes. Elle est irriguée par des microvaisseaux (*vasa vasorum*) qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média. L'adventice intervient également dans la vasoconstriction puisqu'elle possède un réseau de nerfs vasomoteurs qui rejoint les fibres musculaires lisses de la média et parfois même des fibres musculaires lisses longitudinales.

1.2. Les principales pathologies des artères

Elles concernent principalement les artères coronaires, carotidiennes et des membres inférieurs. Il est connu aujourd'hui que les principaux facteurs de risques sont liés à l'âge, à une mauvaise hygiène de vie (tabagisme, alimentation riche en cholestérol, manque d'exercice, hyper-tension artérielle) et à des antécédents génétiques. Le principal dysfonctionnement des artères rencontré est **l'athérosclérose**. Cette pathologie induit un rétrécissement progressif de l'artère appelé **sténose** artérielle. Elle est aussi la principale cause des **anévrismes** (dans 90 % des cas), dont la rupture peut entraîner une hémorragie mortelle, et de la **thrombose artérielle** qui entraîne des accidents ischémiques graves.

1.2.1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est liée à une accumulation de lipides et autres composants cellulaires sous la couche endothéliale de l'artère. Tous les mécanismes de sa physiopathologie ne sont pas encore bien compris mais nous pouvons toutefois expliquer en partie sa formation qui est en plusieurs étapes :

1 – Le tout premier phénomène identifié déclenchant la pathologie est l'accumulation de **lipoprotéines de basse densité** (LDL) dans l'intima. Ces LDL sont alors oxydées et entraînent de nombreux phénomènes biochimiques dont notamment l'expression de plusieurs protéines d'adhésion leucocytaires et endothéliales. Ce dysfonctionnement, qui s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale suscite alors le recrutement de **leucocytes** (principalement des **monocytes** et des **lymphocytes T**) à la surface de l'intima puis leur migration dans la paroi artérielle (Figure 2a).

2 – Une fois dans la paroi, les monocytes se transforment en **macrophages** et une partie d'entre eux va se charger en LDL oxydées pour au final former des **cellules spumeuses**. L'accumulation des monocytes, des LDL, des cellules spumeuses et des lymphocytes T forme ce qu'on appelle une **strie lipidique**. En parallèle, des CML migrent à partir de la média, traversent la LEI et prolifèrent dans l'intima. A ce stade débute aussi un phénomène d'agrégation plaquettaire qui contribue à l'obstruction du flux sanguin (Figure 2b).

3 – L'activation de ces cellules stimule la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance qui entretiennent le développement de la strie lipidique. Les CML sécrètent du collagène, des fibres élastiques et des protéoglycanes qui vont petit à petit former

une **chape fibreuse** recouvrant un agrégat de débris cellulaires variés, de tissu nécrotique et de lipides (Figure 2c).

4 – Les macrophages toujours activés secrètent des **métalloprotéinases matricielles (MMP)** et autres enzymes protéolytiques qui vont dégrader la chape fibreuse jusqu'à sa rupture. A ce niveau, ou parfois au niveau de microvaisseaux au cœur de la plaque, le sang entre alors en contact avec des éléments thrombogènes, ce qui aboutit rapidement à la formation d'un **thrombus** et au final à l'occlusion de l'artère (Figure 2d).

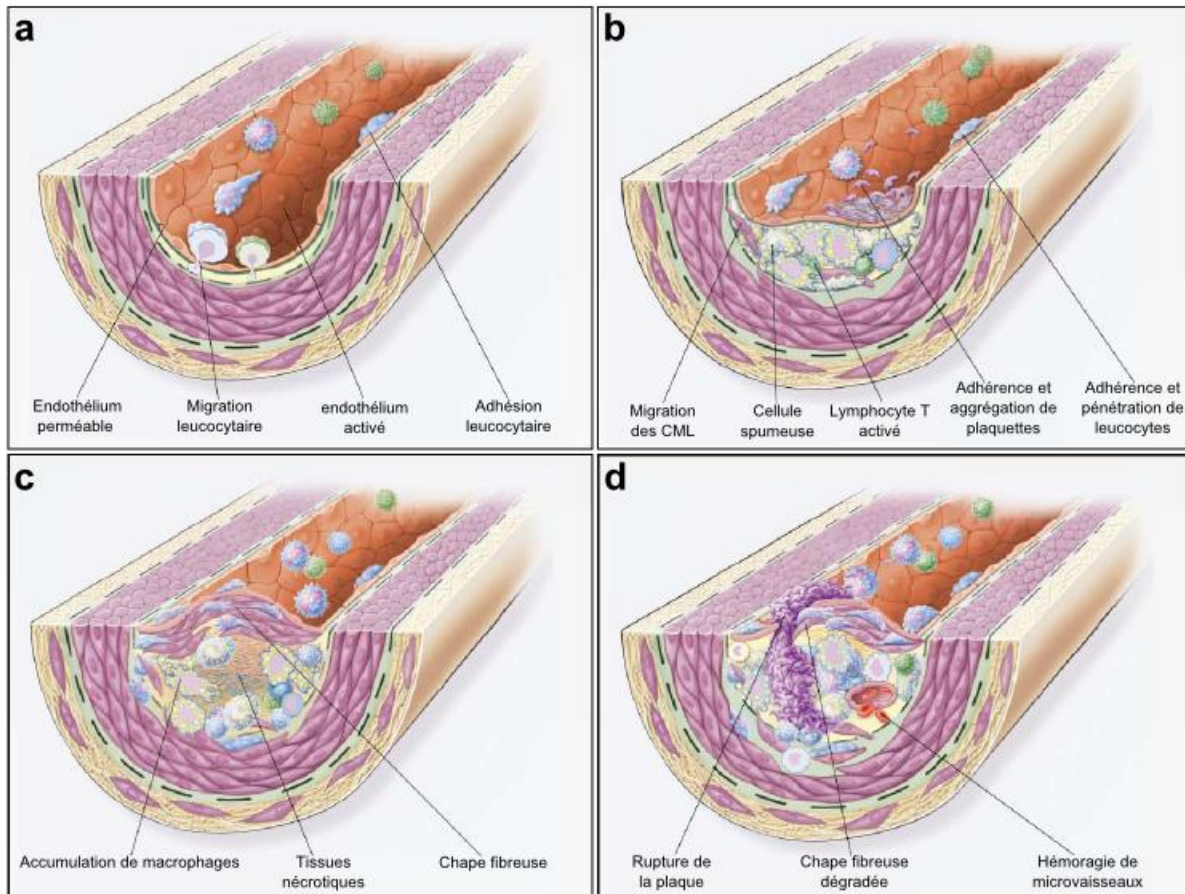


Figure 2 : Mécanismes de l'athérosclérose [4].

1.2.2. La thrombose artérielle

La thrombose correspond à la coagulation du sang dans une artère formant ainsi un caillot, appelé **thrombus**, susceptible de provoquer l'occlusion de l'artère où il se forme puis d'entraîner un accident ischémique grave lorsque le thrombus se détache de la paroi et migre dans le flux sanguin (Figure 3). Parmi ces accidents graves, les principaux sont **l'infarctus**, **l'embolie pulmonaire** et **l'accident vasculaire cérébral (AVC)** qui surviennent lorsque le thrombus bouche la circulation sanguine irriguant le cœur, les poumons ou le cerveau respectivement. On rencontre la thrombose artérielle principalement dans le cas de l'athérosclérose et de l'anévrisme.

La thrombose artérielle est initiée par une déchirure de l'endothélium qui va, par le biais de deux voies de signalisation distinctes, déclencher **l'activation et l'adhésion plaquettaire** [5].

- La première voie de signalisation survient lorsque le **collagène** subendothélial entre en contact avec le sang. L'interaction de la glycoprotéine (GP) VI et de la glycoprotéine Ib-V-IX, présentes à la surface des plaquettes, avec respectivement le collagène et le facteur de von Willebrand (vWF) induisent l'adhésion plaquettaire au niveau de la lésion.
- La seconde voie de signalisation fait intervenir le **facteur tissulaire (FT)** qui est une protéine transmembranaire présente sur les cellules de la média et de l'adventice normalement absente du secteur vasculaire [6]. Au contact du sang, les FT engendrent une voie de signalisation qui génère de la thrombine, une sérine protéase qui joue un rôle central dans la thrombose et qui dans un premier temps active les plaquettes.

Une fois que les plaquettes sont adhérentes à la paroi artérielle ou à la surface du thrombus grandissant, elles subissent une série de modifications morphologiques et biochimiques qui auto-entretiennent les phénomènes d'activation et d'adhésion plaquettaire et conduisent à la formation d'un **agrégat plaquettaire** [7, 8]. En effet, les plaquettes activées :

- expriment les formes activées des **intégrines** $\alpha_2\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui, en plus de permettre aussi l'adhésion au collagène, vont pouvoir se lier à leurs homologues présents à la surface des autres plaquettes activées.
- relarguent de **l'adénosine diphosphate (ADP)**, de la **sérotonine** et de la **thromboxane A2** qui sont tous les 3 des agonistes capables à leur tour d'activer d'autres plaquettes.

En parallèle, la **thrombine** transforme le **fibrinogène**, protéine circulante du plasma sanguin, en filaments de **fibrine** insolubles qui vont s'agréger dans le thrombus.

Il est intéressant de noter que la part de fibrine et de plaquettes dans un thrombus est très variable, en particulier suivant les conditions hémodynamiques [7]. Ainsi, le recrutement des plaquettes a lieu préférentiellement dans les régions où le flux sanguin est élevé et perturbé, induisant alors des thrombi riches en plaquettes, tandis que les régions de faible flux favorisent la génération de fibrine et donc la formation de thrombi riches en fibrine. La thrombose artérielle est par conséquent typiquement riche en plaquettes et pauvre en fibrine.

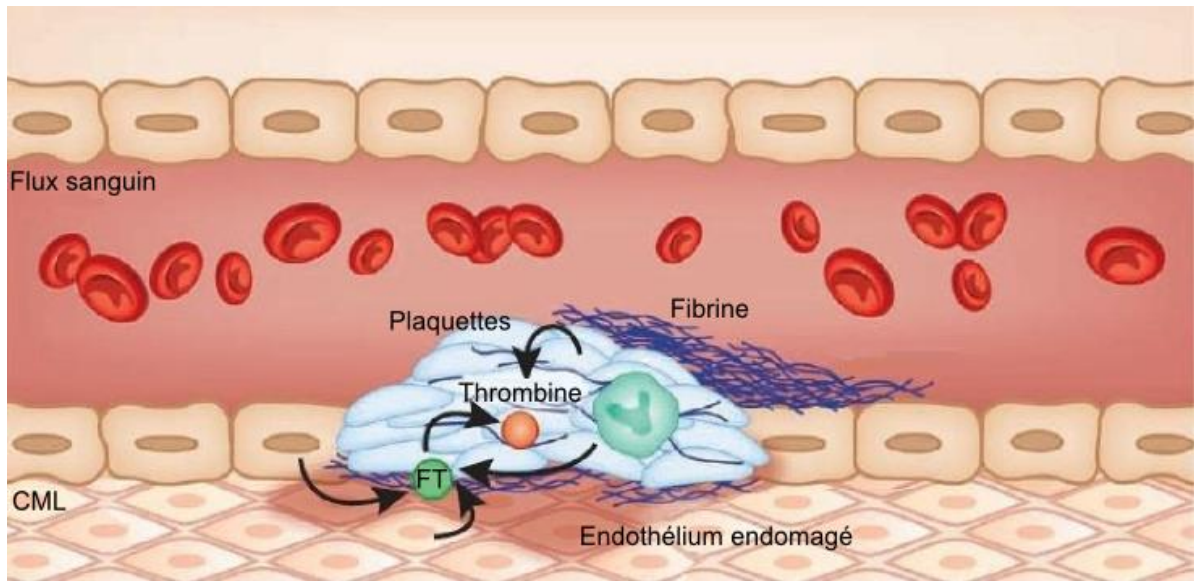


Figure 3 : Formation du thrombus [7].

1.2.3. L'anévrisme

Il s'agit d'une dilatation progressive de la paroi artérielle pouvant entraîner sa rupture. L'ensemble des artères peut être touché et la gravité dépend de l'artère concernée. Un anévrisme est défini à partir d'une dilatation de 50 % par rapport à l'artère de référence. Pour **l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA)** qui représente 85 % des cas d'anévrisme et qui affecte 5 % de la population des pays développés, la rupture conduit à une grave hémorragie et entraîne plus de 4 fois sur 5 la mort du patient [9]. Cette dilatation a également des conséquences sur le flux sanguin, ce qui contribue à la formation d'un **thrombus intra anévrisimal**.

L'AAA est en général considéré comme une complication de l'athérosclérose due à une dégénérescence progressive de la paroi artérielle. Plus précisément, on sait aujourd'hui que la formation et la progression des AAA sont principalement dues à un **stress oxydant**, à une **inflammation** de la paroi et à une forte activité protéolytique des MMPs entraînant la dégradation de **l'élastine** et du **collagène** présents dans les tissus de la paroi artérielle [10].

L'inflammation est un processus important dans la formation de l'AAA et l'augmentation locale du stress oxydant est connue comme pouvant en être la conséquence et parfois même la cause [11, 12]. Une fois initié, le processus inflammatoire induit, comme dans le cas de l'athérosclérose, le recrutement et l'infiltration des leucocytes.

Une cascade de mécanismes biochimiques est alors enclenchée (Figure 4) :

- Les cellules inflammatoires, les CML et les fibroblastes libèrent dans les tissus de l'AAA des MMPs qui ont des propriétés élastolytiques [13].
- La production du **facteur de croissance transformant (TGFβ1)** est réduite, ce qui stimule moins les CML pour la sécrétion de la **cystatine C**, responsable de la régulation des

cystéines protéases [14]. Il y a donc au final une plus grande quantité de cystéines protéases, enzymes qui catalysent la dégradation de l'élastine et du collagène.

- Les lymphocytes et les macrophages sécrètent des **cytokines proinflammatoires** variées qui contribuent par le biais de diverses voies de signalisation au développement de la pathologie. IFN- γ par exemple, sécrété par les macrophages et les lymphocytes T, régule la production de collagène par les CML (source principale de collagène dans la paroi) ; le collagène dégradé ne sera donc pas renouvelé [15].
- Les **neutrophiles** stimulent l'activité protéolytique des MMP-9 en sécrétant de la gélatinase de neutrophile associée à la lipocaline (NGAL) [16].
- La dégradation des composants de la matrice extracellulaire facilite la croissance de microvaisseaux dans la média, ce qui ajoute une voie d'entrée possible pour les cellules inflammatoires [17].
- **L'interleukine-6 (IL-6)** sécrétée par les macrophages auto-entretient la stimulation des leucocytes [18].
- Le processus inflammatoire déclenche une sécrétion de thrombine qui induit la formation d'un **thrombus intraluminal (TIL)**.

Tous ces phénomènes soutiennent **l'activité protéolytique** qui consiste concrètement en la dégradation du collagène et de l'élastine dans la média. Cela induit peu à peu l'affinement, la dilatation puis au final la rupture de la paroi artérielle.

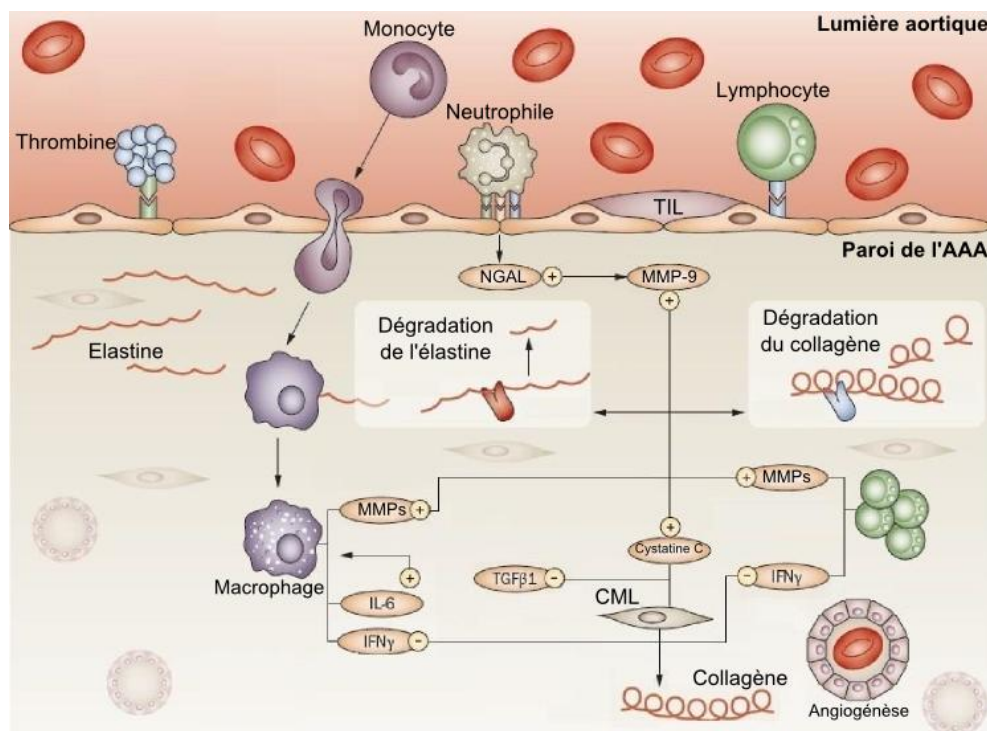


Figure 4 : Physiopathologie de l'Anévrisme de l'Aorte Abdominale (Schéma adapté de [19])

1.3. Prise en charge clinique

1.3.1. Diagnostic

Avant que l'**accident athéro-thrombotique** ne survienne, la grande majorité de ces pathologies sont asymptomatiques.

Il est tout de même possible, aujourd'hui, de détecter ces pathologies en clinique à un stade tardif grâce à des méthodes d'**imagerie médicale** non invasives telles que l'échographie, l'échographie doppler, scanner ou encore IRM (Figure 5). Ces différentes techniques d'imagerie seront décrites plus en détail dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Il est connu également que ces pathologies sont favorisées par l'âge, le tabagisme, les antécédents familiaux, le diabète ou les troubles circulatoires du type hypertension artérielle (HTA) ou arythmie. Un suivi systématique des populations à risque est ainsi envisagé pour le dépistage des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) en France et il se pratique déjà dans certains pays comme les Etats-Unis et le Royaume-Uni [20].

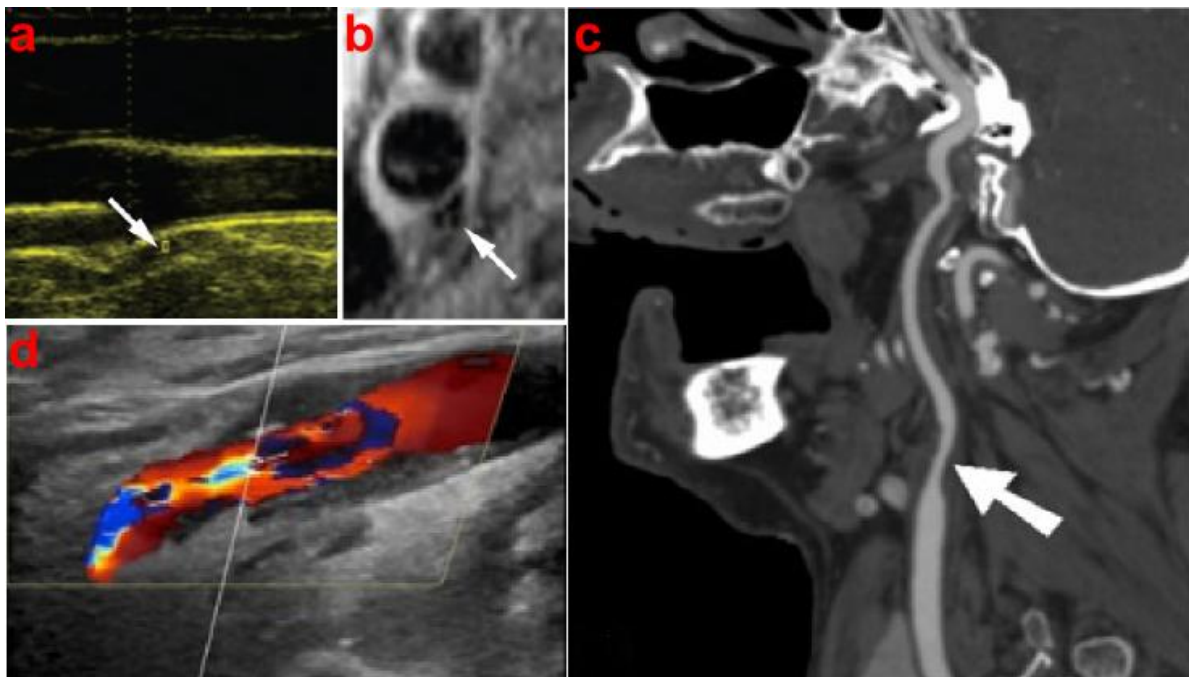


Figure 5 : Imageries anatomiques de pathologies artérielles [21, 22]. Plaque d'athérosclérose imagée par échographie (a), anévrisme imagé par IRM (b), sténose de l'artère carotidienne imagée par scanner (c) et par échographie doppler (d).

1.3.2. Traitement

Un premier type de traitement consiste en l'administration de médicaments qui empêchent la formation, l'extension des thromboses ou qui favorisent leur disparition. Il s'agit principalement de médicaments lourds qui sont étroitement associés à des complications hémorragiques.

Les **vasodilatateurs** sont des substances qui décontractent les CML entraînant une dilatation des vaisseaux sanguins et limitant ainsi les risques de sténose.

Les **hypolipémiants** sont administrés lorsque l'on détecte un taux de cholestérol anormalement élevé. Ils visent à diminuer les LDL circulant dans le sang et réduisent ainsi les risques d'athérosclérose.

Les **antiplaquettaires** et les **anticoagulants** sont des médicaments qui limitent la thrombose en intervenant dans les voies de signalisation de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires. Les plus courants sont les héparines et les antivitamines K.

Les **thombolytiques** ou **fibrinolytiques** sont des molécules qui accélèrent la lyse des thrombi en favorisant la transformation du plasminogène en plasmine, enzyme dégradant la fibrine. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), commercialisé sous une forme recombinante dénommée Actylise[®], est actuellement le seul médicament de ce type utilisé en clinique [23].

Dans le cas de détection d'une pathologie à un stade plus avancé, on a généralement recours à la **chirurgie vasculaire**. Plusieurs méthodes sont alors pratiquées. Certaines opérations comme l'**angioplastie** ou la **réparation endovasculaire des anévrismes (EVAR)** sont peu invasives dans la mesure où une petite incision pour insérer un cathéter suffit. D'autres pratiques tels que le **pontage artériel**, la **thrombectomie** et l'**endartériectomie** nécessitent une opération chirurgicale permettant une interaction directe avec la pathologie et sont donc bien plus invasives [24].

L'**angioplastie** consiste à introduire via une petite incision au niveau du bras ou de l'aîne un cathéter dont l'extrémité est munie d'un ballonnet. Une fois au niveau de la plaque, le ballonnet est gonflé comprimant ainsi le site rétréci de l'artère, ce qui contribue à éliminer la plaque d'athérome. Cette opération est souvent accompagnée de la pose d'un petit tube grillagé métallique appelé **stent** qui sert alors d'armature pour maintenir l'ouverture au niveau de la sténose de manière permanente (Figure 6a).

L'implantation de stent est aussi utilisée pour traiter les anévrismes. Mais dans ce cas on utilise des stents couverts, appelés **endoprothèses**, si bien qu'une fois posé dans l'anévrisme le sang cesse de passer dans l'artère proprement dite mais circule dans l'endoprothèse. La paroi artérielle de l'anévrisme est alors déconnectée de la circulation et l'anévrisme ne présente plus de risque de rupture. La pose de ces endoprothèses se fait également via un cathéter et est appelée **réparation endovasculaire des anévrismes (EVAR)** (Figure 6b).

Le **pontage artériel** est une technique utilisée dans les cas de sténose destinée à remplacer un ou une partie du vaisseau défaillant en interposant un tube synthétique ou un fragment de veine pour réunir l'extrémité du vaisseau en amont de la pathologie à l'extrémité en aval. Le sang circule alors de nouveau normalement en contournant la pathologie (Figure 6c).

La **thrombectomie** et l'**endartériectomie** sont des interventions chirurgicales qui consistent à ouvrir l'artère bouchée puis à enlever le thrombus oblitérant (Figure 6d). La thrombectomie peut également se pratiquer par cathétérisme.

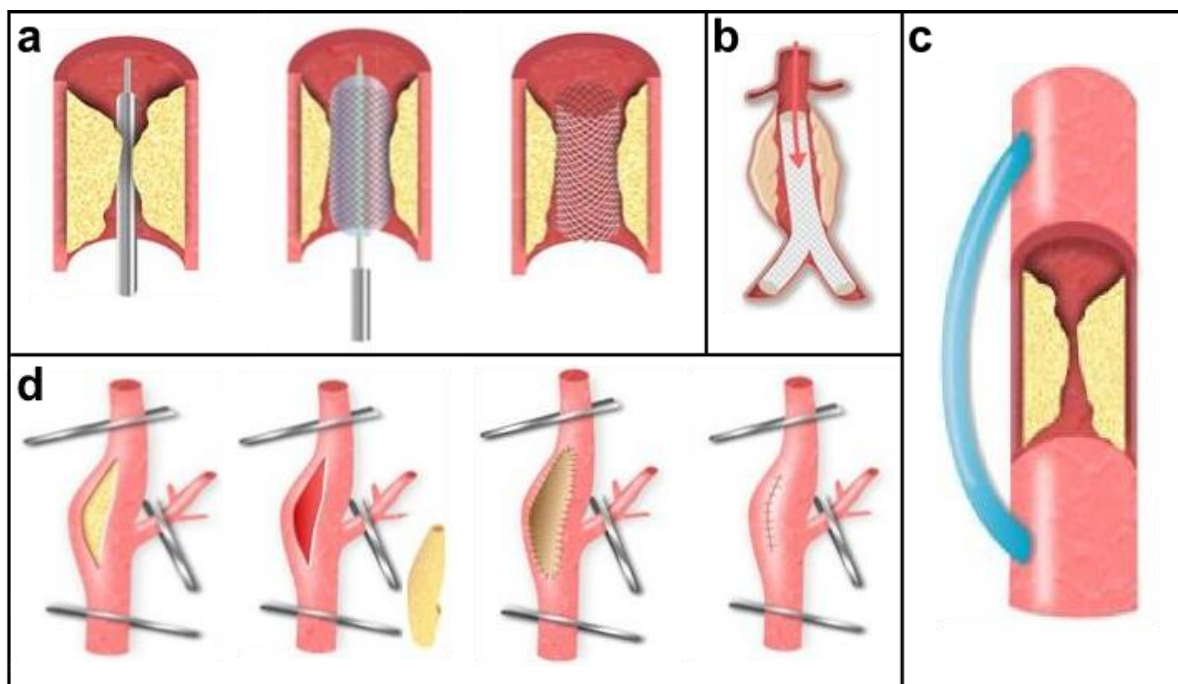


Figure 6 : Angioplastie (a), réparation endovasculaire d'un anévrisme (b), pontage (c), endartériectomie (d) [24].

1.3.3. Limites des méthodes actuelles

Bien que ces techniques aient permis d'améliorer la détection et la prise en charge des pathologies artérielles, le nombre de décès reste encore très important.

En terme de diagnostic, les méthodes actuelles ne permettent pas d'agir suffisamment tôt. Certes, les différentes modalités d'imagerie médicale décrites permettent à l'homme d'observer les dysfonctionnements de l'organisme au niveau anatomique mais bien souvent, l'anomalie anatomique n'est que le **signe clinique tardif** des pathologies. Dans le cas des pathologies artérielles par exemple, la sténose ou la dilatation de l'artère ne sont que la conséquence de l'athérosclérose et de l'anévrisme respectivement. Ainsi, il n'est possible avec de telles méthodes que de diagnostiquer ces pathologies à des stades relativement avancés, c'est-à-dire proche de **la rupture de l'anévrisme** ou de **l'accident ischémique**. Les cas non diagnostiqués correspondent d'ailleurs à des taux de décès très élevés. Pour l'AAA par exemple, en France, les données 2010 du Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information (PMSI) révèlent que le patient ne décède après une opération que dans 3 % des cas si l'AAA n'est pas rompu contre 34 % des cas si l'AAA est rompu, ce qui signifie que le diagnostic avant rupture permet de réduire considérablement la mortalité liée à cette pathologie [20].

Pour cette raison, un important axe de la recherche médicale sur les pathologies artérielles, axe dans lequel s'inscrit ce projet de thèse, vise à développer de nouveaux outils d'imagerie non invasifs afin d'améliorer la détection de ces pathologies, en permettant notamment un diagnostic aux stades précoces.

2. L'imagerie moléculaire

Pourquoi l'imagerie moléculaire ?

L'**imagerie moléculaire** a pour objectif d'améliorer les modalités d'imagerie classique et d'affiner le diagnostic en caractérisant les processus biologiques à l'échelle cellulaire et/ou moléculaire [25]. En couplant un **agent de contraste** à un **agent de ciblage**, cette stratégie va permettre :

1) Un diagnostic des pathologies aux stades les plus précoces. En ciblant les molécules clés présentes aux tous premiers stades de l'athérosclérose, de la thrombose artérielle ou de l'anévrisme, les agents de contraste vont permettre le diagnostic en imagerie de la pathologie alors qu'aucune déformation anatomique n'est encore visible.

2) Une caractérisation moléculaire de l'artère observée. En mettant en évidence la présence de certaines molécules, ces techniques vont apporter une meilleure compréhension de l'état physiopathologique de l'artère imagée et permettre ainsi de mieux prédire son évolution.

2.1. Les modalités d'imagerie médicale et les agents de contraste

L'**imagerie médicale** regroupe des techniques qui permettent d'observer l'intérieur du corps humain de façon non invasive en mesurant la réponse de l'organisme à différents phénomènes physiques. Plusieurs modalités d'imagerie ont ainsi été développées se basant sur la radioactivité, sur la résonance magnétique nucléaire, sur la réflexion d'ondes ultrasonores, d'ondes lumineuses ou encore sur l'absorption des rayons X.

2.1.1. La tomodesitométrie

Appelée en anglais, **CT-Scan** (Computed Tomography Scan), la **tomodesitométrie** repose sur l'**absorption des rayons X**, plus ou moins importante suivant le tissu. Le patient est placé dans un appareil que l'on appelle communément **scanner médical**. Des émetteurs à rayon X tournent autour du patient en même temps que des récepteurs placés en face de chaque émetteur. L'intensité des rayons X ayant traversé l'organisme est mesurée par les récepteurs. Un contraste plus ou moins fort est alors associé à cette intensité qui dépend du niveau d'absorption des tissus rencontrés. Après une série de coupes et une reconstruction de ces données, une image en 2D ou 3D de l'organisme est obtenue.

Cette modalité connaît récemment une amélioration avec la tomographie par faisceau d'électrons, appelée **scanner ultrarapide**, qui s'est avérée efficace pour mesurer des très petites quantités de calcium et permet donc d'affiner le diagnostic de l'athérosclérose en identifiant le degré de calcification [26].

L'utilisation d'un agent de contraste est également souvent pratiquée avec cette méthode. Il est courant d'injecter dans la circulation sanguine du patient au préalable un **produit iodé**, fortement opaque aux rayons X, si bien que les vaisseaux sont mis en évidence lors du scan.

Cependant, l'imagerie moléculaire est quasi absente en tomodensitométrie et très peu d'outils de diagnostic radio-opaques sont développés.

2.1.2. L'imagerie optique

Ces techniques sont basées sur la pénétration dans les tissus de la lumière qui peut être produite par **fluorescence** ou par **bioluminescence**.

En imagerie optique par **bioluminescence**, on détecte la lumière émise lors d'une réaction enzymatique bien particulière : la dégradation de la **luciférine** par la **luciférase**. Cette technique émergente offre ainsi la possibilité d'imager *in vivo* l'expression du gène de la luciférase. Son intérêt est toutefois limité à cette application et, nécessitant une modification génétique, elle n'est pas envisageable en clinique.

Pour l'imagerie optique par fluorescence, on excite avec un faisceau lumineux de longueur d'onde appropriée un **fluorophore** ; cette cible fluorescente émet de la lumière à une longueur d'onde différente qui va être détectée et ainsi permettre l'imagerie. Pour pénétrer dans les tissus au-delà de quelques millimètres, il faut se placer dans la fenêtre de longueur d'ondes du **proche infrarouge** (de 700 à 900 nm) d'où le nom anglais de la modalité d'imagerie : **Near Infrared Fluorescence Imaging** (NIRF). Cette méthode est émergente et n'est pas encore utilisée en clinique. Elle est de plus limitée, même dans la fenêtre du proche infrarouge, par une faible pénétration dans les tissus et sera donc réduite à l'étude de sites proches de la surface de la peau ou accessibles par endoscopie. Toutefois, une étude clinique sur la détection de cancers du sein en imagerie NIRF présente des résultats initiaux encourageants [27].

Elle représente également un outil puissant en préclinique pour l'imagerie moléculaire chez le petit animal et de plus en plus d'agents de contraste sont développés à partir de fluorophores tels que le **vert d'indocyanine**, la **cyanine 5.5** ou encore à partir de **quantum dots** qui sont des nanocristaux pouvant être détectés de la même façon [28].

2.1.4. La scintigraphie

La **scintigraphie** repose sur la détection de rayonnements fournis par un **radio-isotope** injecté au préalable dans l'organisme. Le radio-isotope est couplé à une molécule fonctionnelle dont on veut étudier la répartition pour former un **radio-traceur**. Les photons gamma émis par la désintégration des noyaux radioactifs sont détectés par une gamma-caméra et un traitement des données permet de reconstituer l'origine spatiale des rayonnements. On obtient au final une reconstruction 3D de la répartition spatiale du radio-traceur dans l'organisme.

Cette modalité comprend la **tomographie d'émission monophotonique** (TEMP) et la **tomographie par émission de positons** (TEP). Afin de fournir le contexte anatomique des images obtenues, ces deux techniques sont souvent couplées à une image obtenue en **tomodensitométrie**.

La TEMP nécessite de travailler avec un radio-isotope émetteur de photons gamma à choisir parmi le technétium 99m, l'iode 123, l'iode 131, l'indium 111 ou le thallium 201. Pour déterminer l'origine

spatiale de l'émission, des collimateurs en plomb filtrent les photons et seuls ceux qui ont un angle d'incidence bien défini atteignent le détecteur. Cette méthode permet de détecter 0,01 % des photons émis et offre une moins bonne résolution géométrique que la TEP mais elle reste moins coûteuse et plus largement répandue dans le milieu hospitalier [29].

La TEP requiert un radio-isotope différent, émetteur de positons, comme le fluore 18, le carbone 11, l'azote 13, l'oxygène 15, le gallium 68 ou encore le rubidium 82. Dans ce cas, les positons émis par les radio-traceurs vont s'annihiler avec un électron de l'organisme en produisant 2 photons gamma partant avec la même énergie dans des directions opposées. Une couronne de détecteurs est disposée autour du patient et le tri pour déterminer l'origine de l'émission se fait par coïncidence ; il faut qu'un évènement identique soit détecté à des points strictement opposés au même moment. Cette méthode offre une bien meilleure sensibilité géométrique puisque 1 % des évènements émis sont détectés [30].

La scintigraphie permet de suivre les radio-traceurs avec une très grande sensibilité de détection et est actuellement la modalité la plus avancée sur le plan de l'imagerie moléculaire [31]. Les agents de contraste utilisés sont alors les différents radio-isotopes associés à un agent ciblant. En TEP, le **¹⁸F-fluoro-deoxy-glucose** (¹⁸F-FDG) est d'ores et déjà très largement utilisé en clinique en oncologie, neurologie et en cardiologie [32]. L'eau marquée à l'**oxygène 15** est également très employée pour la perfusion du myocarde ou encore pour imager l'activité cérébrale en localisant la consommation d'oxygène [33]. En TEMP, de nombreux outils de diagnostic sont développés à partir d'un radio-marquage de cellules, protéines, anticorps ou autre molécules et permettent l'imagerie moléculaire de diverses pathologies artérielles avec une bonne sensibilité [34]. Le radio-isotope le plus employé est très majoritairement le **technétium 99m**, qui en plus d'apporter une émission radioactive gamma optimale pour cette méthode, est largement disponible, peu coûteux, facile d'utilisation en kit de radio-marquage, et présente une courte demi-vie (6 heures et 20 secondes) qui limite la radiation subie par les patients et facilite le traitement des déchets [35].

2.1.5. L'IRM

L'**imagerie par résonance magnétique** (IRM) est basée sur la résonance magnétique nucléaire des atomes d'hydrogène des molécules d'eau présentes dans l'organisme.

Le patient est initialement placé sous un **champ magnétique** qui tend à orienter les **moments magnétiques** des protons d'hydrogène contenu dans l'organisme. Pour obtenir la résonance, il faut alors apporter une énergie permettant aux noyaux de passer d'un état fondamental à un état excité. Cette énergie est fournie par un 2nd champ magnétique, de plus faible intensité et perpendiculaire au premier, sous la forme d'impulsions brèves. Cela a pour effet d'orienter les moments magnétiques perpendiculairement au champ initial. A l'issue de cette excitation, les moments magnétiques retrouvent leur état d'équilibre par un phénomène qui s'appelle la **relaxation**.

On distingue alors la **relaxation longitudinale** et la **relaxation transversale**.

- La relaxation longitudinale correspond au retour à l'état d'équilibre de la composante alignée au champ magnétique initial. Elle dépend d'un temps caractéristique appelé **temps de relaxation longitudinale** (T_1).

- La relaxation transversale correspond à la période d'annulation des composantes perpendiculaires des moments magnétiques induites par le second champ magnétique. Elle dépend d'un temps caractéristique appelé **temps de relaxation transversale** (T_2).

La technique d'imagerie par résonance magnétique consiste à mesurer en chaque point de l'organisme le T_1 ou le T_2 et de faire une reconstruction tridimensionnelle en faisant correspondre à la relaxation une échelle de contraste. Puisque T_1 et T_2 dépendent de la densité d'hydrogène des tissus, chaque tissu de l'organisme aura en IRM un signal différent selon son hydratation.

Cette modalité d'imagerie apporte une excellente définition anatomique, en particulier pour les tissus mous comme les muscles ou le cerveau. Elle est d'autre part de plus en plus utilisée avec des agents de contraste qui ont des propriétés magnétiques capables de faire varier localement la relaxation.

En IRM, l'imagerie moléculaire exploite les capacités de 2 types d'agents de contraste. Les agents dits **paramagnétiques**, à base de **chélates de gadolinium**, qui permettent d'obtenir un allongement du temps de relaxation longitudinale et qui apporte un rehaussement localisé du signal en IRM pondéré en T_1 . Le Dotarem[®] mis au point par la société Guerbet, est à l'heure actuelle utilisé en clinique pour mettre en contraste la circulation sanguine ; des outils d'imagerie moléculaire de pathologies artérielles à partir du Dotarem[®] sont en cours de développement [36, 37].

Les agents **superparamagnétiques**, à base d'**oxyde de fer**, qui permettent de raccourcir localement le temps de relaxation transversale, sont utilisés en IRM pondéré en T_2 . Un grand nombre de particules d'oxyde de fer a alors été développé comme agent de contraste. On distingue, selon leur diamètre hydrodynamique, 3 classes ; les USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) présentant des diamètres allant de 20 à 50 nm, les SPIO (Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) de 60 à 250 nm et les MPIO (Micro-sized Particles of Iron Oxide) de 0,9 à 8 μm qui, une fois injectées dans la circulation sanguine, peuvent apporter différents comportements *in vivo* et différents taux de relaxivité selon leur taille [38].

La société Guerbet a développé les USPIO Sinerem[®] qui sont captées par les macrophages une fois injectées dans la circulation sanguine. Leur utilisation en clinique a été validée pour la détection des macrophages dans des plaques d'athérome au niveau des artères carotidiennes et dans des anévrysmes de l'aorte abdominale [39, 40]. L'apport diagnostique de ces USPIO est malgré tout assez limité et la stratégie de recherche, en imagerie moléculaire, consiste à fonctionnaliser ces USPIO avec des agents ciblant afin de caractériser les pathologies artérielles plus rapidement et plus précisément.

2.1.3. L'échographie

L'échographie exploite les propriétés des ondes mécaniques de très haute fréquence (plus de 20 000 Hertz), appelées **ultrasons**, produits par un transducteur électro-acoustique, appelé **sonde**, excité électriquement. Cette sonde est placée directement au contact de l'organisme au niveau du tissu que l'on veut imager. L'utilisation d'un gel entre la sonde et la peau permet d'éviter que les ultrasons ne traversent l'air. Les ultrasons émis par la sonde vont alors se propager dans l'organisme. Les

différents types de tissu présentent des capacités variées à être pénétrés par les ultrasons, si bien que chaque interface rencontrée par les ondes en réfléchira une partie. Au final, les ondes contenant des informations sur les tissus mous traversés sont rétro-diffusées sur le transducteur puis converties à nouveau en signal électrique. Ce signal permet la reconstruction d'une image bidimensionnelle correspondant aux inhomogénéités rencontrées par les ultrasons dans l'organisme.

Avec l'**échographie Doppler**, il est également possible d'ajouter à l'observation anatomique une représentation des écoulements de fluides. Cette méthode repose sur le fait que lorsque les ondes ultrasonores sont réfléchies par un corps en mouvement, leur fréquence est légèrement modifiée. On appelle cela l'**effet Doppler**. Ces ondes retournent alors à la sonde avec des fréquences légèrement plus basses ou plus élevées selon le sens de déplacement du corps en mouvement imagé et ce décalage permet d'estimer la vitesse du déplacement [41].

Cette modalité d'imagerie médicale présente de nombreux avantages, elle est sans danger, indolore, peu coûteuse, facilement transportable, très largement disponible dans les milieux hospitaliers ; elle apporte une observation en temps réel et l'échographie Doppler permet de compléter l'analyse avec une angiographie.

D'un autre côté, l'échographie nécessite un œil exercé et offre une résolution assez réduite polluée par une importante présence de bruits et artefacts. Ces inconvénients réduisent la possibilité de diagnostiquer les malformations anatomiques. Pour remédier au manque de sensibilité, un axe de recherche consiste à développer des agents de contraste permettant de mettre en évidence la présence de pathologies lors d'une imagerie par échographie.

De nombreux agents de contraste pour l'échographie ont été développés à partir de **microbulles** de gaz encapsulées dans une membrane de phospholipides, d'albumine ou de polymères. Les gaz utilisés, principalement de l'**hexafluoride** ou un type d'**hydrocarbure perfluoré**, ont une grande masse molaire ce qui apporte une importante différence d'impédance acoustique avec le fluide environnant et donc présente un fort signal en échographie. D'autres agents de contraste encapsulent des **perfluorocarbones liquides**, ce qui permet d'obtenir des microparticules échogènes plus résistantes aux contraintes mécaniques.

En fonctionnalisant ces agents de contraste pour cibler les pathologies artérielles, des outils d'imagerie moléculaire voient peu à peu le jour et certains s'avèrent très efficaces en préclinique. A titre d'exemple, après injection dans la circulation sanguine, des microbulles lipidiques d'hydrocarbure perfluoré fonctionnalisées ont permis d'imager en échographie *in vivo* l'activité inflammatoire au niveau de plaques d'athérome à un stade avancé chez la souris et l'ischémie du myocarde chez le rat [42, 43].

Le Tableau 1 résume les avantages et les inconvénients de chaque modalité d'imagerie médicale au regard de l'imagerie moléculaire.

Les méthodes d'imagerie nucléaire (TEP et TEMP) offrent la meilleure sensibilité de détection des agents de contraste et sont pour cette raison les plus avancées dans cette voie. De plus, la

tomodensitométrie complète l'observation avec une imagerie anatomique de bonne résolution, ce qui permet de bien localiser les phénomènes moléculaires mis en évidence en TEP et TEMP. L'outil d'imagerie moléculaire standard actuellement utilisé en clinique pour le diagnostic de pathologies artérielles est d'ailleurs un outil pour la TEP : le ^{18}F -FDG. La TEMP combinée avec du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ offre également de très nombreuses applications en imagerie moléculaire des pathologies artérielles qui s'avèrent parfois plus efficaces que le ^{18}F -FDG.

Les autres modalités ne doivent toutefois pas être laissées pour compte. L'IRM offre une observation anatomique bien plus complète que les autres méthodes, principalement grâce aux contrastes des tissus mous qu'elle apporte. Suite à l'injection d'un outil d'imagerie moléculaire, cette méthode permet de bien localiser la prise de contraste et d'identifier les zones à risque avec bien plus de précision que l'imagerie nucléaire couplée à de la tomodensitométrie.

Enfin, l'échographie est largement disponible dans tous les hôpitaux, sans danger et peu coûteuse. De plus, l'échographie doppler est actuellement en clinique la méthode de diagnostic la plus courante pour les pathologies artérielles (cf. 1.3.1). Il est évident qu'un outil de diagnostic non invasif permettant d'améliorer la détection de ces maladies avec cette méthode serait également d'un très grand intérêt.

Tableau 1. Résumé des modalités d'imagerie et de leurs apports dans les pathologies artérielles (adapté de [31])

Modalité	Type d'imagerie		Applications		Agents de contrastes
	Anatomique	Moléculaire	Avantages	Inconvénients	
Scanner	X	-	Rapide, bonne résolution, utile pour le suivi des stades précoces	Radiations ionisantes, requiert un agent de contraste	Iode Barium
NIRF	-	X	Faible coût et largement disponible	Photoblanchiment, faible rendement quantique, pénétration limitée dans les tissus	Quantum dots Vert d'indocyanine Cyanine 5.5
Bio-luminescence	-	X	Bonne sensibilité et spécificité	Pénétration limitée dans les tissus, requiert une modification transgénique	Luciférine
TEMP	-	X	Imagerie 3D, largement disponible, bonne sensibilité de détection en imagerie moléculaire	Résolution temporelle limitée, utilisation de radio-traceurs	^{99m} Tc ¹¹¹ In ²⁰¹ Tl ¹²³ I ¹³¹ I
TEP	-	X	Quantification de l'activité métabolique et du flux sanguin, très bonne sensibilité de détection en imagerie moléculaire	Coût élevé, peu disponible, installation lourde, utilisation d'un radio-traceur, temps de demi-vie court	¹⁸ F ¹⁵ O ¹¹ C ¹³ N ⁸² Rb
IRM	X	X	Très bonne résolution anatomique, contraste des tissus mous	Coût élevé, installation lourde, sensibilité de détection moyenne en imagerie moléculaire	Particules superparamagnétiques d'oxyde de fer Chélates de gadolinium
Echographie	X	X	Faible coût, largement disponible, rapide, reproductible et sans danger	Résolution limitée avec de nombreux artefacts et interprétation des images difficiles, sensibilité de détection limitée en imagerie moléculaire	Microbulles

2.2. Les cibles des pathologies artérielles

Afin de cibler les pathologies artérielles, il est dans un premier temps nécessaire d'identifier les cellules ou molécules clés qui sont à la fois absentes lorsqu'il n'y a pas de pathologie et présentes en quantité suffisamment importante lors des premiers signes pathologiques de l'artère.

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit que les premiers phénomènes biologiques impliqués dans le développement de l'athérosclérose comprennent l'accumulation dans la paroi artérielle de LDL et le recrutement de leucocytes. La compréhension de ces phénomènes a été exploitée dans le but de développer des **agents ciblant** spécifiques de la pathologie.

2.2.1. Les composants du sang

Des premiers **outils de diagnostic** de l'athérosclérose ont été développés dans l'optique de suivre l'accumulation des **globules rouges**, des **LDL**, des **leucocytes** ou des **plaquettes**.

Une première stratégie de ciblage a été d'associer un agent de contraste *ex vivo* à un de ces composants isolés puis de les injecter aux patients avant de les passer en imagerie. Il y a déjà 30 ans, des **globules rouges** radio-marqués au technétium 99m ont été injectés chez l'homme et ont apporté un contraste en TEMP au niveau d'anévrysmes de l'aorte abdominale. Par la suite, des plaques d'athérome chez l'homme ont été révélées avec des **LDL** radio-marquées [44]. Plus récemment, un radio-marquage des **plaquettes** à l'oxinate d'indium 111 a permis de contraster en TEMP la thrombose veineuse [45].

Une autre méthode consiste à simplement rendre l'agent de contraste lipophile afin qu'il montre une affinité pour le **cœur lipidique**. Beilvert *et al.* ont ainsi mis au point des micelles incorporant du gadolinium et fonctionnalisées avec des fragments lipophiles de tyrosine et ont imagé en IRM des plaques d'athéromes chez la souris [46].

D'autres outils de diagnostic exploitent la fonction d'endocytose des **macrophages**. Des nanoparticules chargées en fer ont ainsi été développées pour être, après injection dans la circulation, captées par les macrophages et mettre en évidence leur accumulation en IRM pondérée en T₂ [39, 40].

Pourtant, bien que ces techniques permettent de révéler des informations utiles, elles nécessitent une accumulation minimum du composant sanguin et ne permettent pas de suivre les événements cellulaires qui interviennent longtemps avant qu'un changement structurel ne soit détectable [47].

2.2.2. Les cibles moléculaires

Pour affiner le ciblage, la recherche s'est orientée vers une caractérisation plus fine de la pathologie afin de révéler les tous premiers phénomènes moléculaires.

L'élément phare de l'imagerie moléculaire par exemple est basé sur les phénomènes de l'absorption et phosphorylation du glucose. La mise au point d'un analogue du glucose radio-marqué au fluor 18,

le ^{18}F -FDG, permet de révéler en TEP les cellules à **forte activité métabolique** au niveau des sites cancéreux mais aussi inflammatoires. Le ^{18}F -FDG permet ainsi de diagnostiquer les AAA [48, 49].

Une molécule bien particulière, l'annexine V, est exploitée pour son affinité nanomolaire pour la **phosphatidylsérine** exprimée à la surface des cellules apoptotiques [50]. Cette protéine soluble a été radio-marquée au technétium 99m et a permis la détection en TEMP de plaques d'athérome instable chez des patients victimes d'athérosclérose au niveau de la carotide [51]. Ce même outil a permis d'imager chez le rat des thrombi luminaux dans un modèle d'AAA et des végétations endocarditiques dans un modèle d'endocardite [52, 53].

En imagerie optique, Nury *et al.* ont développé des traceurs fluorescents activables qui permettent de visualiser *in vivo* l'activité de la **MMP 12** [54]. La compagnie américaine PerkinElmer a également développé de tels traceurs qui ont permis de détecter l'activité de **MMPs** ou **cathepsines** dans des modèles murins d'AAA [55, 56]. Cette activité protéolytique massive a également été imagée en IRM sur un modèle de plaques d'athérome chez la souris en injectant du gadolinium fonctionnalisé avec un peptide dirigé contre les MMP activées [57].

Une autre stratégie très largement répandue consiste à étudier plus précisément les **protéines membranaires** mises en œuvre dans les processus d'adhésion et à fonctionnaliser l'agent de contraste avec un ligand d'une de ces protéines afin qu'il présente une affinité pour la paroi pathologique. C'est ainsi que l'intérêt s'est porté sur certaines protéines telles que les **sélectines**, certaines **intégrines**, la **ICAM-1** (Inter Cellular Adhesion Molecule 1), la **VCAM-1** (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), les **récepteurs scavengers** ou encore la **fibrine** qui sont toutes impliquées dans les processus d'adhésion entre cellules endothéliales activées, plaquettes activées et leucocytes (Figure 7).

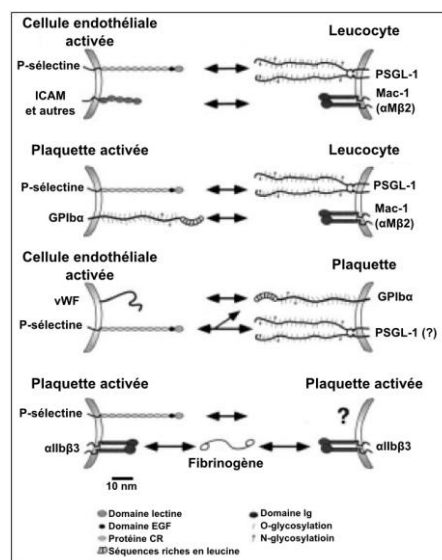


Figure 7 : Molécules d'adhésion entre cellules endothéliales activées, plaquettes activées et leucocytes [58].

De nombreux outils de diagnostic des pathologies artérielles constitués d'agents de contraste conjugués à des ligands de ces protéines membranaires sont actuellement en cours de développement et se révèlent déjà prometteurs en préclinique.

En injectant des microbulles recouvertes d'une membrane lipidique fonctionnalisée avec des anticorps dirigés contre l'**intégrine** $\alpha_{2b}\beta_3$, un fort signal a été obtenu en échographie au niveau du thrombus de la carotide chez la souris [59].

En IRM pondérée en T_2^* , la fonctionnalisation d'USPIO avec un peptide présentant une affinité pour **VCAM-1** [60] ou pour un **récepteur scavenger** [61] a permis d'identifier la plaque d'athérome chez la souris avec une meilleure prise de contraste que celle apportée par des USPIO non fonctionnalisées. En injectant des MPIO conjuguées à des anticorps anti-**VCAM-1**, Montagne *et al.* ont imagé l'activation endothéliale cérébrovasculaire dans des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer et d'encéphalomyélite auto-immune chez la souris [62].

En IRM pondérée en T1, des thrombi induits dans la carotide de lapins ont été détectés avec un peptide liant la **fibrine** conjugué à du gadolinium [63].

Toutes ces cibles permettent l'identification de différents processus intervenant à des stades plus ou moins avancés des pathologies artérielles, comme l'illustre la Figure 8 dans le cas de l'athérombose. Un outil d'imagerie moléculaire ciblant des molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1 ou une sélectine permettra donc de faire un diagnostic précoce tandis qu'un outil ciblant une intégrine, la fibrine ou le cœur lipidique ne permettra un diagnostic qu'à un stade plus avancé. Afin de produire un outil de diagnostic qui répond au mieux aux besoins cliniques, à savoir le manque de diagnostic précoce (cf. 1.3.3), nous nous sommes orientés vers un ciblage de ces molécules d'adhésion.

Dans un récent article de revue, les auteurs expliquent que la cible doit être choisie en fonction du phénomène pathologique que l'on veut identifier [64]. L'outil de diagnostic doit ainsi être orienté vers la fibrine ou les plaquettes pour imager le thrombus, vers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour identifier l'angiogénèse et vers les molécules d'adhésion pour l'inflammation. Nous avons sélectionné la **P-Sélectine** qui est à la fois une molécule d'adhésion exprimée par les cellules endothéliales activées et par les plaquettes activées (Figure 7). Cibler la P-Sélectine permettra donc d'identifier l'inflammation aux stades précoces et d'imager les thrombi riches en plaquettes.

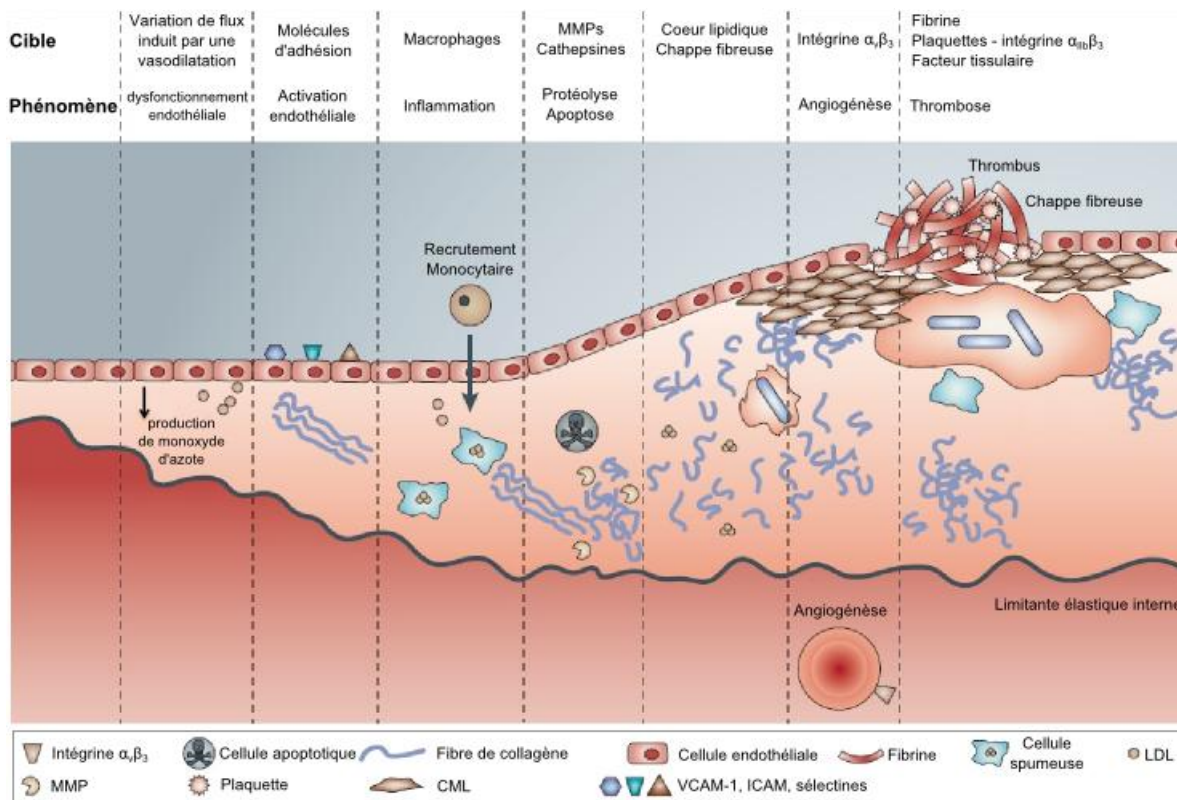


Figure 8 : Les cibles de l'imagerie moléculaire aux différents stades de l'athéromatose (adapté de [64]).

2.2.3. La P-Sélectine

Elle constitue avec la **E-Sélectine** et la **L-Sélectine**, une famille de 3 glycoprotéines transmembranaires. Ces protéines d'adhésion sont toutes les 3 impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires dans le processus inflammatoire.

Les sélectines possèdent toutes une structure en 3 parties : une courte partie cytoplasmique, une région transmembranaire et une longue partie extra-membranaire. Cette dernière partie fortement glycosylée est constituée de plusieurs protéines CR (Complement Regulatory), d'un domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor) puis d'un domaine lectine calcium dépendant à son extrémité où se situe le site d'accroche propre au type de sélectine (Figure 9).

La **L-sélectine** est présente à la surface de la plupart des **leucocytes** (L pour leucocyte). On la trouve plus précisément sur tous les granulocytes, tous les monocytes et la plupart des lymphocytes. Elle se lie à la **Gly-CAM-1** (Glycosylation dependent Cell Adhesion Molecule 1), la **CD34**, ou encore à l'**adressine**, 3 molécules que l'on trouve à la surface des cellules endothéliales.

La **P-sélectine** est stockée dans les **α -granules** des **plaquettes** (P pour plaquettes) et les **corps de Weibel-Palade** des **cellules endothéliales**. Elle est exprimée à la surface ou relarguée lors de leurs activations [47, 48]. Plus précisément, cette activation, déclenchée par un agoniste parmi la thrombine, l'histamine, l'activateur de la protéine kinase C ou l'ADP, consiste en la fusion des

granules avec la membrane conduisant ainsi la P-Sélectine à la surface de la cellule [65]. Contrairement à la E-Sélectine, cette fusion se fait rapidement et l'expression de la P-Sélectine a lieu dans les dizaines de minutes qui suivent la détection de l'agoniste [66]. Son ligand naturel est la **PSGL-1** (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) qui est exprimée à la surface de presque tous les leucocytes.

La **E-Sélectine** est exprimée par les cellules endothéliales (E pour endothélium) en réponse à un stimulus inflammatoire. Ce phénomène est relativement lent ; l'expression débute environ 2h après le stimulus et s'achève au bout de 24 heures, avec un pic entre 6 et 12 heures [67]. La E-Sélectine possède une forte affinité pour la **ESL-1** (E-Selectin Ligand-1) présente à la surface de certains leucocytes et la **PSGL-1**.

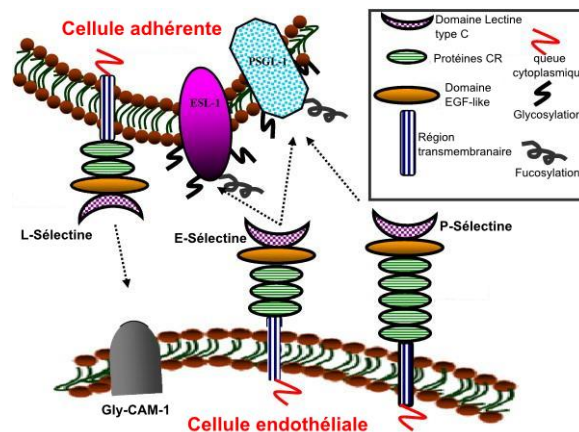


Figure 9 : Schéma des processus d'adhésion impliquant les sélectines [68].

Pour les 3 sélectines, bien que les ligands soient variés, l'ancrage se fait toujours via un site d'accroche bien particulier, le site **Sialyl Lewis X** (SLe-X) (Figure 10). Ce tétrasaccharide carbohydrate se lie aux sélectines par l'intermédiaire de fonctions hydroxyle (OH) du L-fucose et D-galactose et les groupes carboxylates (COO-) de l'acide sialique [69].

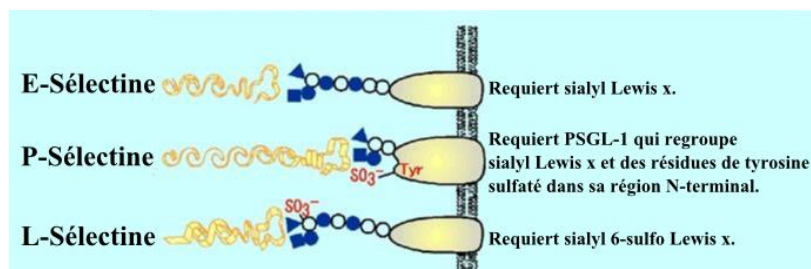


Figure 10 : Spécificité des ligands des sélectines [70].

Des outils de diagnostic des pathologies artérielles ont ainsi été fonctionnalisés avec le SLe-X ou même avec des molécules qui présentent un site mimant ce site d'accroche telles que le fucoïdane (Cf 3.2.3). Des microbulles lipidiques fonctionnalisées avec SLe-X ont ainsi apporté une prise de

contraste en échographie au niveau d'ischémies du myocarde chez le rat [43]. Des MPIO fonctionnalisées avec 2 types de ligands, des anticorps anti **P-Sélectine** et des anticorps anti **VCAM-1**, ont permis d'imager des lésions d'athérosclérose chez la souris [71].

Au sein de notre équipe, l'injection de fucoïdane radio-marqué au technétium 99m a permis l'imagerie en TEMP du thrombus et de l'activation endothéliale chez le rat [72]. Ce nouveau traceur d'imagerie moléculaire est très prometteur et un essai clinique pour valider son utilisation comme outil de diagnostic de la thrombose artérielle est d'ailleurs prévu dans le cadre du projet européen NanoAthéro. Cependant, dans cette dernière étude, Rouzet *et al.* nous expliquent que le fucoïdane radio-marqué au technétium 99m est très efficace pour imager le thrombus intraluminal dans un modèle d'AAA chez le rat, mais ne permet pas d'identifier la paroi anévrysmale proprement dite. Ma thèse s'inscrit dans la suite de ce projet et nous avons cherché une solution pour améliorer les propriétés de ciblage de cet outil d'imagerie moléculaire.

2.3. Les nano/microparticules au service de l'imagerie moléculaire

Dans la conception d'un outil d'imagerie moléculaire, après avoir défini l'agent de contraste et l'agent ciblant, il reste à choisir le support pour véhiculer les deux.

2.3.1. Les différents supports pour l'imagerie moléculaire

Les composants du sang :

Comme nous l'avons expliqué précédemment (cf. 2.2.1), la première stratégie de ciblage adoptée a été d'isoler les **composants du sang** d'intérêt, les associer *ex vivo* à un agent de contraste puis les réinjecter dans la circulation du patient. Dans ce cas, le support utilisé est biologique. Il est alors judicieux de travailler avec des composants biologiques autologues, afin d'éviter toute réaction de rejet. Actuellement, de nombreux outils de diagnostic des pathologies artérielles sont basés sur des supports biologiques tels que des **globules rouges**, des **lymphocytes**, des **plaquettes** ou encore des **LDL** [44, 45, 73, 74].

Cette stratégie présente un avantage en terme de sécurité puisque l'on réinjecte dans l'organisme une cellule ou molécule qui était déjà présente dans le sang. Seul l'ajout de l'agent de contraste peut induire une légère modification.

Toutefois, malgré un intérêt certain pour imager et caractériser les stades tardifs, cette stratégie ne permet pas de diagnostiquer les premiers stades des pathologies artérielles [47].

Les molécules libres :

Pour affiner le ciblage, la recherche s'est intéressée aux molécules d'adhésion exprimées au niveau de la paroi artérielle pathologique aux stades précoces et l'approche la plus simple consiste alors à

injecter une **molécule soluble** qui est à la fois ligand de la protéine cible identifiée et conjuguée à un agent de contraste.

De nombreux peptides, anticorps ou autres petites molécules, décrits précédemment, ont ainsi été utilisés comme support pour l'imagerie moléculaire des maladies artérielles [31, 48, 63, 72].

Ces molécules apportent d'excellents résultats et améliorent nettement le diagnostic apporté par les agents de contraste couplés aux composants du sang. De plus, leur petite taille joue en faveur d'une injection dans l'organisme sans complication puisqu'elle n'entraîne pas de risque d'occlusion vasculaire.

Il s'avère malgré tout que ces supports moléculaires sont éliminés trop rapidement de la circulation sanguine, et qu'ils présentent une affinité parfois faible et un signal en imagerie limité.

Les nano/microparticules :

Dans l'optique de perfectionner l'imagerie moléculaire, de nombreux outils de diagnostic ont été développés à partir d'un support type **nanoparticule** ou **microparticule** sphérique auquel sont associés en surface des agents ciblant et à l'intérieur des agents de contraste. Ces dispositifs présentent des avantages qui permettent d'affiner le diagnostic :

- Suite à l'injection dans la circulation sanguine d'une molécule étrangère, l'organisme réagit rapidement à l'intrusion et les outils de diagnostic sont éliminés par les organes de clairance. Or, ces supports de type nano ou microparticule présentent une grande surface spécifique qui offre suffisamment d'espace pour une fonctionnalisation avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) qui permettent de rendre la surface du dispositif plus hydrophile et ainsi prolonger leur temps de circulation avant clairance [75]. En circulant plus longtemps dans les vaisseaux, leur chance de rencontrer la cible est plus forte.
- Ces nano ou microparticules présentent une grande surface spécifique pouvant être fonctionnalisée avec plusieurs ligands ce qui permet d'optimiser leur affinité pour la cible [76-78].
- Avec un volume plus important, le système particulaire permet de découpler la quantité d'agents de contraste par objet.

Mais, bien que de telles technologies présentent un grand intérêt dans la conception d'outils de diagnostic, leur utilisation en clinique n'est pas encore d'actualité.

2.3.2. Les nano/microparticules, supports idéaux pour l'application clinique ?

Dans ce paragraphe nous présentons une étude comparative des différentes directions empruntées en imagerie moléculaire, dans le cadre des pathologies artérielles. Le Tableau 2 présente une liste non exhaustive des différents outils de diagnostic des pathologies artérielles en fonction de la modalité d'imagerie, de l'agent de contraste utilisé pour obtenir une prise de contraste, de la cible visée, du ligand employé, du type de support et de l'état d'avancement par rapport à l'application clinique. Nous essayerons ensuite de déterminer le support idéal pour une telle application.

Tableau 2. L'état d'avancement de l'imagerie moléculaire des pathologies artérielles

Modalité d'imagerie	Agent de contraste	Cible	Ligand	Type de support	Etat d'avancement	Réf
TEP	Fluor 18	Cellules à forte activité métabolique	Analogue du glucose : FDG	Molécule	Utilisé en clinique	[48, 79]
	TEMP	Technétium 99m	Phosphatidylsérine	Péptide : Annexine-V	Molécule	Essai clinique Athérosclérose Préclinique <i>In vivo</i> AAA chez le rat
P-Sélectine			Polysaccharide : Fucoidane	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Thrombus intra- anévrismal et endocardite chez le rat Mise en place d'un essai clinique	[72, 80]
VCAM-1		Peptide	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Athérosclérose chez la souris	[81]	
Récepteur de la chémokines (C-C) de type 2		Peptide : Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1)	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Athérosclérose chez le lapin	[82]	
Iode 123		P-Sélectine	Anticorps	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Thrombus chez le babouin	[83]
Indium 111		Fibrine	Peptide	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Thrombus chez la souris	[84]

IRM	Fer	P-Sélectine + VCAM-1	Anticorps	Microparticules de 1 µm	Préclinique <i>In vivo</i> Athérosclérose chez la souris	[71]
		VCAM-1	Peptide	Nanoparticules de 30 à 50 nm	Préclinique <i>In vivo</i> Athérosclérose chez la souris	[60]
		E-Sélectine	Anticorps	Nanoparticules de 50 nm	Préclinique <i>In vivo</i> inflammation chez la souris	[85]
	Gadolinium	Cœur lipidique	Peptide	Nanoparticules de 15 nm	Préclinique <i>In vivo</i> Athérosclérose chez la souris	[46]
		Fibrine	Peptide	Molécule	Préclinique <i>In vivo</i> Thrombus chez le lapin Essai clinique Thrombus	[63] [86]
Echographie	Microbulles Targestar SA [®] (Targeson Inc.)	Intégrine $\alpha_{2b}\beta_3$	Anticorps	Microbulles lipidiques	Préclinique <i>in vivo</i> Thrombus chez la souris	[59]
	Perfluorobutane gazeux	P-Sélectine	Sialyl Lewis X	Microbulles lipidiques de 2 à 5 µm	Préclinique <i>in vivo</i> Ischémie du myocarde chez le rat	[43]
	Perfluoropropane gazeux	VCAM-1	Anticorps	Microbulles lipidique de 2 à 5 µm	Préclinique <i>In vitro</i>	[87]
	Bromure de perfluorooctyle (PFOB)			Nanoparticules de 200 nm	Préclinique <i>In vitro</i>	[88]

L'imagerie moléculaire des pathologies artérielles connaît encore peu d'application clinique. La médecine nucléaire est la plus avancée dans le domaine avec notamment le ¹⁸F-FDG qui est couramment utilisé en clinique et l'Annexine V dont l'utilisation en clinique a été validée. Pour les autres modalités, presque aucun agent de contraste fonctionnalisé avec un agent de ciblage n'a été validé chez l'homme mais de nombreux outils de diagnostic ont fait leurs preuves en préclinique, sur des modèles animaux variés.

Le Tableau 2 met également en évidence le fait que les outils d'imagerie moléculaire les plus avancés sont basés sur un support de type molécule libre. En scintigraphie, la stratégie nano/microparticule

n'a absolument pas été envisagée malgré les nombreux avantages qu'elle présente (Cf. 2.3.1). En IRM, le seul outil de ce tableau validé par un essai clinique est aussi le seul à être basé sur une molécule libre; le peptide EP-2104R ciblant la fibrine conjuguée à un chélate de Gadolinium. En échographie et en IRM pondérée en T_2 la tendance est inversée, la totalité des outils de diagnostic présente une taille nano ou micrométrique. L'explication est physique ; il est impossible d'obtenir un contraste en IRM T_2 et en échographie avec une simple molécule libre. Comme nous l'avons vu précédemment (Cf. Tableau 1), ces modalités d'imagerie apportent une plus faible sensibilité de détection des agents de contraste. En fait, on comprend que de façon générale, les outils de diagnostic basés sur des supports de type nanoparticules ou microparticules se développent dans les secteurs d'imagerie moléculaire où les molécules libres ne sont pas suffisamment efficaces.

Cette tendance s'explique en partie par le fait que l'injection dans la circulation sanguine d'outils de diagnostic de type nano ou microparticules présente certains risques cliniques. Il faut en effet d'un côté bien contrôler le diamètre hydrodynamique des microparticules afin qu'ils n'entraînent pas d'**occlusions vasculaires**, et d'un autre côté prendre en considération les différents **risques de toxicité** pouvant être générés par les nanoparticules [89]. La molécule libre a ainsi été favorisée car elle présente moins de danger lors d'une administration chez l'homme et donc une meilleure accessibilité à l'application clinique.

Cependant, malgré cette controverse sur la toxicité, certaines nanoparticules ont été validées cliniquement. Les USPIO Sinerem[®] de la compagnie Guerbet en sont un bon exemple [39, 90]. Ces USPIO ne figurent pas dans le tableau des outils d'imagerie moléculaire car elles ne sont pas fonctionnalisées ni dirigées contre une molécule spécifique, mais elles témoignent tout de même de la possibilité d'utiliser un tel support chez l'homme.

Dans ce projet de thèse, nous avons fait ce pari sur l'avenir des nano- et microparticules comme outil d'imagerie moléculaire. Nous nous sommes donc orientés vers la synthèse d'un tel support.

2.3.3. Les différent types de nano/microparticules

La littérature décrit plusieurs structures de nanoparticules pouvant être utilisées comme support d'outil d'imagerie moléculaire (Figure 11).

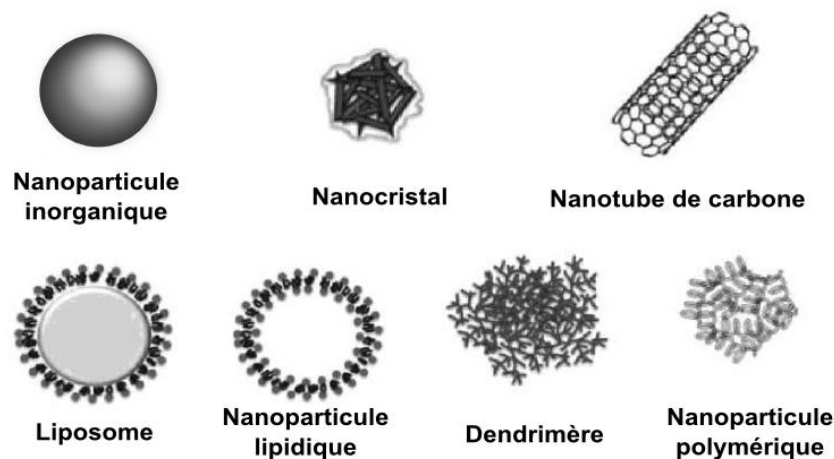


Figure 11 : Les différents types de nanoparticules (adaptée de [91])

Les **nanoparticules inorganiques** regroupent principalement les nanoparticules d'oxyde de fer développées pour l'IRM et les nanoparticules d'or développées pour l'imagerie optique et la tomodensitométrie. Les **nanocristaux de semi-conducteur** (quantum dots) présentent des propriétés de fluorescence intéressantes et sont exclusivement utilisés en imagerie moléculaire optique.

Des outils d'imagerie moléculaire sont également développés à partir de **nanotubes de carbone** associés à des radio-isotopes ou des fluorochromes [92, 93]. Ce type de nanoparticule présente de sérieux inconvénients en termes de toxicité et leur avenir en clinique est très discuté. Toutefois, certains croient en leur application médicale à condition de les recouvrir en surface avec du PEG [94].

Les **nanoparticules lipidiques** sont constituées de lipides et/ou de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent spontanément dans un milieu aqueux. Elles sont souvent associées à des agents de contraste et utilisées en imagerie moléculaire [95]. Les **liposomes** comportent une phase aqueuse encerclée d'une bicouche lipidique. Ils sont légèrement plus larges que les nanoparticules lipidiques et sont employés pour encapsuler divers agents de contraste [96].

Les **dendrimères** sont des structures macromoléculaires constituées par une association de monomères selon un processus arborescent autour d'un cœur central. Ils ont généralement une forme sphérique. Leur importante ramification fonctionnalisée leur permet de s'associer à des molécules actives variées dont des agents de contraste. Des dendrimères sont ainsi développés pour tout type d'imagerie moléculaire [97, 98].

Les **nanoparticules polymériques** regroupent toutes les nanoparticules constituées de polymères qui n'entrent pas dans la catégorie des dendrimères. Elles sont capables de retenir une ou plusieurs molécules actives par adsorption ou séquestration et sont ainsi souvent associées à des agents de contraste de cette façon [99]. Tous ces supports polymériques présentent un important avantage en termes de toxicité à condition de choisir des polymères **biodégradables** et **biocompatibles**.

Nous avons opté pour ce type de support et nous nous sommes orientés vers la synthèse de nano/microparticules à partir de **polysaccharides d'origine naturelle**.

3. Les polysaccharides pour la conception d'outils d'imagerie moléculaire

3.1. Conception d'un hydrogel polysaccharide

Les **polysaccharides** sont des **polymères carbohydrates** généralement composés de monosaccharides variés liés par des **liaisons glycosidiques** que l'on trouve abondamment dans la nature et dans les organismes vivants. Ils sont le plus souvent d'origine animale, végétale, bactérienne ou fongique.

Ils sont également très présents chez l'homme, notamment dans la composition de la **matrice extracellulaire** et, pour cette raison en partie, les polysaccharides constituent une bonne alternative aux matériaux synthétiques pour toute application en interaction avec le vivant.

L'équipe de bio-ingénierie cardiovasculaire de l'unité Inserm U698 s'est ainsi orientée vers la conception de **biomatériaux** à base de polysaccharides. Dans cette étude, nous avons plus précisément travaillé avec le **dextrane** et le **pullulane** qui sont deux polysaccharides d'origine bactérienne et fongique respectivement, dont l'utilisation est validée par l'autorité européenne de sécurité des aliments et qui sont d'ores et déjà couramment employés en industrie pharmaceutique [100, 101].

3.1.1. Le dextrane

Le **dextrane** est un polymère ramifié de glucose synthétisé par l'action enzymatique de la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* sur le saccharose.

Ses chaînes sont constituées de glucoses liés pour la plupart par des liaisons osidiques alpha 1-6, et pour certaines chaînes latérales par des liaisons alpha 1-2, 1-3 ou 1-4 (Figure 12). Il a été démontré que le degré de branchement de ces chaînes latérales dépendait de la souche bactérienne et des conditions de culture utilisées [102].

Il est couramment utilisé en médecine comme substitut plasmatique ou lacrymal.

3.1.2. Le pullulane

Le **pullulane** est un polymère de glucose synthétisé par le champignon *Aureobasidium pullulans* à partir de l'amidon.

Ses chaînes sont constituées d'une succession de groupements de 3 glucoses, appelés maltotrioses. Dans chaque groupement de maltotriose, les unités de glucose sont reliées entre elles par des liaisons osidiques alpha 1-4 et les maltotrioses sont connectés entre eux par des liaisons alpha 1-6 (Figure 12).

Il est aujourd'hui largement employé pour les enveloppes de compléments alimentaires [103].

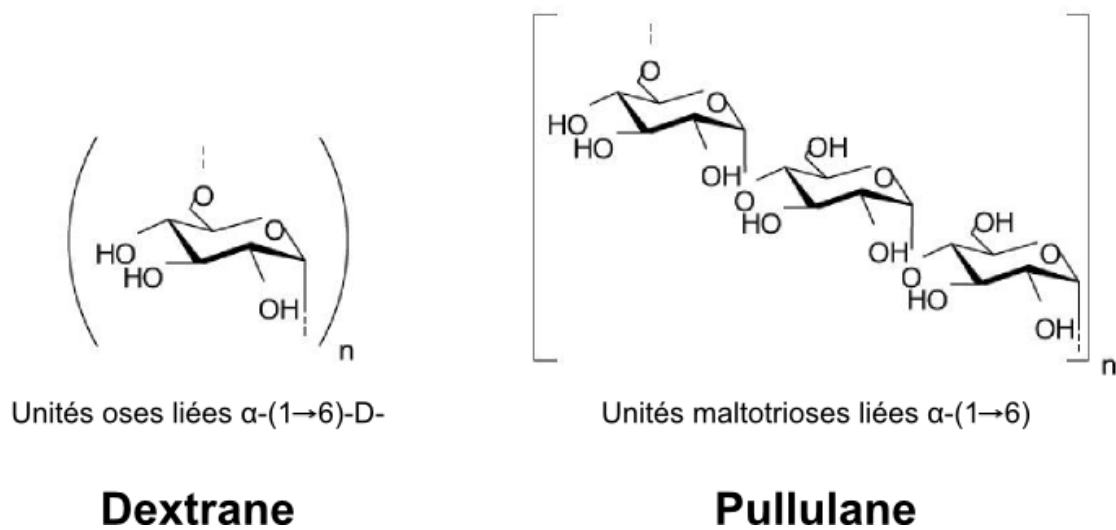


Figure 12 : Structures du dextrane et du pullulane [104].

3.1.3. Un hydrogel réticulé

Des précédents travaux du laboratoire ont montré qu'il était possible de co-réticuler les chaînes de pullulane et de dextrane avec du **trimétaphosphate de sodium** (STMP) et ainsi d'obtenir un **hydrogel** solide. Cette méthode a permis de fabriquer des matrices poreuses supports pour de la culture cellulaire en 3 dimensions [105, 106].

La biocompatibilité de ces matrices a été caractérisée en fonction du ratio pullulane/dextrane entrant dans la composition et le ratio $\frac{3}{4}$ de pullulane et $\frac{1}{4}$ de dextrane a été sélectionné pour la suite des applications en **ingénierie tissulaire** [107]. Ces matrices poreuses se révèlent prometteuses pour des applications en **thérapie cellulaire** (Figure 13). Il a été démontré qu'elles sont un support idéal pour la culture en 3 dimensions de cellules endothéliales et leur délivrance suite à la dégradation enzymatique du support [108]. Ce support offre également de bonnes conditions pour la culture de cellules mésenchymateuses et permet d'améliorer la délivrance cellulaire dans un modèle d'ischémie du myocarde chez le rat [109].

En couplant la **technique de réticulation** des chaînes de pullulane et dextrane en solution aqueuse à un **procédé d'émulsion** de type eau dans huile, notre équipe a également mis au point une méthode permettant d'obtenir ce même hydrogel sous forme de billes poreuses de plusieurs centaines de micromètres destinées à de la thérapie cellulaire moins invasive. Le projet était de cultiver les cellules d'intérêt sur les billes puis d'injecter les suspensions au niveau de la pathologie sans opération chirurgicale.

Afin de produire avec cette méthode un support pour l'imagerie moléculaire, la première étape de mon travail de thèse a consisté en la modification des paramètres de ce procédé d'**émulsion-réticulation** afin d'obtenir un hydrogel injectable dans la circulation sanguine sous forme de nano/microparticules.

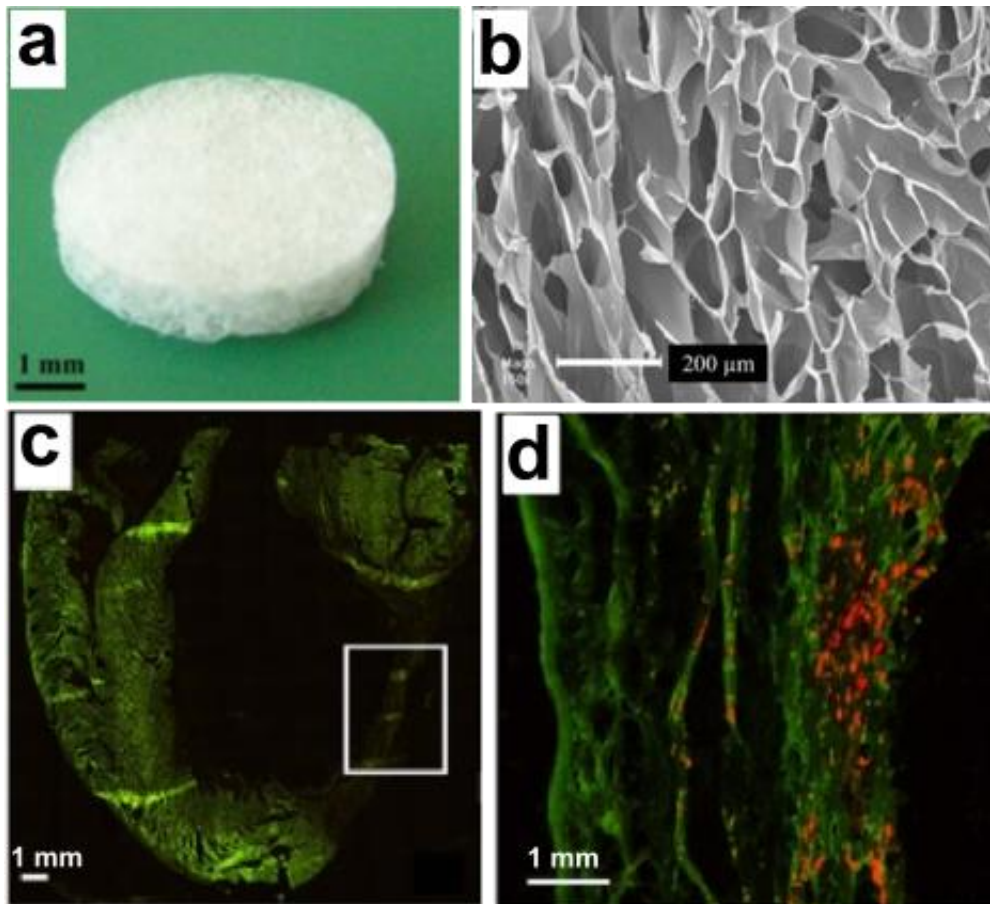


Figure 13: (a) Photo d'une matrice de pullulane-dextrane. (b) Observation au microscope électronique environnemental des pores d'une matrice. (c) Observation en microscopie optique à fluorescence de coupes histologiques d'un coeur de rat présentant un infarctus du myocarde et sur lequel on a implanté une matrice dans laquelle ont été cultivées des cellules mésenchymateuses. Le rat a été sacrifié 1 mois après l'implantation. La zone infarctée au niveau de laquelle la matrice a été implantée est encadrée en blanc. (d) Grossissement de la zone infarctée. Les cellules mésenchymateuses sont visibles en fluorescence rouge ; elles ont colonisé la zone infarctée [109].

3.2. Les fucoïdanes

3.2.1. Des polysaccharides sulfatés

Les **fucoïdanes** sont des **polysaccharides sulfatés** extraits de la matrice extracellulaire d'algues brunes.

Il existe plusieurs types de fucoïdane, suivant l'algue dont ils sont extraits. La composition chimique de certains types, comme le *Fucus vesiculosus* avec lequel nous travaillons, est relativement simple, constituée d'unités L-fucose et de groupements ester sulfate occupant en général les positions C-2, C-3 ou C-4 (Figure 14).

D'autres fucoïdanes ont une composition chimique plus riche, comprenant des monosaccharides et des acides uroniques. La structure des différents fucoïdanes est assez complexe avec une variation

de liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$ ainsi que des branchements liés en $\alpha(1\rightarrow2)$ sur la chaîne principale [110].

Comparés à d'autres polysaccharides sulfatés, les fucoïdanes sont disponibles à partir de sources bon marché et ont été pour cette raison beaucoup étudiés pour le développement de produits pharmaceutiques.

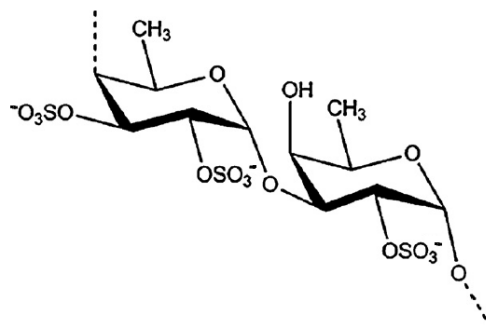


Figure 14 : Structure des fucoïdanes [111]

3.2.2. Les nombreuses propriétés du fucoïdane

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour ce polysaccharide a été grandissant et la littérature a décrit de nombreux effets biologiques induits par le fucoïdane. Ces effets varient selon les modifications de structure observées suivant l'espèce d'algue dont ils sont extraits.

Les propriétés les plus étudiées des fucoïdanes, mais aussi des polysaccharides sulfatés en général, sont leurs fortes activités **anti-coagulantes** et **anti-thrombotiques** [112, 113]. Le fucoïdane inhibe l'activité de la thrombine soit en agissant directement sur cette enzyme, soit en activant l'antithrombine III ou le cofacteur II de l'héparine [114]. En fait, le mécanisme biochimique précis de l'action anti-coagulante varie suivant l'espèce de fucoïdane utilisée. Dans certains cas, cet effet est aussi efficace que celui de l'héparine qui est également un polysaccharide sulfaté et un anti-thrombotique très largement utilisé en clinique. Le fucoïdane, qui est d'origine végétale, est ainsi envisagé comme alternative à l'héparine, qui est d'origine animale.

Les fucoïdanes, principalement de type *Ecklonia cava*, ont des activités **anti-inflammatoires** et **antioxydantes** [115]. Ils ont pour effet d'inhiber l'adhésion des leucocytes et la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine- 1β et le facteur de croissance nécrotique α dont on a expliqué les rôles précédemment (Cf. 1.2.3). Ils diminuent également la production excessive d'oxyde nitrique et de prostaglandine E2 [116, 117]. Ces effets bénéfiques ont été envisagés pour traiter des maladies neurodégénératives [118].

La littérature rapporte également des vertus **anti-cancéreuses**. Certains fucoïdanes, notamment l'espèce *Cladosiphon okamuranus*, ont des propriétés antiprolifératives qui réduisent les métastases

et des propriétés qui induisent l'apoptose de certains lymphocytes T, deux propriétés qui limitent la progression cancéreuse [119, 120].

Tous ces effets s'expliquent par la possibilité de liaison entre le fucoïdane, via ses sites sulfatés, et certaines enzymes ou protéines membranaires, déclenchant ainsi des voies de signalisation qui aboutissent à une action biologique. Dans ce projet de recherche, nous nous intéresserons plus particulièrement à la capacité du fucoïdane à se lier à la P-Sélectine.

3.2.3. Une forte affinité pour la P-Sélectine

Les sites sulfatés présents sur les chaînes du fucoïdane extrait de l'algue *fucus vesiculosus* apportent à cette molécule une structure analogue au Sialyl lewis X et Bachelet *et al.* ont démontré, dans une étude réalisée au sein de notre laboratoire, que le fucoïdane avait pour cette raison une forte affinité pour la **P-Sélectine** [80]. Dans cette étude, la formation du complexe P-Sélectine/fucoïdane a été caractérisée *in vitro* par **résonance plasmon de surface** (SPR) et une constante d'affinité entre les deux molécules de 1,2 nM a été mesurée (Figure 15a). Cette valeur traduit une forte affinité, bien plus importante que l'affinité entre la P-Sélectine et son ligand naturel (PSGL-1) dont la constante de dissociation a été mesurée à 320 nM [121]. Le fucoïdane extrait de l'algue *fucus vesiculosus* s'avère donc être un excellent candidat pour cibler la P-Sélectine.

Ce ligand a été ensuite associé à un agent de contraste afin de l'utiliser pour faire de l'imagerie moléculaire des pathologies cardiovasculaires caractérisées par l'expression de P-Sélectine, comme l'endocardite infectieuse (Figure 15b) [72]. Comme nous l'avons mentionné précédemment (cf. 2.2.3) le fucoïdane radio-marqué constitue un outil d'imagerie moléculaire prometteur qui possède malgré tout quelques limitations.

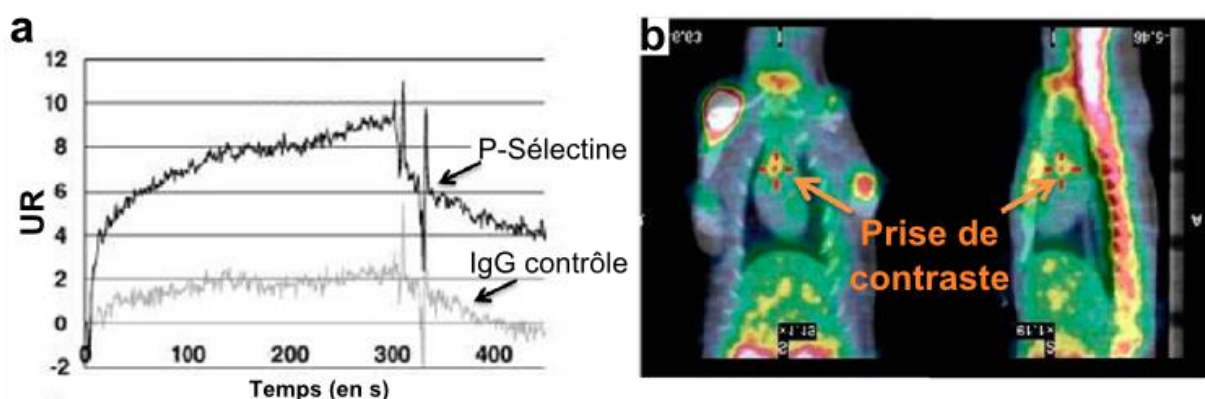


Figure 15 : (a) Sensogramme SPR obtenu avec une solution de fucoïdane injectée en flux sur une puce SPR sur laquelle sont greffées des protéines P-Sélectine ou des anticorps isotypiques (IgG contrôle) [80]. (b) Images TEMP d'un rat présentant une endocardite aortique après injection de fucoïdane radio-marqué au ^{99m}Tc [72].

Cette thèse s'inscrit dans la suite de ce projet et décrit la conception d'un nouvel outil d'imagerie moléculaire en combinant le ligand fucoïdane à un support de type nano/microparticules polysaccharides et à différents agents de contraste.

Stratégie du projet :

Une fois dressé l'état de l'art, nous avons les éléments pour orienter notre stratégie dans les différentes étapes de la conception d'un outil d'imagerie moléculaire.

Nous avons vu que la scintigraphie, l'IRM et l'échographie offraient des avantages et des inconvénients variés vis-à-vis de l'imagerie moléculaire (Cf. 2.1). La scintigraphie apporte la meilleure sensibilité de détection des agents de contraste et l'IRM permet une définition anatomique bien plus précise. Nous avons donc décidé de travailler en parallèle sur la mise au point de 2 outils d'imagerie moléculaire différents pour ces 2 modalités d'imagerie.

Nous avons ensuite abordé les différentes cibles moléculaires intéressantes pour notre projet et nous avons retenu la P-Sélectine (Cf. 2.2). Cette protéine d'adhésion moléculaire s'avère en effet être un bon candidat puisqu'elle est à la fois exprimée par les cellules endothéliales activées et par les plaquettes activées. Pour cette raison, cette protéine est spécifique des premières lésions de la paroi endothéliale et du thrombus riche en plaquettes.

Nous nous sommes enfin orientés vers un support de type micro/nanoparticule qui nous permettra d'optimiser les propriétés de ciblage et d'imagerie (Cf. 2.3). Afin de favoriser la biodégradabilité et la biocompatibilité, nous avons opté pour des matériaux polymères. Un procédé d'émulsion-réticulation va permettre de synthétiser un hydrogel sous la forme de micro/nanoparticules injectables (Cf. 3.1). Cet hydrogel sera composé de 3 polysaccharides d'origine naturelle : le dextrane, le pullulane et le fucoïdane. Ce dernier polysaccharide sulfaté présente une forte affinité pour la P-Sélectine et constituera l'agent ciblant de notre outil d'imagerie moléculaire (Cf. 3.2).

TRAVAUX DE THESES

Contexte :

Dans la première partie de ce manuscrit, la description des principales pathologies artérielles, de leur prépondérance et de leur prise en charge actuelle nous a permis d'identifier un problème clinique : la médecine d'aujourd'hui manque de techniques non invasives permettant leur diagnostic précoce.

Nous pensons que l'imagerie moléculaire peut apporter une solution à cette impasse médicale. En injectant dans la circulation sanguine un agent de contraste conjugué à un agent ciblant, cette méthode permettrait de révéler spécifiquement les toutes premières molécules exprimées par la paroi artérielle lésée. Cette stratégie a fait ses preuves en préclinique et nous avons décrit les différentes pistes prometteuses abordées.

Dans ce contexte, l'ambition de ce projet de thèse était de développer un nouvel outil d'imagerie moléculaire des pathologies artérielles.

Mes objectifs ont été les suivants :

1) Mettre au point une méthode permettant de synthétiser des microparticules polysaccharides :

- Présentant un diamètre adapté pour une injection dans la circulation sanguine.
- Fonctionnalisées en surface avec du fucoïdane afin d'assurer les propriétés de ciblage.
- Incorporant un agent de contraste propre à une modalité d'imagerie médicale.

2) Caractériser *in vitro* les microparticules afin de confirmer l'efficacité de la fonctionnalisation et de mesurer l'incorporation des agents de contraste.

3) Valider *in vivo* l'efficacité de l'outil d'imagerie moléculaire sur un modèle de pathologie artérielle chez le petit animal.

Nous décrirons dans un premier temps le protocole d'émulsion-réticulation qui nous a permis de répondre à notre premier objectif et de produire 2 outils de diagnostic propre à 2 modalités d'imagerie moléculaire : la tomographie par émission de positon (TEMP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous présenterons ensuite dans deux parties distinctes les deux projets correspondants aux 2 outils de diagnostic développés. La présentation de ces 2 projets sera axée sur 2 articles scientifiques, le premier publié dans *Theranostics* et le second soumis à *Acta Biomaterialia* regroupant chacun la caractérisation *in vitro* et la validation *in vivo* en imagerie petit animal sur un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) chez le rat en scintigraphie et en IRM respectivement.

Procédé d'émulsion-réticulation

Réaction de réticulation

Notre groupe de recherche a précédemment validé l'utilisation du trimétaphosphate de sodium (STMP) pour réticuler les chaînes solubles de pullulane et de dextrane en un hydrogel solide. La première étape de cette réaction consiste en l'ajout de NaOH à la solution aqueuse de polysaccharide pour transformer les groupes hydroxyles présents sur les chaînes polysaccharides en alcoolates. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante en condition alcaline, le STMP est ajouté. Les ions alcoolates réagissent avec les molécules cycliques du STMP qui vont s'ouvrir et finalement former des liaisons phosphates entre les groupes hydroxyles des différentes chaînes polysaccharides (Figure 16). Après 20 minutes d'incubation à 50°C, un réseau de réticulation s'est créé et un hydrogel solide est obtenu.

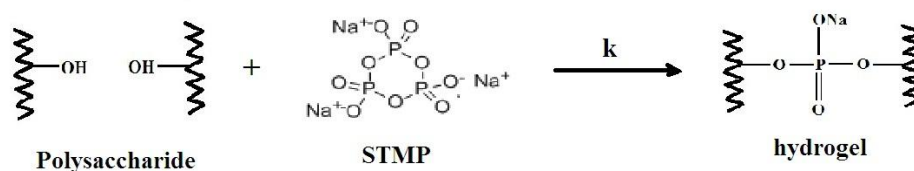


Figure 16. Réaction de réticulation des chaînes polysaccharides formant un hydrogel

Emulsion de type eau dans huile

Afin de façonner cet hydrogel sous forme de microparticules sphériques, nous avons eu recours à une technique d'émulsion.

Le principe de l'émulsion consiste à mélanger deux liquides non miscibles. On choisit généralement une phase aqueuse et une phase huileuse. A l'échelle macroscopique, le mélange paraît homogène mais en réalité, une des 2 phases s'est dispersée sous forme de micro-gouttelettes en suspension dans l'autre phase.

Cette méthode est très largement employée pour la fabrication de colloïdes mais dans la majorité des cas, il s'agit d'une émulsion de type huile dans eau. Dans notre cas, les polysaccharides sont solubles dans l'eau et nous avons donc opté pour une émulsion de type eau dans huile. Ainsi, à l'aide d'une tige de dispersion, nous formons des micro-gouttelettes de phase aqueuse contenant notre mélange de chaînes polysaccharides en émulsion dans une phase continue d'huile (nous utilisons de l'huile de colza commerciale).

En ajoutant juste avant l'étape d'émulsification le NaOH et le STMP et en incubant ensuite l'émulsion 20 minutes à 50°C, les micro-gouttelettes polysaccharides en phase aqueuse vont réticuler en hydrogel et ainsi former des microparticules sphériques solides.

Synthèse de microparticules injectables

Nous avons optimisé les différents paramètres de ce procédé d'émulsion-réticulation afin d'obtenir des microparticules présentant un diamètre adapté à une injection dans la circulation sanguine. Les plus petits capillaires du système vasculaire humain étant de 5 μm , il faut impérativement que les microparticules aient toutes un diamètre inférieur à 5 μm afin d'éviter l'occlusion vasculaire.

Pour cela, nous avons notamment ajouté des tensioactifs dans la phase continue de notre émulsion. Ces molécules amphiphiles permettent de modifier les tensions de surface entre les deux phases non miscibles et donc de modifier la dispersion de la phase en émulsion.

Nous avons également ajusté le ratio phase aqueuse/phase huileuse, baissé la température de l'huile à -5°C afin de ralentir la réaction de réticulation, paramétré la vitesse et le temps de dispersion et modifié la quantité d'agent réticulant.

Enfin, a posteriori, nous avons trié les suspensions obtenues par filtration et centrifugation afin d'affiner la distribution en taille.

En travaillant sur ces différents paramètres, nous sommes parvenus à établir un premier protocole permettant de produire des suspensions de microparticules polysaccharides présentant une distribution de taille reproductible et adaptée à une administration intraveineuse avec des diamètres hydrodynamiques centrés autour de 500 nm et avec un maximum toujours inférieur à 4 μm (Figure 17a). Ce protocole a été retenu pour le 1^{er} projet de cette thèse.

Pour le 2nd projet, nous avons ajusté la distribution de taille autour d'un diamètre moyen plus large (2,5 μm), avec un diamètre maximum de 10 μm (Figure 17b). Ces suspensions de microparticules légèrement plus larges nous ont permis d'optimiser l'incorporation de l'agent de contraste propre à l'IRM pondéré en T2* et d'étudier plus précisément le comportement *in vivo* de notre support polysaccharide. Il faudra toutefois garder à l'esprit que même si l'injection *in vivo* de ces microparticules chez le rat et la souris n'a engendré aucun problème apparent, elles présenteront tout de même un risque potentiel d'occlusion vasculaire pour une utilisation en clinique.

Rq : Pour les microparticules du projet 1, nous avons mesuré les diamètres hydrodynamiques des microparticules par diffusion dynamique de la lumière (NanoZS, Malvern Instruments). Pour celles du projet 2, les diamètres étant trop importants pour utiliser le même type de diffusion dynamique de la lumière, nous avons mesuré la distribution de taille sur des observations au microscope optique à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Image J, NIH).

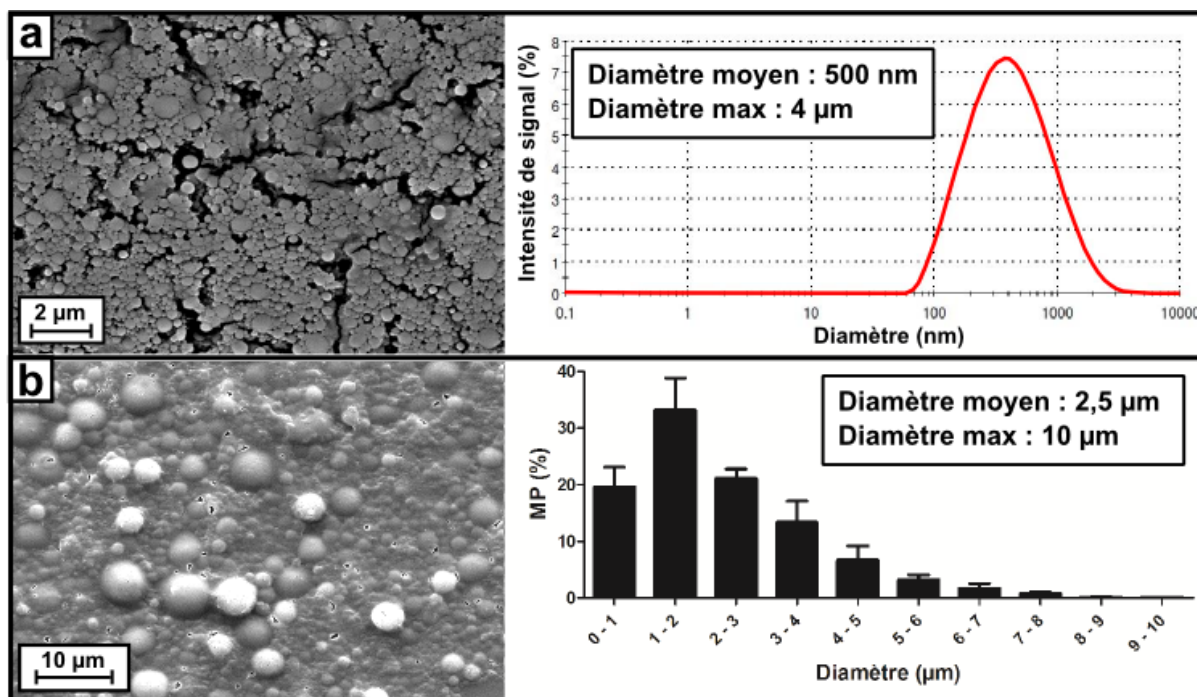


Figure 17. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des suspensions de microparticules obtenues avec le protocole retenu pour le projet 1 (a) et le protocole retenu pour le projet 2 (b) accompagnées des distributions de taille obtenues avec ces protocoles.

Fonctionnalisation et ajout d'agents de contraste

Une fois que nous avons obtenu notre support, nous avons travaillé d'une part sur une méthode pour le fonctionnaliser avec du fucoïdane et d'autre part pour y incorporer des agents de contraste.

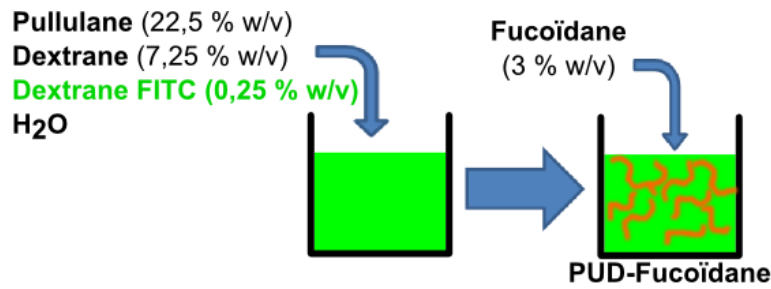
Le fucoïdane étant un polysaccharide, il présente aussi des groupes hydroxyles et pourra donc être réticulé de la même façon. Nous l'avons donc simplement solubilisé dans la phase aqueuse avec le pullulane et le dextrane afin qu'il soit présent dans les hydrogels sphériques obtenus.

Afin de pouvoir détecter les microparticules en fluorescence, nous avons dans un premier temps remplacé une partie du dextrane par des chaînes de dextrane identiques conjuguées à de l'isothiocyanate de fluorescéine (dextrane-FITC). Toutes les microparticules des 2 projets ont été préparées avec du dextrane FITC. Cela nous a permis de les observer en microscopie optique à fluorescence (en suspension ou en histologie sur les coupes d'AAA), en microscopie intravitale à fluorescence et de les détecter en cytométrie en flux.

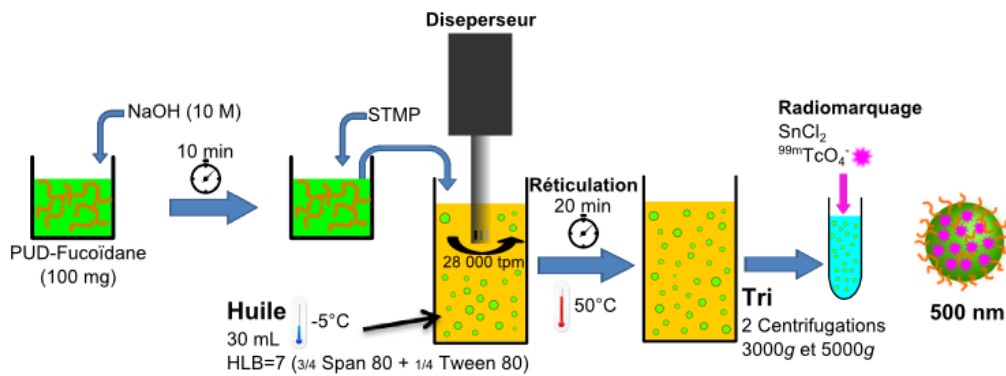
Nous avons ensuite développé un radio-marquage des microparticules avec du technétium 99m. L'association de ce radio-isotope se fait extemporanément sur une suspension de microparticules prête à être injectée par le biais d'une réaction de réduction en présence de SnCl_2 . L'outil d'imagerie TEMP ainsi mis au point fait l'objet du premier projet présenté dans ce manuscrit.

Nous avons enfin incorporé dans les microparticules polysaccharides des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (en anglais Ultrasmall Superparamagnetic Particle of Iron Oxide : USPIO). Nous avons utilisé des USPIO Sinerem[®], fourni par la compagnie Guerbet, qui sont, pour des raisons de stabilité, recouvertes à la surface par du dextrane. Ce recouvrement de dextrane nous a permis de greffer les USPIO aux chaînes polysaccharides via les liaisons triphosphates du STMP. L'incorporation de cet agent de contraste consiste simplement en la solubilisation des polysaccharides dans une suspension d'USPIO. La suite du protocole reste inchangé et nous obtenons au final des microparticules chargées en oxyde de fer (en anglais Microsized Particle of Iron Oxide : MPIO). Cette méthode nous a permis de développer un outil d'imagerie moléculaire en IRM pondérée en T_2^* qui a été étudié dans le 2nd projet.

La figure 18 ci-dessous résume sous forme de schéma les différentes étapes de la fabrication des microparticules radio-marquées au ^{99m}Tc (^{99m}Tc -MP-Fucoïdane) et des microparticules chargées en USPIO (MPIO-Fucoïdane).



Projet 1 : MP-Fucoïdane-^{99m}Tc



Projet 2 : MPIO-Fucoïdane

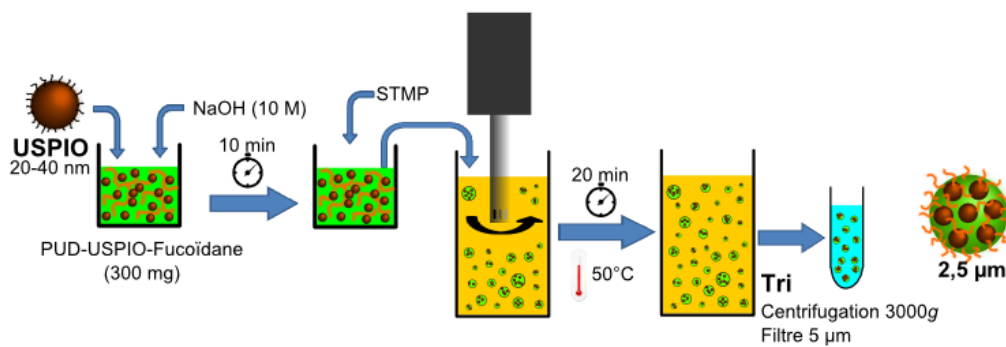


Figure 18. Schéma des procédés de fabrication des 2 outils d'imagerie moléculaire

Projet 1. Microparticules polysaccharides radiomarquées ciblant l'AAA chez le rat : nouvel outil pour l'imagerie TEMP

Avant propos

La première stratégie retenue pour le développement d'un outil d'imagerie moléculaire des pathologies artérielles a consisté en la combinaison des microparticules fonctionnalisées avec un radio-isotope.

L'imagerie nucléaire offre une détection extrêmement sensible des agents de contraste (de l'ordre du picomolaire [31]) et pour cette raison, la TEP et la TEMP sont les modalités d'imagerie qui se prêtent le mieux à l'imagerie moléculaire. Nous avons donc estimé judicieux de nous diriger vers ces modalités pour une première validation de notre outil.

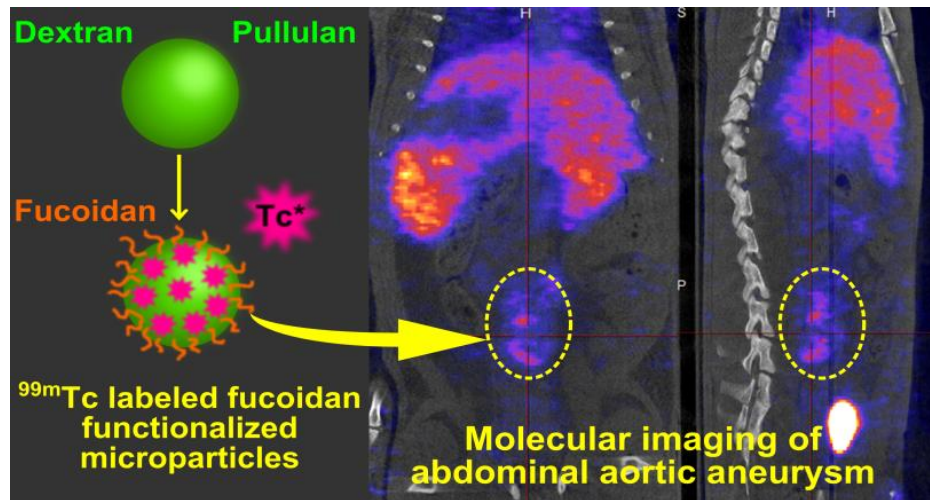
Malgré la moins bonne sensibilité de détection qu'elle apporte comparée à la TEP, nous avons fait le choix de la TEMP qui est moins coûteuse et plus largement disponible dans les services de médecine nucléaire. Elle présente pour cette raison un meilleur intérêt clinique. De plus, étant donné l'efficacité du ^{18}F -fluoro-deoxy-glucose (^{18}F -FDG) comme outil de diagnostic de l'anévrisme de l'aorte abdominale [49], développer un autre type d'outil d'imagerie moléculaire pour la TEP n'aurait qu'un intérêt limité.

Nous avons alors développé et validé un radiomarquage des microparticules polysaccharides au technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) qui est, comme nous l'avons expliqué dans la partie bibliographie, le radio-isotope le plus utilisé et le mieux adapté en TEMP. En suivant le protocole décrit précédemment, nous obtenons des suspensions de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdan qui présentent une distribution de taille entièrement inférieure à 4 μm , ce qui est idéal pour une injection intraveineuse.

Dans cette étude, après les avoir observées au microscope électronique à balayage et confirmé la présence de fucoïdane en surface, nous avons démontré, *in vitro* en cytométrie en flux, que nos microparticules fonctionnalisées ont une affinité spécifique pour la P-Sélectine exprimée par les plaquettes activées. Nous avons ensuite validé l'efficacité de cet outil d'imagerie moléculaire sur un modèle d'anévrisme en imagerie *in vivo* chez le petit animal. Nous avons pour cela injecté les $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdan dans la circulation sanguine de rats présentant des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) obtenue par perfusion d'élastase [122] et nous avons obtenu un signal au niveau de la pathologie en imagerie TEMP 30 minutes après l'injection.

Ce travail présente donc la fabrication et la validation préclinique d'un outil d'imagerie moléculaire capable de révéler en TEMP l'expression de la P-Sélectine au niveau de la paroi de l'AAA chez le rat. Les microparticules pourraient également être d'excellents moyens pour véhiculer un inhibiteur d'activité protéolytique directement dans la paroi dégradée de l'AAA. Cet outil couplerait alors une activité thérapeutique à l'apport diagnostique démontré et nous avons pour cette raison proposé cette étude au journal *Theranostics* qui l'a acceptée et la publiera en Mars 2014.

Graphical Abstract



An injectable polysaccharide based microparticle system was developed and used to reveal abdominal aortic aneurysms on rats with SPECT imaging. Microparticles were radiolabeled with ^{99m}Tc and functionalized with fucoidan to target activated endothelial cells.

Abdominal Aortic Aneurysms Targeted by Functionalized Polysaccharide Microparticles: a new Tool for SPECT Imaging

Thomas Bonnard^{1,3}, Gonord Yang¹, Anne Petiet², Véronique Ollivier¹, Oualid Haddad⁴, Denis Arnaud¹, Liliane Louedec¹, Laure Bachelet-Violette¹, Sidi Mohammed Derkaoui¹, Didier Letourneur^{1,3}, Cedric Chauvierre¹ and Catherine Le Visage¹

¹Inserm, U698, Cardiovascular Bio-Engineering; X. Bichat hospital, 46 rue H. Huchard, F-75018, Paris, France

²IFR 02, UFR de Médecine, site Bichat, Université Paris Diderot, F-75018, Paris, France

³Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93430, Villetaneuse, France

⁴UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93000, Bobigny, France

ABSTRACT

Aneurysm diagnostic is nowadays limited by the lack of technology that enables early detection and rupture risk prediction. New non invasive tools for molecular imaging are still required. In the present study, we present an innovative SPECT diagnostic tool for abdominal aortic aneurysm (AAA) produced from injectable polysaccharide microparticles radiolabeled with technetium 99m (99mTc) and functionalized with fucoidan, a sulfated polysaccharide with the ability to target P-Selectin. P-Selectin is a cell adhesion molecule expressed on activated endothelial cells and platelets which can be found in the thrombus of aneurysms, as well as in other vascular pathologies. Microparticles with a maximum hydrodynamic diameter of 4 μm were obtained by crosslinking the polysaccharides dextran and pullulan. They were functionalized with fucoidan. In vitro interactions with human activated platelets were assessed by flow cytometry that demonstrated a specific affinity of fucoidan functionalized microparticles for P-Selectin expressed by activated platelets. For in vivo AAA imaging, microparticles were radiolabeled with 99mTc and intravenously injected into healthy and AAA rats obtained by elastase perfusion through the aorta wall. Animals were scanned by SPECT imaging. A strong contrast enhancement located in the abdominal aorta of AAA rats was obtained, while no signal was obtained in healthy rats or in AAA rats after injection of non functionalized control microparticles. Histological studies revealed that functionalized radiolabeled polysaccharide microparticles were localized in the AAA wall, in the same location where P-Selectin was expressed. These microparticles therefore constitute a promising SPECT imaging tool for AAA and potentially for other vascular diseases characterized by P-Selectin expression. Future work will focus on validating the efficiency of the microparticles to diagnose these other pathologies and the different stages of AAA. Incorporation of a therapeutic molecule is also considered.

KEYWORDS: Fucoidan, P-Selectin, ^{99m}Tc, Ligand, Radiolabeled

INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a pathological dilatation of the abdominal aorta with a mortality associated to its rupture of approximately 90% [1, 2]. Nowadays, AAA is usually diagnosed by anatomical imaging techniques such as ultrasound, computed tomography and/or magnetic resonance imaging [3]. Limitations of these methods are that i) they only give anatomical and morphological information and ii) the arterial wall dilatation must be relatively advanced to clearly identify the pathology. Furthermore, it has been reported that the size measurement of the AAA is not sufficient for predicting its rupture [4]. Consequently, new non-invasive techniques enabling early identification and evaluation of the AAAs rupture risk are needed [5].

A recent strategy to fulfill these requirements is to produce injectable diagnostic tools that are able to target key molecules involved in early arterial process [3]. For this purpose, several biological markers of AAA development have been identified as potential targets of the pathology [6, 7]. Many molecular imaging probes of AAA are thus developed from various contrast agents targeted toward proteins such as elastin, collagen, matrix metalloproteinase or adhesion molecules like VCAM-1, ICAM and selectins [8-11].

In this work, we focused on adhesion molecules as they are expressed earlier in the inflammatory process than the other protein markers [12]. Among those, we selected P-Selectin which has the advantage to be present on platelets and endothelial cells on activation. The role of this key targeted molecule in AAA is not yet perfectly well established but it has been clearly identified to be involved in inflammatory cell recruitment in arterial diseases though the interaction with its counterreceptor P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 [13, 14]. For this reason, it is related with the renewal and growth of biologically active arterial thrombus and with the expansion of AAA [15, 16]. Revealing the expression of P-Selectin with a molecular imaging tool is therefore a promising clinically relevant strategy for AAA early detection, growth prevision and rupture risk assessment. Besides, several spherical injectable polymeric particles have been developed to target P-Selectin with promising binding and/or diagnostic properties. PLGA nanoparticles conjugated with the external fraction of glycoprotein Iba α showed great affinity for P-Selectin coated surfaces and for activated endothelial cell layer [17]. Van Kasteren *et al.* have imaged brain diseases with carbohydrate nanoparticles functionalized with natural complex glycan ligand of selectins [18]. McAteer *et al.* have developed microparticles of iron oxide conjugated with P-Selectin and VCAM-1 antibodies that revealed in vivo endothelial activation on MRI scans [19].

Molecular and functional imaging of AAA employs a wide variety of imaging modalities. A large amount of magnetic resonance imaging (MRI) dedicated functionalized contrast agent including ultrasmall superparamagnetic particle of iron oxide (USPIO) or gadolinium showed feasibility of AAA prone to rupture site identification [20]. All the other modalities are considered including ultrasound, computed tomography, optical imaging but the most promising seems to be nuclear imaging methods as they provides a highly sensitive detection of the injected radioactive imaging agent. 18F-fluoro-deoxy-glucose (18F-FDG) which reveals the metabolic cells on positron emission tomography (PET) enabled identification of focal inflammatory sites in AAA which may be correlated with AAA progression and rupture risk [21, 22]. However, this method as mean to predict AAA evolution is disputed [23]. Moreover, even if PET provides a better detection sensitivity than SPECT, 99mTc is the

most widely used radioisotope in nuclear medicine because of its physical characteristics: optimal gamma energy for SPECT imaging (140 keV) and short physical half-life ($T = 6.01$ h), allowing a low radiation burden to patients [24]. Several diagnostic tools of the AAA have thus been developed using ^{99m}Tc detection by SPECT. In 1976, Ryo *et al.* published the use of ^{99m}Tc labeled red blood cells for AAA detection [25]. Iwasaki *et al.* have developed in 2001 a diagnostic method for non invasive imaging of aortic dissection using ^{99m}Tc -labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats [26]. In 2006, Sarda-Mantel *et al.* imaged luminal thrombi in murine AAA with radiolabeled annexin V that specifically bind to phosphatidylserine exposed to the surface of apoptotic cells and activated platelets [27].

In our study, a particular interest was given to dextran and pullulan which are widely used in clinical applications [28]. An implantable biodegradable hydrogel for tissue engineering applications was obtained by crosslinking these polysaccharides [29, 30]. Since this hydrogel was not injectable, we herein developed a novel water-in-oil emulsification process combined to the crosslinking of dextran and pullulan in order to obtain injectable particles. Fucoidan, a sulfated polysaccharide derived from seaweed that happens to be an occurring mimic of sialyl Lewis X, the natural ligand of P-Selectin [31], was used to functionalize the particles. Our group previously demonstrated its ability to bind P-Selectin and developed a radiotracer by combining ^{99m}Tc to fucoidan [32, 33].

The aim of this study was to produce an efficient AAA diagnostic tool from an injectable polymeric device able to be combined with a contrast agent and to target the P-Selectin which is expressed in acute AAA. For this purpose, we have developed a microparticle system which is functionalized with fucoidan and radiolabeled with ^{99m}Tc . We demonstrate a strong SPECT contrast enhancement located in the abdominal aorta, revealing the presence of P-Selectin inside the aneurysm of an elastase induced AAA rat model. These microparticles could have clinical uses as a SPECT diagnostic tool for early detection and progression risk assessment of AAA and potentially other arterial diseases characterized by the expression of P-Selectin.

MATERIALS AND METHODS

Microparticles preparation

Polysaccharide microparticles (MP) were obtained from a previously described crosslinking protocol [34] coupled to a water-in-oil emulsification process.

Pullulan (9 g, MW 200,000 g/mol, Hayashibara Inc., Okayama, Japan), dextran (3 g, MW 500,000 g/mol, Sigma Aldrich, Fallavier, France) and FITC-dextran (100 mg, MW 500,000 g/mol, Sigma Aldrich) were solubilized in 40 mL of purified water. To prepare functionalized microparticles (MP-Fucoidan), 1.2 g of fucoidan (MW 57,000 g/mol, Sigma Aldrich) was blended into the mixture. Under alkaline condition (NaOH 2.3 M), 100 mg of this aqueous solution were mixed with 30 μL of trisodium trimetaphosphate (30% (w/v) in water, Sigma Aldrich). The whole aqueous phase was straight away slowly injected into 30 mL of cold (-5°C) colza oil containing 1.5 % (w/v) of a surfactant mixture of Span 80 (Sigma Aldrich) and Tween 80 (Fluka, Fallavier, France) with a ratio 75/25, and dispersed at 28,000 rpm for 2 min with a homogenizer (Polytron PT 3100, dispersing aggregate PT-DA 07/2EC-

B101, Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland). Next, this emulsion was transferred to an oven (50°C) wherein the crosslinking step took place for 20 minutes. The oil phase was then removed by phase separation and resulting microparticles were rinsed in PBS.

The suspension was centrifuged (BR4i, JOUAN S.A., Saint Herblain, France) for 10 minutes at 3,000 g, then the supernatant was centrifuged for 10 minutes at 5,000 g. The resulting pellet was suspended at 10 mg/mL in saline buffer and stored at 4°C until use.

Microparticles characterization

The surface morphology of MP and MP-Fucoidan particles was imaged using scanning electron microscopy (SEM) (Philips XL 30 ESEM-FEG, Hillsboro, OR, USA) on dried samples coated with a thin gold layer. Mean diameter, size distribution and zeta potential were analyzed by dynamic light scattering method (NanoZS, Malvern Instruments S.A., Orsay, France). Surface sulfur presence was evidenced by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (Philips XL 30 ESEM-FEG, Hillsboro, OR, USA) and global sulfur content was quantified by UV fluorescence spectroscopy (THERMO TN-TS 3000, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) on freeze-dried samples of MP, MP-Fucoidan and plain fucoidan. Fucoidan content in MP-Fucoidan was calculated from sulfur content in MP-Fucoidan and in fucoidan.

Hemolytic Toxicity Assay

Blood from healthy volunteers was collected in sodium citrate 3.8 % (w/v). Erythrocytes were separated from blood plasma by centrifugation (800 g, 5 min) and resuspended at 20 % (v/v) into distilled water, which was considered as producing 100 % hemolysis, and into normal saline producing no hemolysis acted as a blank. To reproduce the in vivo parameters, the same microparticle suspensions were assessed in a corresponding amount of blood (rats of 400 g average weight was considered to have a total blood volume of 24 mL). 5 µL of MP and 5 µL of MP-Fucoidan (5 mg/mL) were mixed with 500 µL of erythrocytes suspensions diluted in normal saline. All preparations were incubated for 1h at 37°C and centrifuged (3000 g, 5 min). Supernatants were taken and absorbance was measured at 540 nm. The percentage of hemolysis was determined for red blood cell samples incubated with MP, MP-Fucoidan and saline by comparing to water as 100% hemolytic sample. Results were expressed as mean values ± SEM (n=3).

Microparticles radiolabeling

Technetium-99m (99mTc) labeling required the reduction of pertechnetate by a reducing agent. Labeling of MP or MP-Fucoidan was carried out by mixing 0.030 mL of a 5 mM stannous chloride solution (reducing agent), 0.5 mL of microparticle suspension (10 mg/mL), 0.2 mL of Na⁺, 99mTcO₄⁻ corresponding to an activity of 370 MBq. After incubation for 1 h at room temperature, radiolabeled microparticles were separated from Na⁺, 99mTcO₄⁻ excess by centrifugation (5,000 g). In order to

determine radiolabeling efficiency, microparticle pellet and supernatant activities were measured in an activimeter (Medi 40, Medisystem, Guyancourt, France) Labeling efficiency is expressed as percentage of the ratio between radioactivity associated with the microparticles and total radioactivity.

To assess the labeling stability, the radiolabeled microparticles (99mTc-MP or 99mTc-MP-Fucoidan) were resuspended in 1 mL of 0.9 % NaCl or rat plasma, and incubated at room temperature for 3 hours. Every 60 minutes, microparticles suspension were centrifuged and radioactivity associated with particles and in the supernatant was measured (n=3). Stability was expressed as a percentage of the initial labeling.

For in vivo experiments, radiolabeled microparticles were resuspended in saline (5 mg/mL) and 200 μ L, corresponding to an activity of about 37 MBq, were administrated intravenously to rats.

In Vitro Binding Assays

Affinity of soluble fucoidan for P-Selectin was assessed with a BIAcore X100 (GE Healthcare, Freiburg Germany). A CM5 sensorchip was coupled with recombinant human P-Selectin and fucoidan or dextran solutions was successively injected at 0 M, 100 nM, 300 nM, 1 μ M and 3 μ M at a flow rate of 30 μ L/min. The response in resonance units (RU) was recorded as a function of time. The apparent binding affinities of fucoidan for P-Selectin were determined by analysis of the kinetic of the association assuming a 1:1 Langmuir model using BIAcore evaluation software, following a previously described protocol [33].

Affinity of fucoidan functionalized microparticles for P-Selectin expressed on the surface of activated human platelets was assessed by flow cytometry. Five mL of blood from healthy adult volunteers was collected in sodium citrate 3.8 % (w/v). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 120 g for 15 min and platelet concentration was adjusted at 2.108/mL with autologous platelet-poor plasma (PPP). Activated PRP was obtained by stimulation of PRP with 20 μ M of TRAP (thrombin receptor-activating-peptide). P-Selectin expression at the platelet surface was assessed using an anti human CD62P-FITC (0.11 mg/mL, Ancell, Bayport, MN, USA) and its isotype-matched control. In some experiments, a non-labeled anti human CD62P (1 mg/mL, Ancell) was used to block P-Selectin in activated PRP. To evaluate the binding of microparticles to platelet P-Selectin, 5 μ L of non activated PRP, activated PRP or anti P-Selectin-treated activated PRP were incubated for 20 minutes with 5 μ L of fluorescent (FITC) MP or MP-Fucoidan together with 5 μ L of PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD41a (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont De Claix, France) to label platelets. In addition each PRP sample was incubated with an isotype-matched control antibody.

Samples were analyzed on a LSRII flow cytometer (BD Bioscience Pharmingen), with 10,000 events collected per sample with area of double positivity reflecting the affinity of microparticles (FITC) for platelets (PE-Cy5). The data were processed with FACS DiVa software and the mean FITC fluorescence intensity (MFI) was measured in the area of double positivity. Results were presented as a ratio of MFI to the control MFI (MP incubated with PRP).

In vivo arterial disease model

The ability of the radiolabeled functionalized microparticles to target P-Selectin expression in vivo was assessed in an abdominal aortic aneurysm (AAA) experimental model in rats. All experimental procedures involving the use of rats were approved by the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute (Paris, France). The elastase model was performed on 8 male adult Wistar rats (7 weeks, CEJ) [35]. Animals were anesthetized with pentobarbital (1 $\mu\text{L/g}$ body weight). Porcine pancreatic elastase (2.7 mg/mL, Sigma Aldrich) was perfused into the lumen of an isolated segment of the infrarenal abdominal aorta for 15 minutes at a rate of 2.5 mL/h.

Two weeks after the surgery, when the animals present biologically active abdominal aorta aneurysm, characterized by the presence of intraluminal thrombus [36] and the expression of P-Selectin [27, 32], rats were injected with the microparticles and imaged. Injections of 200 μL of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP or $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdan (5 mg/mL) were performed slowly, to avoid aggregation, into the penis vein. Four healthy rats served as control experiments.

SPECT/CT Scan

Helical SPECT/CT scans were performed with 4-head camera multiplexing multipinhole camera (NanoSPECT/CT plus, Bioscan Inc, Paris, France).

Immediately, after injection of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP or $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdan, CT acquisition focused on the abdomen was started and 15 minutes after injection, SPECT imaging was performed in the same abdomen range. The SPECT acquisition was performed with the following parameters: helical scan with 28 projections per rotation plus circular scan at the beginning and at the end of the scan range, matrix size=256x256, zoom 1.14 (pixel size: 1 mm²), correction for energy, linearity and uniformity CT data were reconstructed using filtered back projection algorithm with Ram-Lak filter in plane (voxel size 147 x 147 μm^2) and slice thickness equal to 147 μm^2 . SPECT data were reconstructed using HiSPECT iterative reconstruction software on PC workstation. Images were visualized using the Bioscan InVivoScope software with co-registration of SPECT and CT images.

Reconstructed slices were visually assessed in 3 planes from same stereotaxic slices (sagittal slice, coronal slice 1 centered on abdominal aorta area and coronal slice 2 centered on AAA area) with and without CT coregistration to determine the presence of a focal uptake in the abdominal aorta according to the model. Quantification was performed on DICOM images with a DICOM processing software (OsiriX Imaging Software, Osirix, France) by calculating the ratio between the activity (mean counts) in the AAA area and in a normal region (background) on short-axis slices. The background activity was derived from a region of interest drawn over the renal aorta avoiding renal activity.

Autoradiography, histology and immunohistochemistry

Immediately after achievement of SPECT (60 minutes after injection) animals were sacrificed with pentobarbital overdose. Abdominal aorta aneurysms of AAA rats and healthy aorta of healthy control rats were removed, washed in 0.9 % saline and weighed. Radioactivity of AAA and healthy aorta was determined by gamma counting (COBRA II – Auto Gamma, Packard, Prospect, CT, USA) and the percentage of injected activity per gram was calculated. Then, aorta samples from AAA rats and control rats were frozen and cut into 20 µm thick frozen sections for autoradiography and 10 µm thick frozen sections for histology and immunochemistry studies. Autoradiographic images were obtained after 12 hours exposition of fifteen slides (corresponding to about 30 sections of AAA and 15 sections of healthy aorta) using a β-imager (Beta Imager™, Biospace Lab, Paris, France). Signal intensity values of regions of interest were assessed using a quantification software (M3 Vision, Biospace Lab, Paris, France). The ratio between activity (mean counts/mm² corrected for background) of the aneurysm sections and activity of the healthy abdominal aorta sections was calculated and compared statistically. These same sections were stained both with Masson trichrome to visualize cells, nuclei, and fibrin and with Alcian blue counter stained with nuclear red to reveal polysaccharide microparticles and cell nuclei. Immunohistochemistry studies were performed on 10 µm thick sections using goat mouse anti P-Selectin (4 µg/mL, Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany) as a primary antibody and IgG rabbit anti goat as a secondary antibody (1 µg/mL, Dako, Les Ulis, France) revealed by DAB enhancer (Dako) and counterstained with hematoxylin. Control sections were obtained by omitting the primary antibody. Observations were performed using light and fluorescent microscopy (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics France SARL, Massy, France).

Micro-autoradiography

Track of internal conversion electrons emitted during ^{99m}Tc deexcitation was revealed by microautoradiography method [37]. Briefly, 10 µm frozen sections of AAA and control rats were deposited on 1 µm thick gelatin-coated glass slides. Five hundred µl of nuclear emulsion K5 (Ilford photo Harman technology Ltd, Ilford, United Kingdom) were poured onto section slides to obtain a 25 µm thick coating. After 24 hours of exposition at 4°C, slides were developed for 20 minutes at 15 ± 1°C by Brussels formula developer (1.8 % (w/v) sodium sulphite, 0.08 % (w/v) potassium bromide, 0.45 % (w/v) amidol and 3.5 % boric acid) [38], rinsed in stop bath, fixed for 40 minutes, rinsed in tap water and finally dried dust free, overnight at room temperature. Then, microautoradiographed slides were stained with Alcian blue in order to compare localizations of electron tracks and polysaccharide microparticles on the same sections. Observation of electrons tracks and microparticles was performed using light microscopy (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics France SARL, Massy, France).

Statistical analysis

Flow cytometry results were analyzed statically with a one-way ANOVA with Bonferroni post tests to compare data obtained with MP-Fucoïdan and a two-way ANOVA with Bonferroni post tests to

compare data obtained with MP-Fucoidan and MP, performed with Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Other results were analyzed with unpaired Student's t-tests to compare 2 groups and one-way ANOVA with Bonferroni post test to compare 3 groups. A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

1. Characterization of polysaccharide microparticles

Polysaccharide microparticles were prepared by a chemical crosslinking process with STMP combined with an emulsion step. Functionalized microparticles (MP-Fucoidan) were obtained by adding the sulfated polysaccharide fucoidan.

MP (**Fig 1A**) and MP-Fucoidan (**Fig 1B**) both exhibited a spherical morphology and a smooth surface as shown on scanning electronic microscopy images. Dynamic light scattering measurement revealed that all microparticles had a hydrodynamic diameter smaller than $4 \mu\text{m}$ and a mean hydrodynamic diameter of $503 \pm 110 \text{ nm}$ and $358 \pm 60 \text{ nm}$ for MP and MP-Fucoidan, respectively (**Table 1**). Zeta potential was measured and microparticles prepared with fucoidan had a significantly higher electronegativity than control microparticles ($-16.2 \pm 0.8 \text{ mV}$ versus $-9.1 \pm 0.6 \text{ mV}$, respectively, $p < 0.05$) (**Table 1**). Global sulfur content was quantified by UV fluorescence spectroscopy, using MP and plain fucoidan (in powder) as negative and positive controls, respectively. MP-Fucoidan contained $1100 \pm 400 \text{ ppm}$ of sulfur. Since plain fucoidan contained 6.92% (w/w) of sulfur, we calculated the fucoidan content in MP-Fucoidan to be $1.64 \pm 0.57 \%$ (w/w). Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis showed the absence of sulfur at the surface of control MP and the presence of sulfur at the surface of the MP-Fucoidan (**Table 1**).

The possible toxicity induced by microparticles on red blood cells was assessed in vitro in the same conditions than in vivo administration. To reproduce these conditions, micro particle suspensions ($5 \mu\text{L}$ at 5 mg/mL) were mixed with $500 \mu\text{L}$ of erythrocytes. Hemolytic toxicity assay revealed that the MP and MP-Fucoidan suspensions lead to similarly low red blood cell lysis than normal saline ($2.00 \pm 0.31 \%$ for MP and $2.33 \pm 0.28 \%$ for MP versus $2.34 \pm 0.22 \%$ for normal saline, $n=3$, no significant differences).

2. In vitro affinity for P-Selectin

Binding of free fucoidan to P-Selectin was analyzed by Surface Plasmon Resonance. 57 kD fucoidan and 40 kD dextran, used as a non sulfated polysaccharide control, were flowed on a sensorchip coated with recombinant human P-Selectin. The interaction sensorgrams revealed that fucoidan binds to P-Selectin but dextran does not (**Fig S1**). Association (K_a), dissociation (K_d) and affinity (K_D) constants of fucoidan for P-Selectin, calculated using a 1:1 Langmuir binding model, were $2.5 \cdot 10^3 \text{ M}$, $3.2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ and $1.2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, respectively.

Interaction of non functionalized microparticles with non activated platelets (PRP), activated platelets (PRP + TRAP) and P-Selectin blocked platelets (PRP + TRAP + CD62P) was assessed and compared to the interaction of fucoidan functionalized microparticles (**Fig 1C**). First, a weak binding of non-functionalized microparticles for platelets was observed, whether they were incubated with activated, unactivated, or activated then blocked platelets, as shown by low values of mean fluorescence intensity (MFI). A weak binding was also noticed for fucoidan functionalized microparticles when incubated with unactivated platelets or with activated platelets blocked with anti P-Selectin, with ratios of MFI to the control MFI (MP incubated with PRP) of 1.0 ± 0.2 and 1.5 ± 0.2 respectively. In contrast, MP-Fucoidan exhibited a significantly higher MFI ratio with activated platelets, as compared to unactivated platelets or activated then blocked platelets ($p < 0.01$ in both cases). Interaction with platelets activated with TRAP was 8 times higher with fucoidan functionalized microparticles, as compared to non functionalized microparticles (MFI ratio of 8.5 ± 2.3 versus 1.1 ± 0.1 , respectively, $p < 0.001$).

Table 1. Characterization of microparticles. Particle size and zeta potential of polysaccharide microparticles (MP) and fucoidan functionalized microparticles (MP-Fucoidan) were measured by dynamic light scattering method (n=5). Global sulfur content and fucoidan content were determined by UV fluorescence spectroscopy (n=3) and surface sulfur presence was evidenced by EDX technique (n=3). Results are presented as mean values \pm SEM (MP versus MP-Fucoidan; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

	Particle size			Zeta potential (mV)	sulfur content (10^{-3} wt %)	fucoidan content (wt %)	sulfur (EDX)
	Mean hydrodynamic diameter (nm)	% < 1 μ m	% < 4 μ m				
MP	$503 \pm 110^*$	84 ± 9	100 ± 0	$-9.1 \pm 0.6^{**}$	$< 2^*$	$< 0.03^*$	-
MP-Fucoidan	358 ± 60	97 ± 2	100 ± 0	-16.2 ± 0.8	113 ± 39	1.64 ± 0.57	+

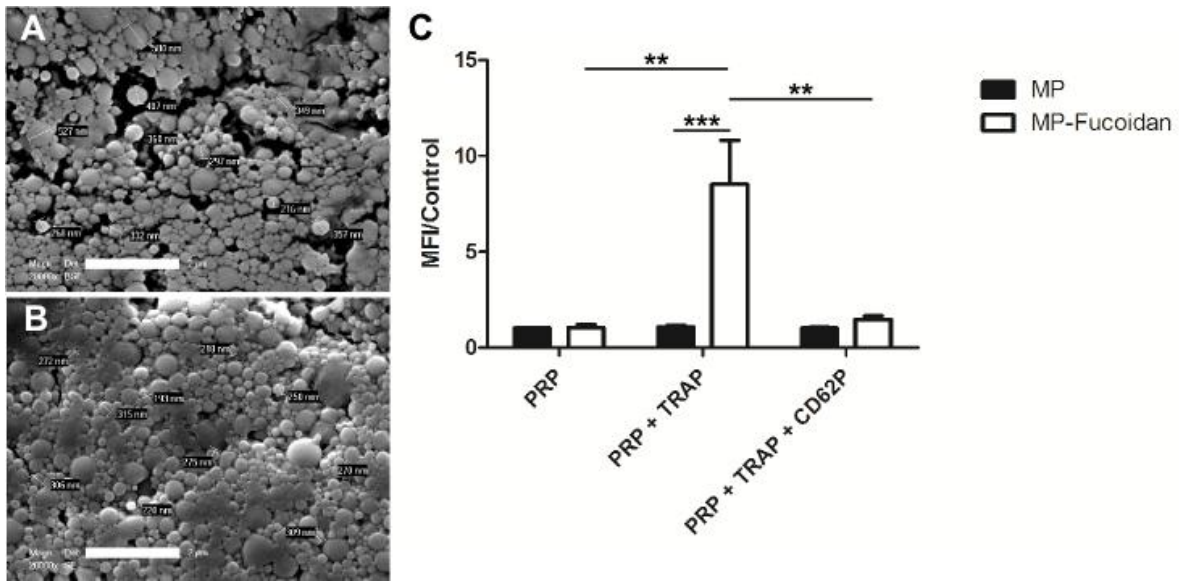


Figure 1. Scanning Electron Microscopy observation of MP (A) and MP-Fucoidan (B) microparticles. Scale bar 2 μ m. (C) Flow cytometry assessment of FITC fluorescent MP and FITC fluorescent MP-Fucoidan interaction with unactivated platelets rich plasma (PRP), platelets rich plasma activated with 20 μ M TRAP (PRP + TRAP), and platelets rich plasma activated with TRAP then P-Selectin blocked with 100 μ M anti-CD62P (PRP + TRAP + CD62P). The mean fluorescence intensity (MFI) was measured in the area of double positivity. Results are presented as a ratio of MFI to the control (MP incubated with PRP). Results are presented as mean values \pm SEM (n=5, ** p<0.01, *** p<0.001).

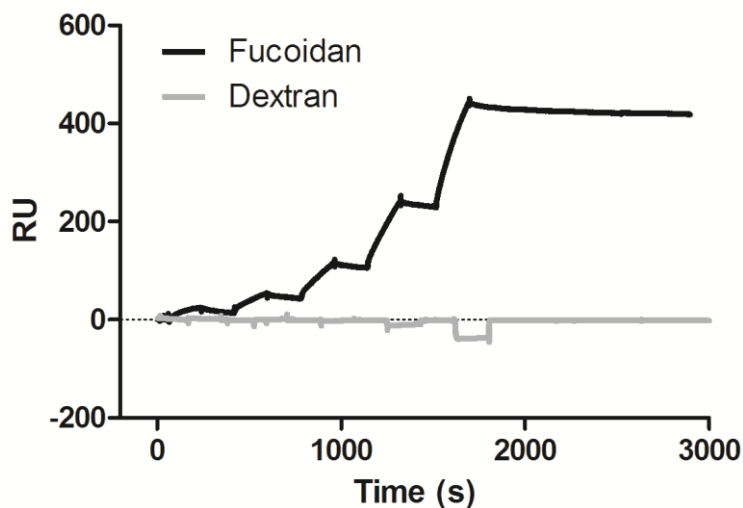


Figure S1. Representative surface plasmon resonance sensograms of fucoidan successively injected (0 M, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M) with a flow rate of 30 μ L/min over SPR CM5 sensorchips on which P-Selectin was immobilized. Dextran was used as a negative control. Association (K_a), dissociation (K_d) and affinity (K_D) constants of fucoidan for P-Selectin, calculated using a 1:1 Langmuir binding model, were $K_a=2.5 \cdot 10^3$ M, $K_d=3.2 \cdot 10^{-5}$ M and $K_D=1.2 \cdot 10^{-8}$ M.

3. Radiolabeling of microparticles

The ^{99m}Tc radiolabeling yield was $90.2 \pm 2.4 \%$ on MP-Fucoidan and $91.7 \pm 1.8 \%$ on MP. It was measured after each radiolabeling and mean values were not significantly different ($n=6$). Concerning the labeling stability (**Fig S2**), the measurements revealed that radioactivity was still associated to microparticles after three hours of incubation into saline (89 % of initial radioactivity for ^{99m}Tc -MP and 92 % for ^{99m}Tc -MP-Fucoidan). In plasma of rat, more than 75 % of radioactivity was still associated after 30 minutes of incubation and more than 50 % after 1 hour for both ^{99m}Tc -MP and ^{99m}Tc -MP-Fucoidan.

4. In vivo SPECT imaging

We evaluated the ability of the radiolabeled functionalized microparticles to target P-Selectin expression in vivo in an abdominal aortic aneurysm (AAA) experimental model in rats with SPECT-CT imaging (**Fig 2A**). While no enhancement was observed by SPECT 30 minutes after administration of ^{99m}Tc -MP to AAA rats or of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan to healthy rats, administration of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan to AAA rats showed a strong contrast enhancement in the area of the abdominal aorta (**Fig 2a**, arrow).

Uptake ratios were calculated from SPECT images by the ratio of the mean intensity value of the AAA region of interest (ROI) compared to the mean intensity value of the renal aorta ROI (**Fig 2B**). There was no uptake after administration of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan to healthy rats (ratio 1.03 ± 0.06) or administration of ^{99m}Tc -MP to AAA rats (ratio 1.22 ± 0.10), while a significant increase of the ratio uptake with administration of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan to AAA (ratio 3.49 ± 0.35 , $p < 0.01$ in both cases) was obtained.

Quantification of radioactivity was performed by gamma counting and results were expressed as a percentage of the injected activity per gram of tissue (**Fig 2C**). These results confirmed a significantly higher radioactivity accumulation after injection of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan into AAA ($0.12 \pm 0.01 \%$) as compared to ^{99m}Tc -MP injected to AAA ($0.04 \pm 0.01 \%$, $p < 0.001$) and ^{99m}Tc -MP-Fucoidan injected to healthy rats ($0.03 \pm 0.02 \%$, $p < 0.01$)

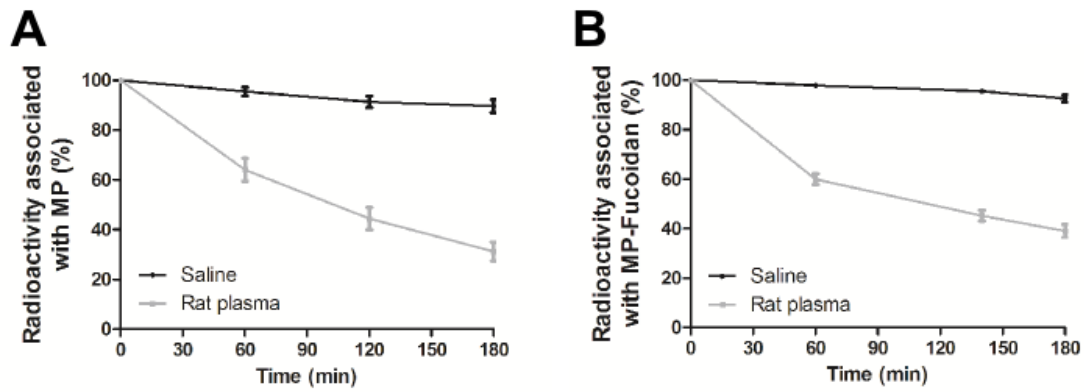


Figure S2. Radiolabeling stability of ^{99m}Tc -MP (A) and ^{99m}Tc -MP-Fucoidan (B) microparticles incubated in saline or rat plasma at room temperature, expressed as a percentage of initial radioactivity associated with microparticles as a function of time. Results are presented as mean values \pm SEM (n=3).

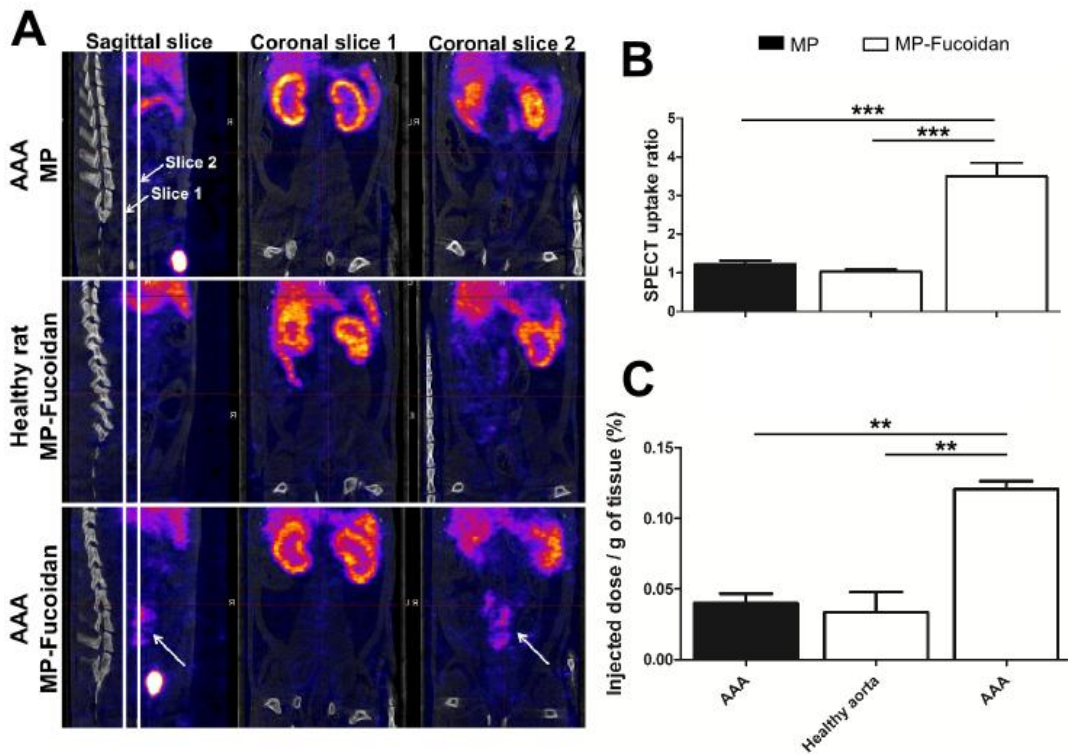


Figure 2. (A) Representative SPECT/CT scans of an AAA of rat after intravenous injection of ^{99m}Tc -MP, of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan in healthy rat, and of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan in AAA. Coronal slices 1 were centered on abdominal aorta areas and coronal slices 2 were centered on AAA areas. An important uptake was only noticed in the AAA area after injection of ^{99m}Tc -MP-Fucoidan in sagittal slice and coronal slice 2 (white arrows). (B) SPECT uptake was calculated by the ratio of the mean intensity value of the AAA region of interest (ROI) compared to the mean intensity value of the infrarenal

aorta ROI (n=3, SEM). (C) Accumulation of radiolabeled microparticles, expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue (n=3, SEM). (** p<0.01, *** p<0.001).

5. Localization of ^{99m}Tc-MP-Fucoidan within the AAA wall

We performed cryosections of both AAA and healthy aorta samples to analyze the fate of the functionalized microparticles. Autoradiography analysis (Fig S3) confirmed the presence of a radioactive signal 7 times stronger in the AAA wall as compared to healthy aorta wall 60 minutes after injection of ^{99m}Tc-MP-Fucoidan (0.36 ± 0.14 cpm/mm² versus 0.05 ± 0.02 cpm/mm², respectively, p<0.05, n=3 independent experiments). Histology staining was then performed on AAA cryosections. Masson trichrome staining (**Fig 3A**) confirmed the presence of a thrombus and a media layer of the degraded arterial wall. In inflamed areas where cells are activated and express P-Selectin (Fig 3b left image and negative control without primary antibody on the right), the presence of MP-Fucoidan was clearly identified in the arterial wall using Alcian blue staining (**Fig 3C**). This localization was confirmed by fluorescent microscopy, where green microparticles (prepared with FITC-dextran) were observed in the arterial wall, between the thrombus and the media layer (**Fig 3D**). Finally, micro-autoradiography coupled to Alcian blue and nuclear red staining (**Fig 3E**) showed electron tracks printed into the nuclear emulsion on the same blue polysaccharide spots, confirming colocalization of MP-Fucoidan with electron emission, i.e radioactivity.

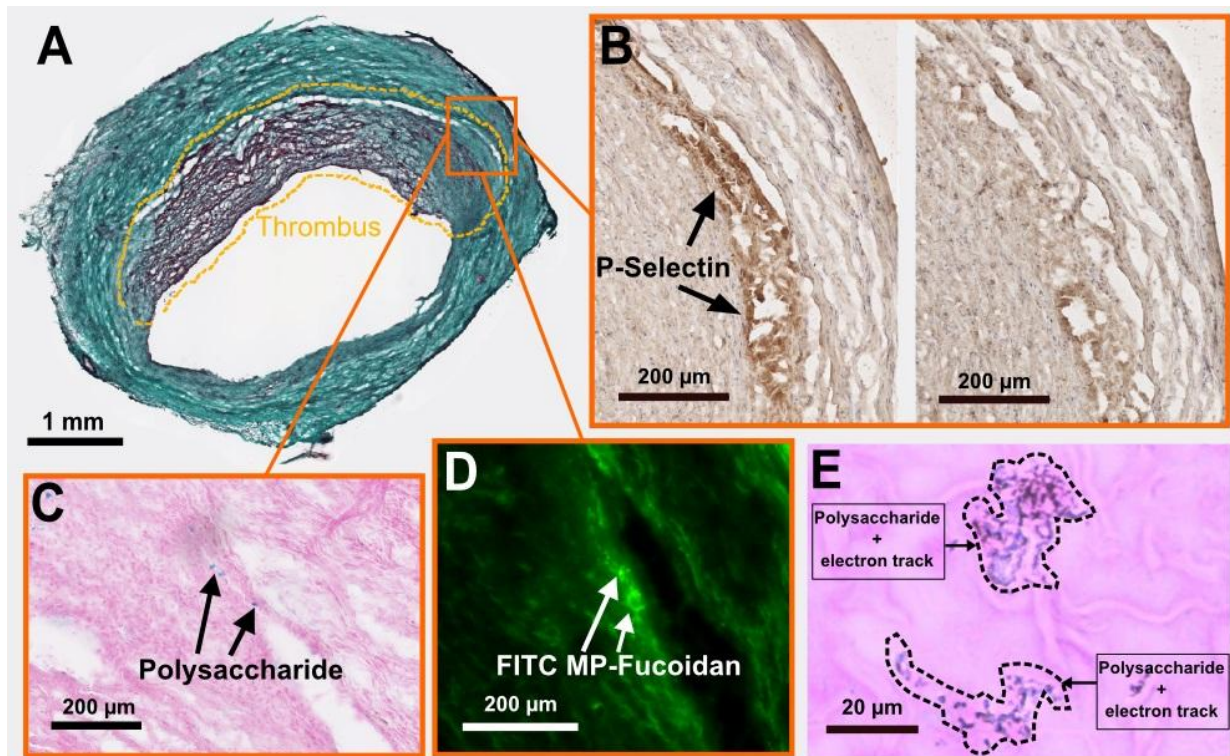


Figure 3. Histological analysis of an AAA cryosection. (A) Masson trichrome staining highlighting the thrombus area (dotted lines). (B) Immunostaining of P-selectin (black arrows, left), with control section without primary antibody shown on the right. (C) Alcian blue staining (with nuclear red counterstaining) showing polysaccharide MP-Fucoidan visualized in blue localized in the arterial wall (black arrows). (D) Fluorescence microscopy observation of FITC MP-Fucoidan microparticles in the arterial wall (white arrows). (E) Micro-autoradiography on the same sections than alcian blue staining demonstrated that electron dense signals were associated with polysaccharide microparticles (dotted lines). Scale bars: 1 µm (a), 200 µm (b,c,d) and 20 µm (E).

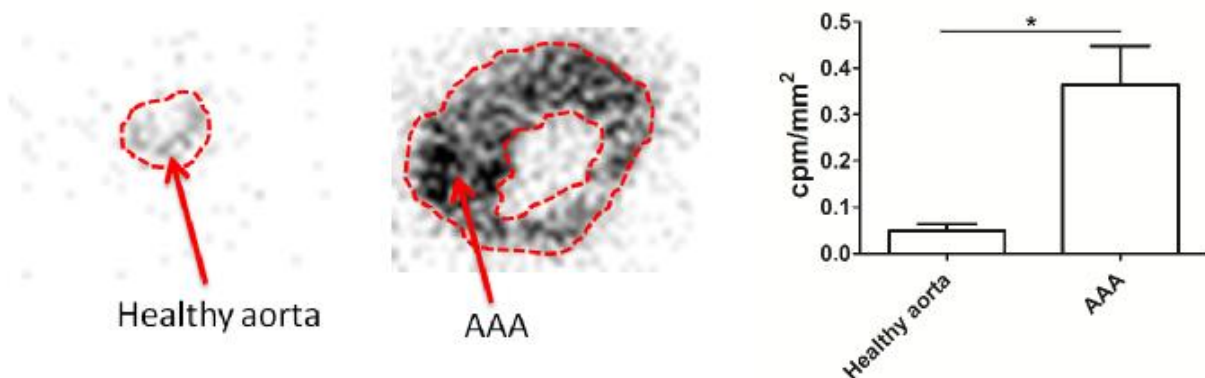


Figure S3. Autoradiography images of histological sections of abdominal aorta of healthy rats and of AAA rats 60 minutes after injection of ^{99m}Tc-MP-Fucoidan. Results were expressed in mean count per minute (cpm) per area of interest ± SEM (dotted lines, mm²) (n=3 rats per group, with at least 15 sections per rat, * p<0.05).

DISCUSSION

In this study, we described polysaccharides microparticles functionalized with fucoidan and ^{99m}Tc radiolabeled.

Our group previously developed tools for diagnostic of the abdominal aortic aneurysm (AAA) intraluminal thrombus with SPECT scan, using ^{99m}Tc radiolabeled Annexin V and ^{99m}Tc radiolabeled Fucoidan [27, 32]. Besides their ability to image the pathology, both of these systems used small molecules and it has been reported that injectable systems that present a bigger hydrodynamic diameter have many advantages as targeting devices. Having a longer circulation time [39, 40] and presenting many ligands [41, 42] at the surface of each single object, the binding at the pathological site would improve. One other advantage working with a microparticle system instead of small molecule is that the purification steps are easy to perform by a density gradient separation method. We could thus easily remove several forms of colloid technetium and free $^{99m}\text{TcO}_4^-$ that tend to distort the biodistribution of the radiopharmaceuticals [43, 44]. For all these reasons we have decided to develop a microparticle type diagnostic tool.

A functionalized polymeric injectable vehicle

The water-in-oil emulsion crosslinking method produced a reproducible distribution of microparticle size. SEM images showed that the functionalization of the microparticles did not have significant effect on surface morphology since both type of microparticles exhibit smooth surfaces. All microparticles were below 4 μm , though, microparticles prepared with fucoidan present a smaller hydrodynamic diameter (358 ± 60 nm versus 503 ± 110 nm, $p < 0.05$). We attribute this difference to the modification in the water-in-oil emulsion parameters due to the addition of fucoidan chains in the dispersed phase. First, it altered the total polysaccharide concentration in the water phase. Secondly, the fucoidan chains have a molecular weight of 57,000 g/mol which is small compared to dextran and pullulan chains that present a molecular weight of 500,000 g/mol and 200,000 g/mol respectively. It has been reported that decreasing the molecular weight of the polymers results in smaller particles for a water-in-oil emulsion process [45]. Finally, the fucoidan is a negatively charged polysaccharide and may modify the ionic strength of the system, known to have an influence on emulsions stability [46, 47]. The literature describes many other polymeric carriers also developed to target vascular diseases with sizes, from 100 nm to 5 μm of mean diameter [17, 48-51]. On the one hand, nanoscale vehicles offer lower risk of vascular occlusion and avoid phagocytosis [52, 53]. On the other hand, bigger vehicles over 500 nm would have a more adapted hemodynamic behaviour and have been reported as better candidates for targeting the wall in medium to large vessels relevant in several cardiovascular diseases [54-56]. Along these lines, the size distribution of our microparticles is well chosen as a compromise. They are not exclusively nanoscaled in order to improve the binding capacity and every single particle has a mean hydrodynamic diameter smaller than 4 μm to avoid vessel occlusion (the smallest human capillaries are about 5 microns). Moreover, hemolytic assay demonstrated that the developed polysaccharide microparticles are not toxic, at the described concentration, for red blood cells.

For targeting the AAA, we functionalized the microparticles with fucoidan polysaccharide chains. Before adding the ligand to the system, the binding capacity of the fucoidan used in this work was studied. The SPR analyses confirmed that plain fucoidan with a molecular weight of 57,000 g/mol, has a strong affinity for P-Selectin (KD = 12 nM). It exhibited a better affinity for P-Selectin than its natural ligand does (KD = 320 nM) [57].

Addition of fucoidan resulted in a significant decrease of the zeta potential (-9.1 ± 0.6 mV versus -16.2 ± 0.8 mV, $p < 0.01$) and an increase of the global amount of sulfur ($1.5 \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$ % wt versus $113 \pm 39 \cdot 10^{-3}$ % wt, $p < 0.05$). Furthermore, EDX analysis revealed sulfur presence at the surface of the microparticles. These results confirmed that fucoidan, which is an anionic sulfated polysaccharide [58], is present at the surface of the functionalized microparticles. We quantified the presence of fucoidan at 1.64 ± 0.57 % wt.

We then demonstrated that the functionalized microparticles have a strong affinity for human activated platelets. We measured by flow cytometry with functionalized microparticles a binding signal 7.7 higher than with non functionalized control microparticles (8.5 ± 2.3 MFI ratio versus 1.1 ± 0.1 MFI ratio, $p < 0.001$). For comparison, Modery *et al.* assessed by receptor-specific binding studies the affinity of liposomal nanoconstructs functionalized with EWVDV peptide for activated platelets and demonstrated a 5 times increase of binding magnitude versus control [59]. We also evidenced that this affinity is specific to the P-Selectin since we measured the same level of interaction with activated-then-P-Selectin-blocked platelets than with non activated platelets.

An efficient diagnostic tool of abdominal aortic aneurysm

The radiolabeled functionalized microparticles enabled a strong signal uptake in the aneurysm area of the AAA rats on SPECT 30 minutes after intravenous injections. The mean SPECT signal measured in the AAA areas was more than three times higher than the mean signal measured on the renal aorta whereas no enhancement was observed on SPECT of healthy rats 30 minutes after injection of the same radiolabeled functionalized microparticles (3.49 ± 0.35 versus 1.03 ± 0.06 , $p < 0.01$). Rouzet *et al.* measured a median ^{99m}Tc -fucoidan SPECT uptake ratio of 3.6, which means that fucoidan functionalized microparticle systems show similar diagnostic efficiency to the free radiolabeled fucoidan [32]. However, it appears that the areas of contrast uptake obtained in the AAA are larger with ^{99m}Tc -MP-Fucoidan than with ^{99m}Tc -fucoidan. In fact, when we compared the autoradiography analysis of cryosections of the harvested AAAs obtained in both cases, we evidenced that ^{99m}Tc -fucoidan brought a radioactive signal limited to the intraluminal thrombus of the AAA whereas ^{99m}Tc -MP-Fucoidan brought a signal to the whole aneurysm. Indeed, Rouzet *et al.* have reported that ^{99m}Tc -fucoidan uptake and retention are more localized in the thrombus itself. The size of the diagnostic device could explain this difference. These results emphasized the reported advantages of micro and nanoscale carriers for targeting vessel walls. While free fucoidan molecules could not detect the injured endothelial cells which were not in the thrombus, this new SPECT diagnostic microtool would present an improved binding capacity, as compared to free fucoidan molecules, and improved hemodynamic behaviour that favor a contrast to the entire AAA injured wall. This strategy to develop a diagnostic tool of a higher hydrodynamic diameter seems therefore highly relevant.

Actually, this research seems relevant regarding the other molecular imaging tools of AAA. Indeed, our radiolabeled microparticles resulted in a higher signal uptake of AAA wall, in acute stages AAA rat models, than the 18F-FDG tool in symptomatic AAA patients; uptake ratios of 3.5 was obtained with 99mTc-MP-Fucoidan versus 2.5 with 18F-FDG [21]. Our technology therefore exhibited better displays than a molecular imaging method validated by clinical trials.

Moreover, certain techniques requires a long time before reaching their targets. For instance, in magnetic resonance molecular imaging, macrophages accumulation sites imaging with USPIO and collagen imaging with targeted micelles incorporating gadolinium provides excellent contrast uptake in aneurysms, but only more than 30 hours after administration [10, 60]. Our method with a diagnostic in the 30 minutes following the tracer injection is obviously more convenient for clinical application.

We herein validated a molecular imaging tool of P-Selectin highly effective on acute AAA, and we will, in future studies, assess its ability to detect different stages and to predict the pathology growth.

A biomimetic targeting device

Histological analysis revealed that fluorescent 99mTc-MP-Fucoidan localized inside the AAA wall. Light microscopy observation of Alcian blue stained sections and fluorescent microscopy observation of adjacent sections show microparticles in the media layer. Micro-autoradiography analysis coupled with Alcian blue staining demonstrated that the emission of electron was correlated with the presence of polysaccharide. Immunostaining revealed expression of P-Selectin in the same AAA area where 99mTc-MP-Fucoidan accumulated. One hour after injection, the functionalized microparticles developed in this study seem to be able to penetrate inside the wall of the AAA. Accumulation in the inner wall of the AAA is similar to monocyte infiltration in the inflammatory cell recruitment involved in the pathology development [61, 62]. Indeed the microparticles accumulate in the same area where macrophages have been observed on rats elastase induced AAA [63] or on mice angiotensin II induced AAA [64]. It should be noticed that leukocytes express PSGL-1 [65, 66] and our microparticles are functionalized with fucoidan chains that present sulfated sites that mimic the PSGL-1 anchor sites. Hence this technology could be considered as leukocyte mimetic microparticles. The property to migrate inside the arterial wall of the AAA could be a drawback for this technology and this should be taken into consideration for future work. Nevertheless, the number of microparticles seen on tissue sections is limited as compared to the quantity of leukocytes involved in the physiopathology [62]. Furthermore, this localization of the microparticles could be useful for future applications which will consist in associating a therapeutic molecule to this targeting device. Indeed, it is well known that the arterial wall degradation in aneurysm is due to a pathological proteolytic activity that occurs within the media layer and a promising strategy to treat AAA is aiming to inhibit this proteolytic activity [6]. For instance, Yoshimura *et al.* obtained regression of AAA with c-Jun N-terminal kinase inhibitors which reduce MMP proteolytic activity and enhance tissue repair [67]. Liao *et al.* demonstrated that angiotensin-converting enzyme inhibitors prohibited the degradation of medial elastin in AAA development [68]. The herein developed microparticles would act as a carrier that would bring the proteolytic inhibitor drug directly inside the AAA wall, where the therapeutic activity is needed. Besides, this targeted proteolytic action has been seriously considered for theranostic applications [69, 70]. Moreover, this functionalized system targeted toward P-Selectin will certainly

exhibit a binding avidity reflecting the evolution of the pathology and therefore provide a mean to self adjust the amount of therapeutic molecules according to the inflammation degree.

Future works will then consist in selecting the most adapted proteolytic inhibitor(s) and develop a method for its incorporation into the polysaccharide microparticles and its controlled release. As the microparticles developed are composed by reticulated polysaccharide chains, the biodegradability of a similar hydrogel being observed in a month on injured sites [71], we will propose a technology based on biodegradability for the release of the drug. Since many peptide of interest are hydrophilic and have amino groups, we can easily trap them into the microparticles or graft them with a chemical conjugation through amine bonds [72] in order to combine the therapeutic molecule of interest to the polysaccharide microparticles.

CONCLUSION

We hereby developed an efficient polysaccharide based SPECT diagnostic tool for the abdominal aorta aneurysm (AAA). In this work, we firstly described its fabrication with an emulsion-crosslinking process, confirmed its hydrodynamic diameter distribution and the presence of fucoidan ligand at the surface and characterized the radiolabeled product. We then demonstrated in vitro by flow cytometry that this fucoidan-functionalized system specifically binds to the P-Selectin expressed by human activated platelets. Finally, we showed in vivo on rats its ability to reveal AAA by SPECT imaging and we studied its fate in the AAA wall by histology experiments. Future works will consist in testing the ability of this diagnostic tool to detect the earliest stages of the AAA and in the incorporation of a therapeutic molecule.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Inserm and University Paris 13. T. Bonnard is a recipient of the French Ministry of Higher Education and Research Scholarship (ED Galilée, University Paris 13). The authors would like to thank F. Nadaud (UTC Compiègne, France) for SEM images, EDX analyses and technical help and P. Jame (Service Centrale d'Analyse, Villeurbanne, France) for UV fluorescence spectroscopy measurements. We also acknowledge the financial support from ANR-12-EMMA-0020-01 "MicroSound", FP7 NMP-LA-2012-309820 "Nanoathero" and the Centre d'explorations fonctionnelles - Imagerie (CEFI, institut Claude Bernard).

COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interest exists.

REFERENCES

1. Van der Vliet JA, Boll AP. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 1997; 349: 863-6.
2. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8: 92-102.
3. Hong H, Yang Y, Liu B, Cai W. Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm: the present and the future. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010; 8: 808-19.
4. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation*. 2008; 118: 2382-92.
5. Wassef M, Upchurch GR, Jr., Kuivaniemi H, Thompson RW, Tilson MD, 3rd. Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *J Vasc Surg*. 2007; 45: 192-8.
6. Klink A, Hyafil F, Rudd J, Faries P, Fuster V, Mallat Z, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8: 338-47.
7. Annambhotla S, Bourgeois S, Wang X, Lin PH, Yao Q, Chen C. Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. *World J Surg*. 2008; 32: 976-86.
8. Bazeli R, Coutard M, Duport BD, Lancelot E, Corot C, Laissy JP, et al. In vivo evaluation of a new magnetic resonance imaging contrast agent (P947) to target matrix metalloproteinases in expanding experimental abdominal aortic aneurysms. *Invest Radiol*. 2010; 45: 662-8.
9. Choudhury RP, Fuster V, Fayad ZA. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3: 913-25.
10. Klink A, Heynens J, Herranz B, Lobatto ME, Arias T, Sanders HM, et al. In vivo characterization of a new abdominal aortic aneurysm mouse model with conventional and molecular magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58: 2522-30.
11. Makowski MR, Preissel A, von Bary C, Warley A, Schachoff S, Keithan A, et al. Three-dimensional imaging of the aortic vessel wall using an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Invest Radiol*. 2012; 47: 438-44.
12. Choudhury RP, Fisher EA. Molecular imaging in atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29: 983-91. doi:10.1161/atvbaha.108.165498.
13. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med*. 2004; 10: 171-8.
14. Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2004; 92: 459-66.
15. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1280-6.
16. Hannawa KK, Cho BS, Sinha I, Roelofs KJ, Myers DD, Wakefield TJ, et al. Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1085: 353-9.

17. Kona S, Dong JF, Liu Y, Tan J, Nguyen KT. Biodegradable nanoparticles mimicking platelet binding as a targeted and controlled drug delivery system. *Int J Pharm.* 2012; 423: 516-24.
18. van Kasteren SI, Campbell SJ, Serres S, Anthony DC, Sibson NR, Davis BG. Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 18-23.
19. McAteer MA, Mankia K, Ruparelia N, Jefferson A, Nugent HB, Stork LA, et al. A leukocyte-mimetic magnetic resonance imaging contrast agent homes rapidly to activated endothelium and tracks with atherosclerotic lesion macrophage content. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1427-35.
20. Ramaswamy AK, Hamilton M, 2nd, Joshi RV, Kline BP, Li R, Wang P, et al. Molecular imaging of experimental abdominal aortic aneurysms. *Scientific World Journal.* 2013; 2013: 973150.
21. Reeps C, Essler M, Pelisek J, Seidl S, Eckstein HH, Krause BJ. Increased 18F-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. *J Vasc Surg.* 2008; 48: 417-23; discussion 24.
22. Sakalihan N, Hustinx R, Limet R. Contribution of PET scanning to the evaluation of abdominal aortic aneurysm. *Semin Vasc Surg.* 2004; 17: 144-53.
23. Kotze CW, Groves AM, Menezes LJ, Harvey R, Endozo R, Kayani IA, et al. What is the relationship between (1)(8)F-FDG aortic aneurysm uptake on PET/CT and future growth rate? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011; 38: 1493-9.
24. Zolle I, Mazzi U, Spies H, Pietzsch HJ, Bringhammar T, Mallol J, et al. Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. Vienna, Austria: Springer; 2007.
25. Ryo UY, Pinsky SM. Radionuclide angiography with 99m technetium-RBCs. *CRC Crit Rev Clin Radiol Nucl Med.* 1976; 8: 107-28.
26. Iwasaki T, Aihara Y, Kanda T, Oriuchi N, Endo K, Katoh H, et al. Immunoscintigraphy of aortic dissection with 99mTc-labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats. *J Nucl Med.* 2001; 42: 130-7.
27. Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud JM, Hervatin F, et al. 99mTc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2153-9.
28. Aguilar F, Autrup H, Barlow S, Castle L, Crebelli R, Dekant W, et al. Use of lycopene as a food colour. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *Europ Food Saf Authority J.* 2008: 1-66.
29. Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2013; 34: 2947-59.

30. Shi L, Aid R, Le Visage C, Chew SY. Biomimicking polysaccharide nanofibers promote vascular phenotypes: a potential application for vascular tissue engineering. *Macromol Biosci.* 2012; 12: 395-401.
31. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules.* 2008; 13: 1671-95.
32. Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, et al. Radiolabeled Fucoidan as a P-Selectin Targeting Agent for In Vivo Imaging of Platelet-Rich Thrombus and Endothelial Activation. *J Nucl Med.* 2011; 52: 1433-40.
33. Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2009; 1790: 141-6.
34. Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G, Le Visage C. Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci.* 2012; 12: 901-10.
35. Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation.* 1990; 82: 973-81.
36. Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel JB. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res.* 2010; 47: 355-66.
37. Robinson MS, Colas-Linhart NC, Guiraud-Vitoux FM, Petiet AM, Bok BD. Heterogeneous distribution of technetium-99m-labeled microspheres in rat lungs: microautoradiographic evidence and dosimetric consequences. *J Nucl Med.* 1997; 38: 650-4.
38. Limited Ht. Fact sheet ILFORD nuclear emulsions. Technical information for particle physics applications. Town Lane: Ilford; 2005. p. 5.
39. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions. *Mol Pharm.* 2010; 7: 1899-912.
40. Svenson S. Theranostics: are we there yet? *Mol Pharm.* 2013; 10: 848-56.
41. Jung H, Robison AD, Cremer PS. Multivalent ligand-receptor binding on supported lipid bilayers. *J Struct Biol.* 2009; 168: 90-4.
42. Wang X, Ramstrom O, Yan M. Glyconanomaterials: synthesis, characterization, and ligand presentation. *Adv Mater.* 2010; 22: 1946-53.
43. Vallabhajosula S, Killeen RP, Osborne JR. Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. *Semin Nucl Med.* 2010; 40: 220-41.
44. Petit WA, DeLand FH, Pepper GH, Blanton L. Characterization of tin-technetium colloid in technetium-labeled albumin preparations. *J Nucl Med.* 1978; 19: 387-92.
45. Diez S, Tros de Ilarduya C. Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 63: 188-97.

46. Gu YS, Regnier L, McClements DJ. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin-*iota*-carrageenan membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2005; 286: 551-8.
47. Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ. Influence of pH and ionic strength on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by beta-lactoglobulin-alginate interfaces. *Biomacromolecules.* 2006; 7: 2052-8.
48. Sakhalkar HS, Hanes J, Fu J, Benavides U, Malgor R, Borruso CL, et al. Enhanced adhesion of ligand-conjugated biodegradable particles to colitic venules. *FASEB J.* 2005; 19: 792-4.
49. Omolola Eniola A, Hammer DA. In vitro characterization of leukocyte mimetic for targeting therapeutics to the endothelium using two receptors. *Biomaterials.* 2005; 26: 7136-44.
50. Simone EA, Zern BJ, Chacko AM, Mikitsh JL, Blankemeyer ER, Muro S, et al. Endothelial targeting of polymeric nanoparticles stably labeled with the PET imaging radioisotope iodine-124. *Biomaterials.* 2012; 33: 5406-13.
51. Song C, Labhasetwar V, Cui X, Underwood T, Levy RJ. Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J Control Release.* 1998; 54: 201-11.
52. Champion JA, Walker A, Mitragotri S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res.* 2008; 25: 1815-21. doi:10.1007/s11095-008-9562-y.
53. Eniola-Adefeso O, Heslinga MJ, Porter TM. Design of nanovectors for therapy and imaging of cardiovascular diseases. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2012; 8: 13-7.
54. Charoenphol P, Huang RB, Eniola-Adefeso O. Potential role of size and hemodynamics in the efficacy of vascular-targeted spherical drug carriers. *Biomaterials.* 2010; 31: 1392-402.
55. Shinde Patil VR, Campbell CJ, Yun YH, Slack SM, Goetz DJ. Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophys J.* 2001; 80: 1733-43.
56. Charoenphol P, Mocherla S, Bouis D, Namdee K, Pinsky DJ, Eniola-Adefeso O. Targeting therapeutics to the vascular wall in atherosclerosis--carrier size matters. *Atherosclerosis.* 2011; 217: 364-70.
57. Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Biol Chem.* 1998; 273: 32506-13.
58. Dore CM, das CFAMG, Will LS, Costa TG, Sabry DA, de Souza Rego LA, et al. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydr Polym.* 2013; 91: 467-75.
59. Modery CL, Ravikumar M, Wong TL, Dzuricky MJ, Durongkaverroj N, Sen Gupta A. Heteromultivalent liposomal nanoconstructs for enhanced targeting and shear-stable binding to active platelets for site-selective vascular drug delivery. *Biomaterials.* 2011; 32: 9504-14.
60. Sadat U, Taviani V, Patterson AJ, Young VE, Graves MJ, Teng Z, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of abdominal aortic aneurysms--a feasibility study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011; 41: 167-74.

61. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6: 543-52.
62. Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3012-24.
63. Palmieri D, Pane B, Barisione C, Spinella G, Garibaldi S, Ghigliotti G, et al. Resveratrol counteracts systemic and local inflammation involved in early abdominal aortic aneurysm development. *J Surg Res.* 2011; 171: e237-46.
64. Yao Y, Wang Y, Zhang Y, Li Y, Sheng Z, Wen S, et al. In vivo imaging of macrophages during the early-stages of abdominal aortic aneurysm using high resolution MRI in ApoE mice. *PLoS One.* 2012; 7: e33523.
65. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996; 88: 3259-87.
66. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J.* 1997; 14: 585-91.
67. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, et al. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med.* 2005; 11: 1330-8.
68. Liao S, Miralles M, Kelley BJ, Curci JA, Borhani M, Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg.* 2001; 33: 1057-64.
69. Lee S, Kim K. Protease activity: meeting its theranostic potential. *Theranostics.* 2012; 2: 125-6.
70. Choi KY, Swierczewska M, Lee S, Chen X. Protease-activated drug development. *Theranostics.* 2012; 2: 156-78.
71. Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L, Mougenot N, et al. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18: 35-44.
72. Sivasubramanian M, Thambi T, Park JH. Mineralized cyclodextrin nanoparticles for sustained protein delivery. *Carbohydr Polym.* 2013; 97: 643-9.

Projet 2. Microparticules polysaccharides chargées en oxyde de fer (MPIO) présentant un comportement mimant les leucocytes imagé *in vivo* en IRM et en microscopie intravitale

Avant propos

Le second projet de cette thèse a consisté en l'incorporation dans notre support polysaccharide de nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (USPIO, Sinerem[®], Guerbet) afin de détecter les microparticules en IRM pondérée en T_2^* . Nous avons développé des microparticules polysaccharides chargées en oxyde de fer (MPIO) et fonctionnalisées avec des chaînes de fucoïdane en suivant le 2nd protocole décrit dans la 1^{ère} partie du chapitre travaux de thèse.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) offre une excellente définition spatiale, avec notamment un bon contraste des tissus mous, qui apporte à l'imagerie moléculaire des pathologies artérielles une observation anatomique meilleure que les autres modalités d'imagerie. Ainsi, même si l'IRM est caractérisée par une sensibilité de détection des agents de contraste plus faible que la TEMP, cette méthode va nous permettre de localiser plus précisément la prise de contraste apportée par notre outil d'imagerie moléculaire.

Dans ce 2nd projet, nous souhaitons également approfondir l'étude du comportement *in vivo* de notre outil d'imagerie. L'incorporation d'oxyde de fer nous a permis de suivre dans un premier temps en IRM l'accumulation des MPIO-Fucoïdane dans la paroi d'anévrismes de l'aorte abdominale (AAA). Dans un second temps, nous avons étudié l'interaction des microparticules fonctionnalisées avec un endothélium activé en microscopie intravitale à fluorescence.

D'autre part, les travaux du 1^{er} projet ont révélé une caractéristique très intéressante du processus de ciblage de notre système ; nous avons observé sur les coupes histologiques d'AAA qu'après injection les microparticules s'accumulent à l'intérieur de la paroi anévrismale, et non simplement en surface. Nous avons alors formulé l'hypothèse que cette localisation bien particulière s'expliquerait par un mécanisme apparenté à la migration transmembranaire des leucocytes mis en œuvre lors du processus inflammatoire contribuant à la formation de l'anévrisme [19, 123].

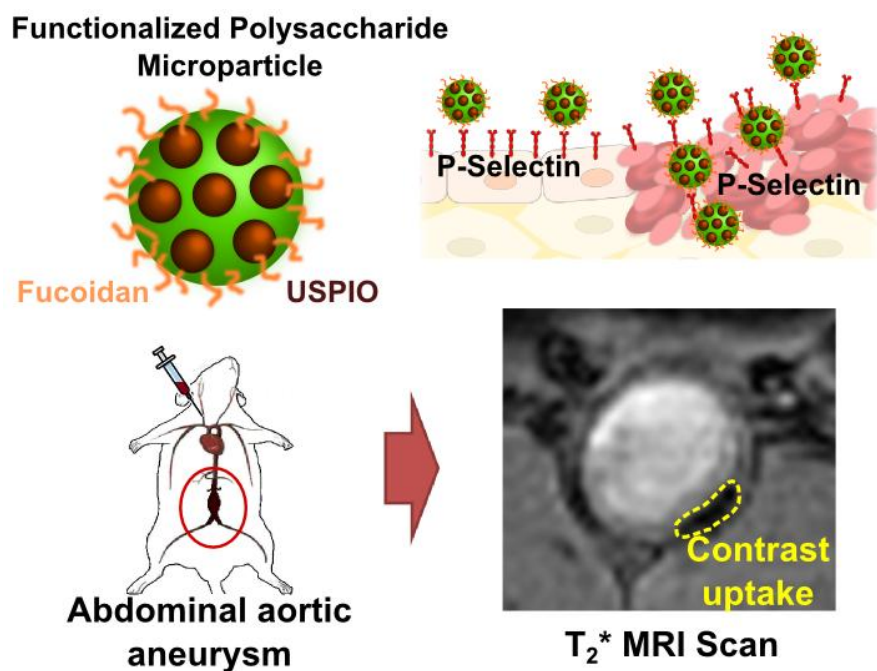
En effet, les chaînes de fucoïdane présentent des sites sulfatés mimant le site d'accroche de la P-Sélectine Glycoprotéine Ligand-1 (PSGL-1) qui est le ligand naturel de la P-Sélectine et qui, étant présent à la surface des leucocytes, permet leur recrutement au niveau des parois artérielles pathologiques caractérisées par l'expression de la P-Sélectine [110, 124]. Par conséquent, nous pensons que nos microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane constituent des mimes de leucocytes.

Dans cette étude, nous avons donc développé et caractérisé des microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane et chargées en oxyde de fer. Nous avons confirmé *in vitro* leur spécificité pour la P-Sélectine et leur propriété superparamagnétique. Le comportement dynamique du mécanisme d'adhésion des microparticules à un endothélium activé a ensuite été étudié par microscopie

intravital à fluorescence sur un modèle d'activation endothéliale induit par ionophore de calcium sur le mésentère de souris. Nous avons enfin validé leur efficacité comme outil IRM d'imagerie moléculaire de l'anévrisme sur le modèle d'AAA induit par perfusion d'élastase chez le rat. Ces études *in vivo* ont confirmé que les microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane ont un comportement apparenté à celui des leucocytes. En effet, nous avons d'une part confirmé le phénomène de migration dans la paroi anévrismale et d'autre part observé qu'après leur adhésion, les microparticules avancent lentement le long d'un endothélium activé, exhibant ainsi un comportement proche du phénomène de « rolling » caractéristique des leucocytes.

Nous avons choisi de présenter cette technologie comme des mimes de leucocytes en polysaccharides et de soumettre cette étude au journal *Acta Biomaterialia*.

Graphical Abstract



Leukocyte Mimetic Polysaccharide Microparticles tracked *in vivo* on Activated Endothelium and in Abdominal Aortic Aneurysm

Bonnard Thomas^{a,b}, Serfaty Jean-Michel^c, Journée Clément^c, Ho Tin Noe Benoît^a, Arnaud Denis^a, Louedec Liliane^a, Derkaoui Mohammed^a, Letourneur Didier^{a,b}, Chauvierre Cédric^{a,b}, Le Visage Catherine^{a,b}

^aInserm, U698, Cardiovascular Bio-Engineering, X. Bichat hospital, 46 rue H. Huchard, F-75018, Paris, France

^bInstitut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, F-93430 Villetaneuse, France

^cIFR 02, UFR de Médecine, site Bichat, Université Paris Diderot, F-75018 Paris, France

ABSTRACT

We have developed injectable microparticles functionalized with fucoidan, in which sulfated groups mimic the anchor sites of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1), one of the main receptor supporting leukocyte adhesion. These targeted microparticles were combined to a fluorescent dye and a T_2^* MRI contrast agent, and then tracked *in vivo* with small animal imaging methods. Microparticles of 2.5 μm were obtained by a water-in-oil emulsification combined with a cross-linking process of polysaccharides dextran, fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran, pullulan and fucoidan mixed with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide (USPIO). Fluorescent intravital microscopy observation revealed the dynamic adsorption and a leukocyte like behaviour of fucoidan functionalized microparticles on a calcium ionophore induced activated endothelial layer of a mouse mesentery vessel. We observed 20 times more adherent microparticles on the activated endothelium area after the injection of functionalized microparticles compare to non functionalized microparticles (197 ± 11 MP-Fucoidan versus 10 ± 2 MP). This imaging tool was then administered to rats presenting an elastase perfusion model of abdominal aortic aneurysm (AAA) and 7.4 T *in vivo* MRI was performed. Visual analysis of T_2^* -weighted MR images showed a significant contrast enhancement on the inner wall of the aneurysm from 30 minutes to 2 hours after the injection, compared to pre-injection images. Histological analysis of AAA cryosections revealed microparticles localized inside the aneurysm wall, in the same areas as immunostaining show P-selectin expression. The developed leukocyte mimetic imaging tool could therefore be relevant for molecular imaging of vascular diseases and for monitoring biologically active areas prone to rupture in AAA.

KEY WORDS: Fucoidan, P-Selectin, MRI, Intravital microscopy

INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysm (AAA) has a prevalence of 4 to 7 % in men older than 65 and a mortality rate associated to its rupture of more than 80 % [1, 2]. New non invasive techniques to improve this pathology diagnostic and its rupture risk prediction are needed [3]. Magnetic resonance imaging (MRI) provides high spatial and temporal resolution observations and has become an imaging modality of choice for AAA diagnostic [4, 5]. However, it only gives anatomical information and the size of an AAA has been reported as not sufficient to predict the rupture [6]. To increase the capabilities of MRI, an area of research aims to develop injectable contrast agents that enable molecular characterization and identification of the disease [7].

The progression of aneurysm is known to be associated with proteolytic degradation of the vascular wall. It mainly involves thrombus-trapped blood-borne and leukocyte derived proteases infiltration into the arterial wall which are responsible for a local and massive proteolytic activity [8]. It has been reported that these highly biologically active sites lead to focal wall weakening and finally to rupture [9, 10]. Monitoring leukocytes accumulation is therefore interesting for non invasive assessment of aneurysm rupture risk.

The recruitment of inflammatory cells into arterial wall is mediated by adhesion molecules, expressed by endothelium on activation, such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) or P and E-Selectins [11]. Among these key molecules which constitute relevant targets for molecular imaging of vascular diseases, we selected P-Selectin since it is also expressed by activated platelets, the major cell constituent of the AAA thrombus. P-Selectin is thus linked with both the renewal and growth of biologically active arterial thrombi and the inflammatory process which associated with aneurysm expansion [12, 13].

Several molecular magnetic resonance imaging tool designed as leukocyte mimetic have been developed to highlight acute inflammatory sites. Nanomicelles encapsulating superparamagnetic particle of iron oxide (SPIO) targeted toward ICAM-1 permitted in vivo imaging of acute inflammation [14]. Macrophage lesion areas on an atherosclerosis mouse model have been revealed with dual ligand anti VCAM-1 and anti P-Selectin functionalized microparticles of iron oxide (MPIO) [15].

In the present study, we propose a leukocyte mimetic probe targeted toward P-Selectin. For this purpose, we elaborated injectable polysaccharide microparticles from a water-in-oil emulsion process combined to a previously described crosslinked hydrogel preparation [16, 17]. We functionalized the microparticles with fucoidan, a seaweed derived polysaccharide whose sulfated chains mimic the anchor sites of P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) and have a strong affinity for P-Selectin [18, 19]. PSGL-1 is present on the surface of leukocytes and mediates, though the binding to P-Selectin, their rolling followed by their transmigration into the aneurismal wall [13, 20]. We also incorporated FITC dextran for fluorescent intravital microscopy and dextran coated USPIO as T2*-weighted MRI contrast agents in order to assess in vivo the behavior of the developed leukocyte mimetic probe.

We herein describe the fabrication, the in vitro characterization and the in vivo assessment, on two different vascular disease models with two imaging modalities, of fucoidan functionalized polysaccharide microparticles. We demonstrate their ability to bind to activated cells on a calcium ionophore induced endothelium activation mouse model and to localize into the degraded arterial wall in an elastase-induced AAA rat model. These experiments revealed in vivo behaviors of the fucoidan functionalized microparticles similar to leukocytes rolling on activated endothelium and to leukocytes migration through the aneurysmal wall.

MATERIAL AND METHODS

Microparticle preparation

Polysaccharide microparticles (MP) were obtained with a new method [21] using a water-in-oil emulsification process combined with a previously described crosslinking protocol [22]. Pullulan (9 g, MW 200,000 g/mol, Hayashibara, Okayama, Japan), dextran (3 g, MW 500,000 g/mol, Sigma Aldrich, Fallavier, France) and FITC-dextran (100 mg, MW 500,000 g/mol, Sigma Aldrich) were solubilized either in 40 mL of purified water or in 40 mL of dextran coated ultrasmall particles of iron oxide suspensions ($[Fe]=0.9$ M, USPIO Sinerem[®], Guerbet, Villepinte, France) to obtain MP and MPIO, respectively. To prepare functionalized microparticles (MP-Fucoidan or MPIO-Fucoidan), 1.2 g of fucoidan (MW 23,000 g/mol, Sigma Aldrich) was blended into the mixture. Under alkaline condition (NaOH 2.3 M), 300 mg of the blend was mixed with 30 μ l of STMP (30% (w/v) in water, Sigma Aldrich). The aqueous phase was slowly injected into 30 mL of colza oil containing 1.5 % (w/v) of a surfactant mixture of Span 80 (Sigma Aldrich) and Tween 80 (Fluka, Fallavier, France) with a ratio 75/25, and dispersed with a homogenizer (Polytron PT 3100, dispersing aggregate PT-DA 07/2EC-B101, Kinematica, Luzernerstrasse, Switzerland). Next, this emulsion was transferred in an oven (50°C) wherein the crosslinking step took place for 20 minutes. The oil phase was then removed by phase separation and resulting microparticles were washed in PBS. The suspensions were filtered through 5 μ m nylon filters (SEFAR NITEX, 03-5/1 115 cm, Thal, Switzerland) with a vibrating sieve machine (AS 200, Retsch, Eragny sur Oise, France) then centrifuged (BR4i, JOUAN S.A., Saint Herblain, France) for 10 minutes at 3,000 g. Resulting pellets were suspended at 1.5 % (w/v) in saline buffer and stored at 4°C until use.

Microparticles characterization

The surface morphology of MP, MP-Fucoidan, MPIO and MPIO-Fucoidan particles was imaged using scanning electron microscopy (SEM) (Philips XL 30 ESEM-FEG, Amsterdam, Netherlands) on dried samples coated with a thin gold layer. Mean diameter and size distribution were determined by image analysis of fluorescent microscopy images (Nikon Eclipses E400, Nikon, Tokyo, Japan). Microparticles snapshots were first converted to binary images and diameter distributions were obtained with the Analyse Particles function of ImageJ software (ImageJ, NIH, USA). The mean diameter and the percentage of microparticles smaller than 10 μ m were calculated for each snapshot. Three snapshots from three different samples of each microparticle type were analyzed. Sulfur and iron presence on the surface of microparticles was evidenced by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (Philips XL 30 ESEM-FEG). Global sulfur content was quantified by UV fluorescence spectroscopy (THERMO TN-TS 3000, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) on freeze-dried samples of fucoidan and microparticles (n=4). Fucoidan content in microparticles was calculated from their sulfur content and the sulfur content of fucoidan. Global iron content was measured by flame spectroscopy on MPIO and MPIO-Fucoidan suspensions (n=5).

In vitro binding assay

Affinity of fucoidan functionalized microparticles for P-Selectin expressed on the surface of activated human platelets was assessed by flow cytometry. Blood from healthy adult volunteers was collected in sodium citrate 3.8 % (w/v). Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 120 g for 15 min and platelet concentration was adjusted at 2.108/mL with autologous platelet-poor plasma (PPP). Activated PRP was obtained by stimulation of PRP with 20 μ M of TRAP (thrombin receptor-activating-peptide). P-Selectin expression at the platelet surface was assessed using an anti human CD62P-FITC (0.11 mg/mL, Ancell, Bayport, MN, USA) and its isotype-matched control. In some experiments, a non-labeled anti human CD62P (1 mg/mL, Ancell) was used to block P-Selectin in activated PRP. To evaluate the binding of microparticles to platelet P-Selectin, 5 μ L of non activated PRP, activated PRP or anti P-Selectin-treated activated PRP were incubated for 20 minutes with 5 μ L of fluorescent microparticles (either MP, MPIO, MP-Fucoidan or MPIO-Fucoidan), together with 5 μ L of PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD41a (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont De Claix, France) to label platelets. In addition each PRP sample was incubated with an isotype-matched control antibody.

Samples were analyzed on a LSRII flow cytometer (BD Bioscience Pharmingen), with 10,000 events collected per sample with area of double positivity reflecting the affinity of microparticles (FITC) for platelets (PE-Cy5). The data were processed with FACS DiVa software and PE-Cy5 mean fluorescence intensity (MFI) was measured in the area of double positivity. Results were presented as a ratio of MFI of interest to the control MFI (MP incubated with PRP).

Fluorescence intravital microscopy study on an in vivo activated endothelium mouse model

BALB/c male mice were purchased from CEJ (Le Genest, France). All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Claude Bernard Institute (Paris, France).

A total of 7 mice (8 to 10 week-old) were anesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine in saline solution. The mesentery was gently exteriorized through a midline abdominal incision and small vessels were visualized by intravital microscopy (Axio Observer, Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Germany) with a 20X objective connected to a CCD camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan). Endothelial activation was induced by calcium ionophore A23187 drop deposition (3 μ L of 20 mM solution, Sigma Aldrich). Then, rhodamine 6G solution (30 μ L, 0.3% (w/v), Sigma Aldrich) was injected into the retro-orbital sinus and 2 minutes later, endothelium activation was examined in real-time by monitoring the accumulation of rhodamine 6G-labeled leukocytes in red fluorescence. Then, microparticles suspensions (200 μ L, 1.5% (w/v)) were injected into the retro-orbital sinus and observed in green fluorescence by intravital microscopy (n= 3). Dynamic behavior of MP or MP-Fucoidan was studied on snapshots series recorded with a 0.2 second interval from 5 seconds after the injection (n=1). An additional experiment was performed with MP-Fucoidan on control mice with no endothelium activation (n=1).

The observed total number of fluorescent microparticles accumulated in the area of interest was plotted as a function of time during the 2 first seconds of the acquisitions. All red leukocytes and

green MP or MP-Fucoidan were also counted on snapshots taken at 1 minute post injections of microparticle suspensions and results were expressed in number of particles for 100 leukocytes (n=3).

Dynamic binding of MP-Fucoidan on activated endothelium was studied on snapshot series starting at 1 minute post injection and recorded with 0.2 second interval. Several MP-Fucoidan were identified as presenting a rolling behavior on the videomicroscopy observations. Mean rolling velocities were calculated by measuring the distanced traveled by microparticles presenting a rolling behavior during the recording time and were expressed in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (n=3).

Elastase induced abdominal aortic aneurysm rat model

Abdominal aortic aneurysm elastase-induced model was performed on 10 male adult Wistar rats (7 weeks, CEJ) [23]. Animals were anesthetized with pentobarbital (1 $\mu\text{L}/\text{g}$ body weight). Porcin pancreatic elastase (2.7 mg/mL, Sigma Aldrich) was perfused into the lumen of an isolated segment of the infrarenal abdominal aorta for 15 minutes at 2.5 mL/h. Two weeks after the surgery, when animals present biologically active abdominal aorta aneurysm characterized by the presence of intraluminal thrombus and expression of P-Selectin, as described previously [24], rats were injected and imaged.

In vitro MRI experiment

MPIO and MPIO-Fucoidan were homogeneously suspended in agarose gel (0.15 %, Invitrogen, Carlsbad, NM, US) to final concentrations of 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 mmol Fe/L and imaged on a 7.4 T MR scanner (PharmaScans, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). T2* relaxation times were measured using a multi-slice multi-gradient echo sequence (MGE) with the following parameters: repetition time (TR)=1500 ms, 12 successive echo times (TE) from 3.8 ms with an increment of 4.85 ms, slice thickness=1 mm, field of view (FOV)=1145 mm x 562 mm, matrix size=256 x 256. The mean T2*-weighted MRI signal intensity (SI) was measured at TE=13.5 ms and plotted as a function of iron concentration. Relaxation times were calculated at each TE and relaxation rate $r2^*$ was calculated by linear fitting of the inverse relaxation times as a function of iron concentrations.

In vivo MR imaging

AAA rats were anesthetized with pentobarbital (1 $\mu\text{L}/\text{g}$ body weight), a PE10 catheter was implanted into the carotid artery and a pre-injection MRI scan focused on the abdomen was performed. We injected then into the catheter MPIO-Fucoidan or MPIO suspended at 1.5 % (w/v) in 200 μL of 0.9 % NaCl, (corresponding to an iron dose of 0.56 mg Fe/kg). In vivo T2*-weighted MRI scan was performed on the same 7.4 T MR scanner than the one for in vitro experiments, with the following parameters: TR=350 ms, TE=10 ms, 20 slices of 1 mm thickness, FOV=1145 mm x 562 mm, matrix size

=256 x 256. Scans were performed every 7 minutes for 2 hours (n=5 rats for each type of microparticle).

Image analysis was performed on the image series using DICOM reader software (OsiriX, Geneva, Switzerland). For rats injected with MPIO-Fucoidan, regions of interest (ROIs) were drawn around the enhanced area within the AAA wall identified on the MRI scan at 121 minutes post injection and were reported on each previous scans. For rats injected with non functionalized MPIO, no enhanced area could be identified and controls ROIs were drawn in an area from the AAA wall. The average signal intensity in these ROIs (S_{enhanced area}) was measured in each scan. Additional ROIs were placed in the paravertebral muscles to determine the mean deviation of the noise signal SD_{noise} in every image. Signal-to-noise ratio (SNR) was then calculated for each scan using the following equation: $SNR = S_{enhanced\ area} / SD_{noise}$. Normalized signal enhancement ($\Delta NSE \% = (SNR_t - SNR_{t=0}) / SNR_{t=0} \times 100$) was calculated at each time point from 0 to 121 minutes post-injection, with time 0 corresponding to images taken immediately before injection. Results are presented as mean $\Delta NSE \%$ values \pm SEM plotted as a function of time post-injection (n=5).

Histology and immunohistochemistry

Animals were sacrificed with pentobarbital overdose immediately after the last MRI scan. Abdominal aortic aneurysms were harvested, washed in 0.9 % saline, fixed in paraformaldehyde 3.7 % and embedded in paraffin. Transverse serial sections of 10 μ m thickness were cut and stained with Masson trichrome to visualize cells, nuclei and fibrin and with Perls stain to show iron presence. Immunohistochemistry studies were performed using a goat P-Selectin antibody (4 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) as a primary antibody and an IgG rabbit antigoat as a secondary antibody (1 μ g/mL, Dako, Les Ulis, France) conjugated with horseradish peroxidase, revealed by DAB (Dako, Les Ulis, France) and counterstained with hematoxylin. Control sections were obtained by omitting the primary antibody. Observations were performed using light microscopy (Nanozoomer, Hamamatsu Photonics). Some sections were not stained but directly observed with green fluorescence microscopy (Nikon Eclipses E400, Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

All results are expressed as mean values \pm SEM. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Multiple groups (microparticle diameters and $\Delta NSE \%$ measured at each time point on in vivo MR images) were compared with one-way ANOVA and Bonferroni post-tests. Two group results (sulfur, fucoidan and iron global content, number of particles localized on activated endothelium observed by intravital microscopy) were analyzed with unpaired Student's t-tests. A difference of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

1. Characterization of the polysaccharide microparticles

Polysaccharide microparticles were prepared by a chemical crosslinking process combined with an emulsion step. Iron loaded microparticles (MPIO) were obtained by adding dextran coated USPIO in the aqueous phase and functionalized microparticles (MP-Fucoidan/MPIO-Fucoidan) were obtained by adding the sulfated polysaccharide fucoidan. All the microparticles incorporated FITC-Dextran and therefore showed green fluorescence.

MP, MP-Fucoidan, MPIO and MPIO-Fucoidan microparticles all exhibited a spherical morphology and a smooth surface as shown on scanning electronic microscopy images (Fig 1). Size measurements on fluorescent microscopy snapshots revealed mean diameters of respectively $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $2.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ and $2.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ with no statistical difference ($n=3$) (table 1). Energy-dispersive X-ray spectroscopy confirmed the presence of sulfur at the surfaces of fucoidan functionalized microparticles and the presence of iron when microparticles were loaded with USPIO. Flame spectroscopy revealed a similar iron concentration of $21.36 \pm 1.03 \text{ mM Fe}$ and $19.92 \pm 0.46 \text{ mM Fe}$ in MPIO and MPIO-Fucoidan suspensions respectively ($n=4$) (table 1). MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan contained $668 \pm 41 \text{ ppm}$ and $428 \pm 5 \text{ ppm}$ of sulfur, respectively. From fucoidan containing $7.5 \pm 0.1 \%$ (w/w) of sulfur, we calculated the fucoidan content of MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan to be $0.90 \pm 0.05 \%$ (w/w) and $0.60 \pm 0.02 \%$ (w/w), respectively ($n=4$, $p < 0.001$).

2. In vitro affinity for P-Selectin

Interaction of non functionalized microparticles (MP and MPIO) with resting non activated platelets (PRP), activated platelets (PRP + TRAP) and P-Selectin blocked platelets (PRP + TRAP + CD62P) was assessed and compared to the interaction of fucoidan functionalized microparticles (MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan) (Fig 1E). First, a weak binding of MP and MPIO to platelets was observed, whether they were incubated with activated, unactivated, or activated then blocked platelets, as shown by low values of mean fluorescence intensity (MFI). A weak binding was also noticed MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan when incubated with unactivated platelets or with activated platelets blocked with anti P-Selectin, with ratios of MFI to the control MFI (MP incubated with PRP) close to 1 in every cases. In contrast, MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan exhibited a significantly higher MFI ratio with activated platelets, as compared to unactivated platelets or activated then blocked platelets ($p < 0.001$ in both cases). Interaction with platelets activated with TRAP was 2 to 3 times higher with fucoidan functionalized microparticles, as compared to non functionalized microparticles (MFI ratio of 2.9 ± 0.4 for MP-Fucoidan and 2.3 ± 0.3 for MPIO-Fucoidan versus 1.1 ± 0.1 for MP and 1.3 ± 0.2 for MPIO, $p < 0.001$ in both cases).

Table 1. Microparticles characterization. Diameter of naked microparticles (MP), microparticles functionalized with fucoidan (MP-Fucoidan), microparticles loaded with iron oxide (MPIO) and microparticles loaded with iron oxide and functionalized with fucoidan (MPIO-Fucoidan) were measured by image analysis with fluorescent microscopy (n=3). Global sulfur content was determined by UV fluorescence spectroscopy to evaluate fucoidan content (n=4). Global iron content were measured by atomic absorption spectroscopy (n=5). Sulfur and iron presence was evidenced by EDX technique (n=3). Results are presented as mean values \pm SEM.

	Diameter		EDX Detection		Global content		
	mean (μm)	% < 10 μm	Sulfur	Iron	Sulfur (10^{-3} wt %)	Iron (mM)	Fucoidan (wt %)
MP	2.3 \pm 0.3	99.5 \pm 0.3	-	-	< 5	N.D.	< 0.1
MP-Fucoidan	2.4 \pm 0.1	99.0 \pm 0.5	+	-	67.0 \pm 4.0	N.D.	0.90 \pm 0.05
MPIO	2.8 \pm 0.3	98.1 \pm 1.1	-	+	< 5	21.4 \pm 1.0	< 0.1
MPIO-Fucoidan	2.6 \pm 0.2	99.9 \pm 0.1	+	+	43.0 \pm 0.5**	19.9 \pm 0.5	0.60 \pm 0.02

** p<0.01 MP-Fucoidan versus MPIO-Fucoidan

ND: Not detectable.

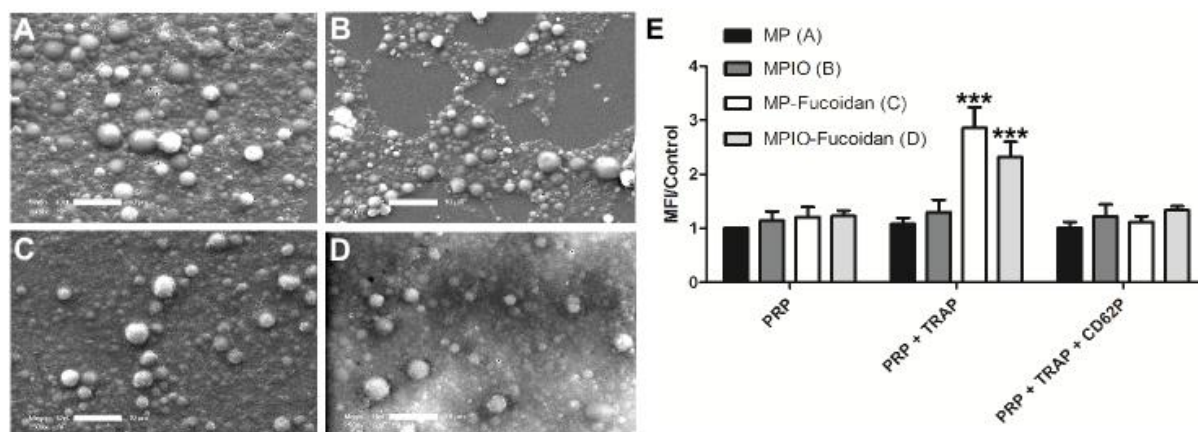


Figure 1. Scanning Electron Microscopy observations of MP (A), MPIO (B), MP-Fucoidan (C) and MPIO-Fucoidan (D). Scale bar: 10 μm . Flow cytometry assessment of FITC fluorescent MP, MPIO, MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan incubated with either unactivated platelets rich plasma (PRP), platelets rich plasma activated with 20 μM TRAP (PRP + TRAP) and platelets rich plasma activated then P-Selectin blocked with 100 μM CD62P (PRP + TRAP + CD62P) (E). The mean fluorescence intensity (MFI) was measured in the area of double positivity. Results are presented as a ratio of MFI to the control MFI (MP incubated with PRP) as mean values \pm SEM (n=3, ***p<0.001).

3. Affinity of the microparticles for an activated endothelium

Microparticles (MP, MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan) were injected intravenously into mouse and their interactions with an activated endothelium were studied by intravital fluorescent microscopy (Fig 2).

The examination of the dynamic behavior showed that immediately after the injection, the number of MP-Fucoidan accumulated in the activated endothelium area increased over time (Fig 2A) whereas the number of MP did not increase with time (Fig 2B). In addition, the absence of affinity of functionalized microparticles for a non activated endothelium was verified with no MP-Fucoidan found in the area of interest (Fig 2C).

One minute after the injection, almost no non-functionalized microparticles (MP) were found interacting with the calcium ionophore stimulated endothelial area, whose activation was confirmed by its ability to retain leukocytes (Fig 3A). On the contrary, after injection of fucoidan functionalized microparticles (MP-Fucoidan), many of them were localized in the area of the activated endothelium (Fig 3B). Number of microparticles in the activated endothelium area was more than 18 times higher for MP-Fucoidan than for MP (187 ± 17 MP-Fucoidan versus 10 ± 2 MP per 100 leukocytes, $p < 0.001$) (Fig 3C).

Video microscopy observations also revealed that most MP-Fucoidan are firmly adherent and that some MP-Fucoidan slowly advanced along the activated endothelium, similarly to rolling leukocytes, with a mean velocity of $10.5 \pm 2.0 \mu\text{m.s}^{-1}$ ($n=9$) (Fig 4). This rolling phenomenon was not observed for non-functionalized microparticles.

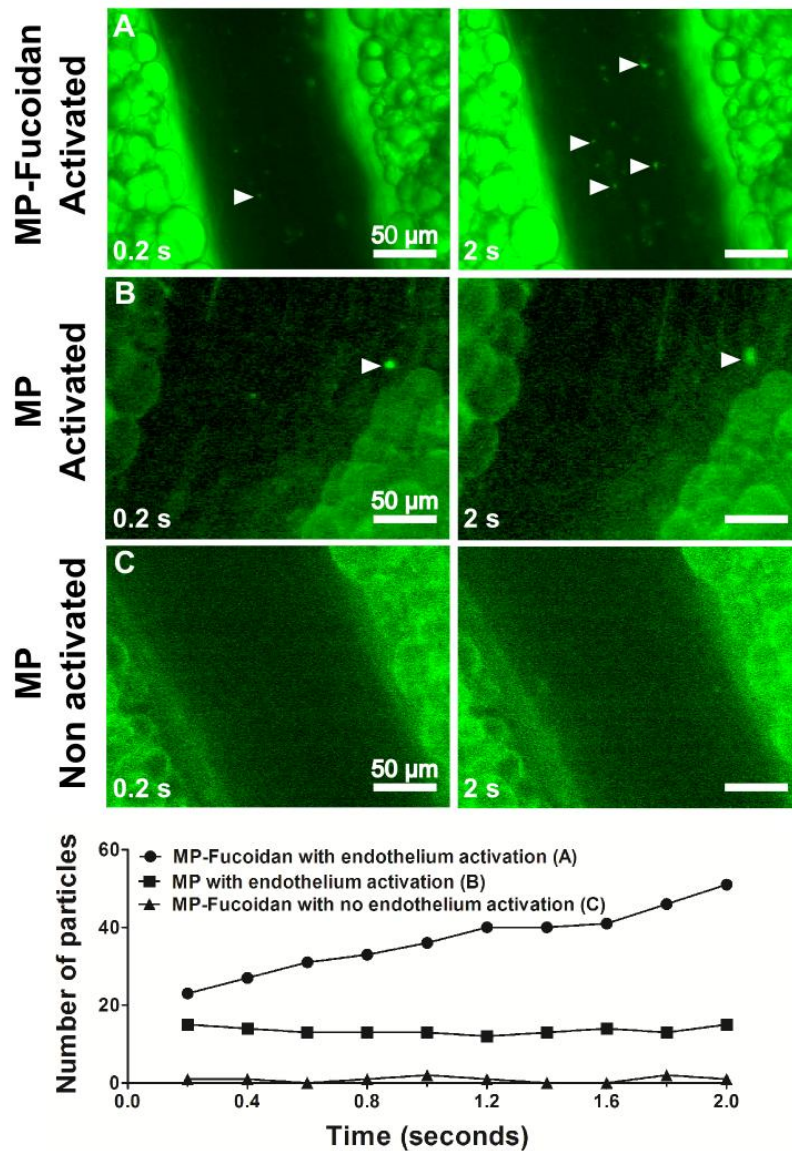


Figure 2. Intravital microscopy dynamic observation in calcium ionophore activated mesenteric venules after intravenous injection (200 μ L) of MP-Fucoidan (A) and MP (B). Control after injection of MP-Fucoidan with no activation was assessed (C). Snapshot series start before 5 seconds after injections and are separated by 0.2 s. Number of microparticles in function of time after injection were plotted. Scale bar: 50 μ m. Arrow heads indicate adherent microparticles.

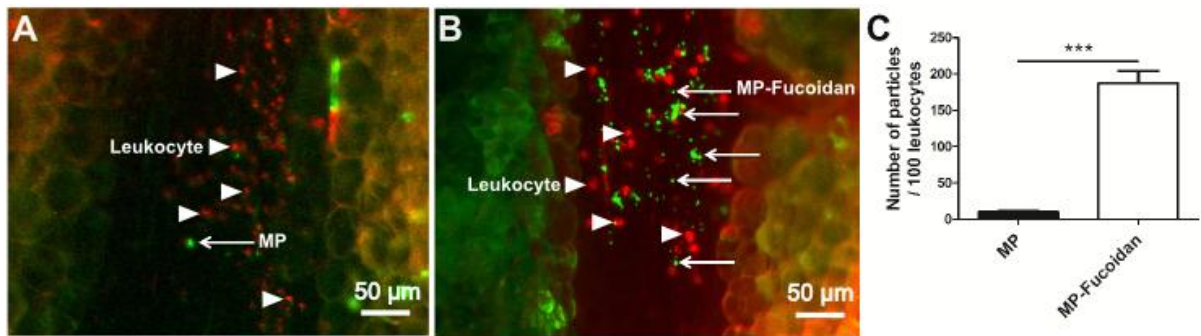


Figure 3. Intravital microscopy observations on activated vein area after intravenous injection (200 μL) of MP (A) and MP-Fucoidan (B). Scale bar: 50 μm . Green fluorescent microparticles were prepared with FITC dextran (3.5 % w/w). Leucocytes were labeled by rhodamine 6G and exhibited red fluorescence. Quantification of the number of microparticles per 100 leukocytes found in the activated endothelium area was performed (C). All the snapshots were taken after 1 minute post-injection. Results are presented as mean values \pm SEM ($n=3$). MP-Fucoidan showed statistically higher affinity than MP for an activated endothelium (***) $p<0.001$.

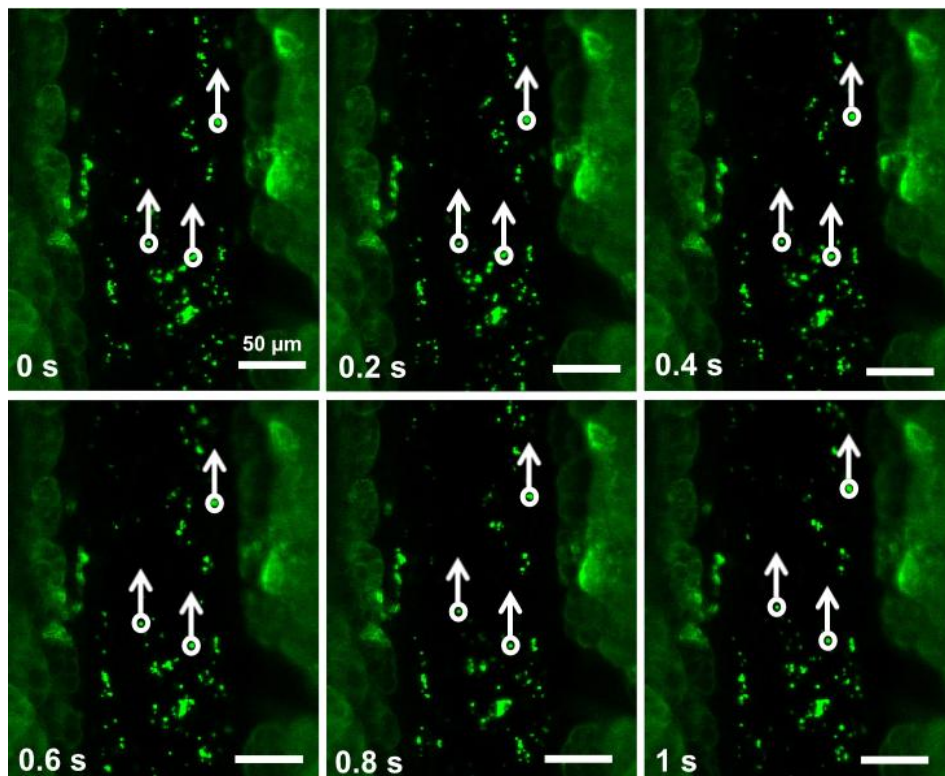


Figure 4. Intravital microscopy dynamic observations on activated vein area after intravenous injection (200 μL) of MP-Fucoidan. Snapshots series start after 1 minute post-injection and were separated by 0.2 s. MP-Fucoidan highlighted with white circles slowly advanced (arrows) and therefore present a behavior that mimic leukocyte rolling. Mean rolling velocity of $10.5 \pm 2.0 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ was measured. No rolling could be measured in absence of fucoidan. Scale bar: 50 μm .

4. High inflammatory sites detection in AAA by in vivo MRI

To assess the ability of the polysaccharide microparticles loaded with USPIO to contrast-enhance T₂*-weighted images, we performed in vitro MR imaging of MPIO and MPIO-Fucoidan suspensions. The T₂* signal intensity was negatively enhanced by both MPIO and MPIO-Fucoidan presence and decreased according to iron concentration. We further measured r₂* relaxation rates of 562.8 mM⁻¹.s⁻¹ and 563.4 mM⁻¹.s⁻¹ respectively (Fig 5).

We then assessed the functionalized microparticles of iron oxide as contrast agents for in vivo MR imaging of the abdominal aortic aneurysm (AAA) in an elastase induced AAA rat model. As shown on T₂*-weighted in vivo MR images, no signal intensity modification was detected after the injection of non functionalized control MPIO and only a few microparticles are found on Perls stained AAA sections (Fig 6A). On the contrary, MPIO-Fucoidan generated a negative contrast enhancement in the AAA which was clearly visible from 30 minutes after injection and histological studies of perls stained AAA sections, 2 hours after injections, confirmed the presence of iron loaded microparticles in the area which correspond to the uptake observed on MRI (Fig 6B).

The signal in the identified uptake area increased progressively with time and became significantly different from the signal before the injection at 21 minutes post-injection (mean ΔNSE % of -39.1±7.6, p<0.01), at 49 minutes post-injection (mean ΔNSE % of -44.0±7.4, p<0.001) and remained relatively stable afterwards until 121 minutes (mean ΔNSE % of -48.4 ± 2.9) (Fig 6C). No significant signal uptake was measured from 7 minutes to 2 hours after the injections of non functionalized MPIO.

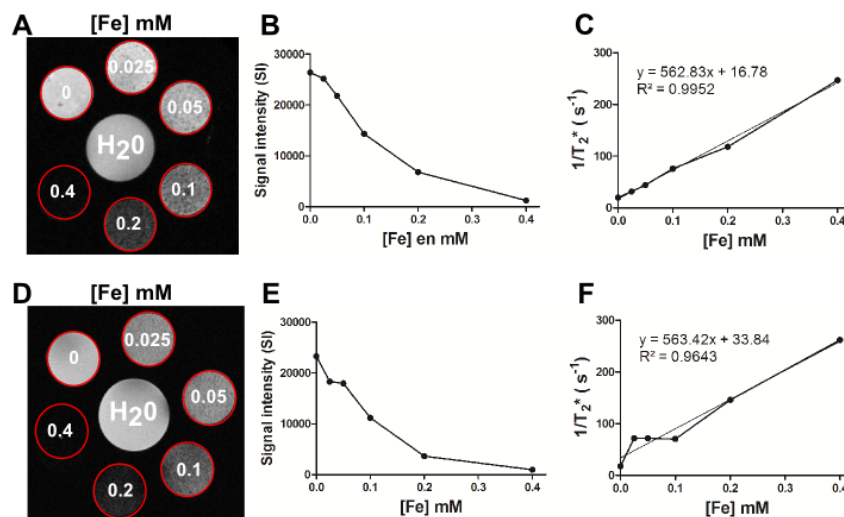


Figure 5. In vitro T₂*-weighted MRI images with different iron concentrations of MPIO (A) and MPIO-Fucoidan (D). Mean T₂*-weighted MRI signal intensity measured with different iron concentrations for MPIO (B) and MPIO-Fucoidan (E). Relaxation rates of MPIO (C) ($r_2^* = 562.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and MPIO-Fucoidan (F) ($r_2^* = 563.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

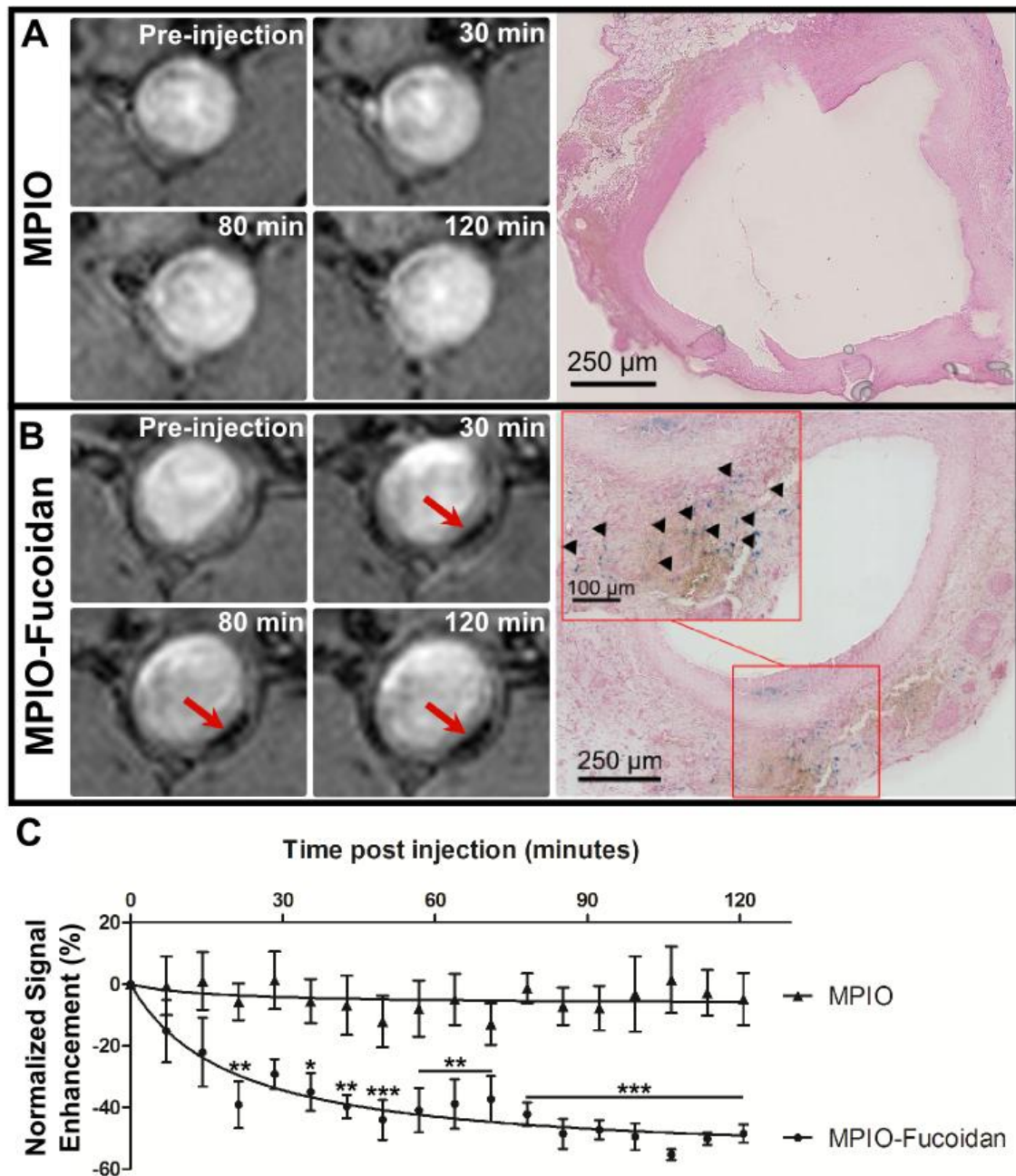


Figure 6. *In vivo* T_2^* weighted MRI transversal images of the aneurysm of an abdominal aortic aneurysm (AAA) before and after injection into the rat carotid artery of MPIO (A) and MPIO-Fucoidan (B) (200 μL , 1.5 % w/v in 0.9 % NaCl). Images were obtained every 7 minutes up to 2 hours after injection. Contrast uptake is indicated with red arrows. Perls stained AAA sections corresponding to the MRI observations, 2 hours after injections of microparticles are presented on the right part. MPIO-Fucoidan are observed in blue spots in the aneurysmal wall. Mean Normalized Signal Enhancement (ΔNSE %) measured on MRI acquisitions of AAA rats injected with MPIO or MPIO-Fucoidan was plotted as a function of time post injection (C). Results are presented as mean values \pm SEM (n=5, post-injection ΔNSE % versus pre-injection ΔNSE %; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). Scale bars: 250 μm and 100 μm (zoom).

5. Localization of the MPIO-Fucoidan into the AAA wall

After in vivo MRI experiments, 2 hours after injections, we performed histology staining of AAA paraffin embedded sections to study the location of the functionalized microparticles. Masson trichrome staining (Fig 7A) confirmed the presence of a degraded media layer in the aneurismal wall. Perls staining clearly revealed the presence of iron localized in the arterial wall, between the thrombus and the media layer (Fig 7B). This location, corresponding to inflamed areas where cells express P-Selectin (Fig 7C), also contained green FITC microparticles as observed by fluorescence microscopy (Fig 7D).

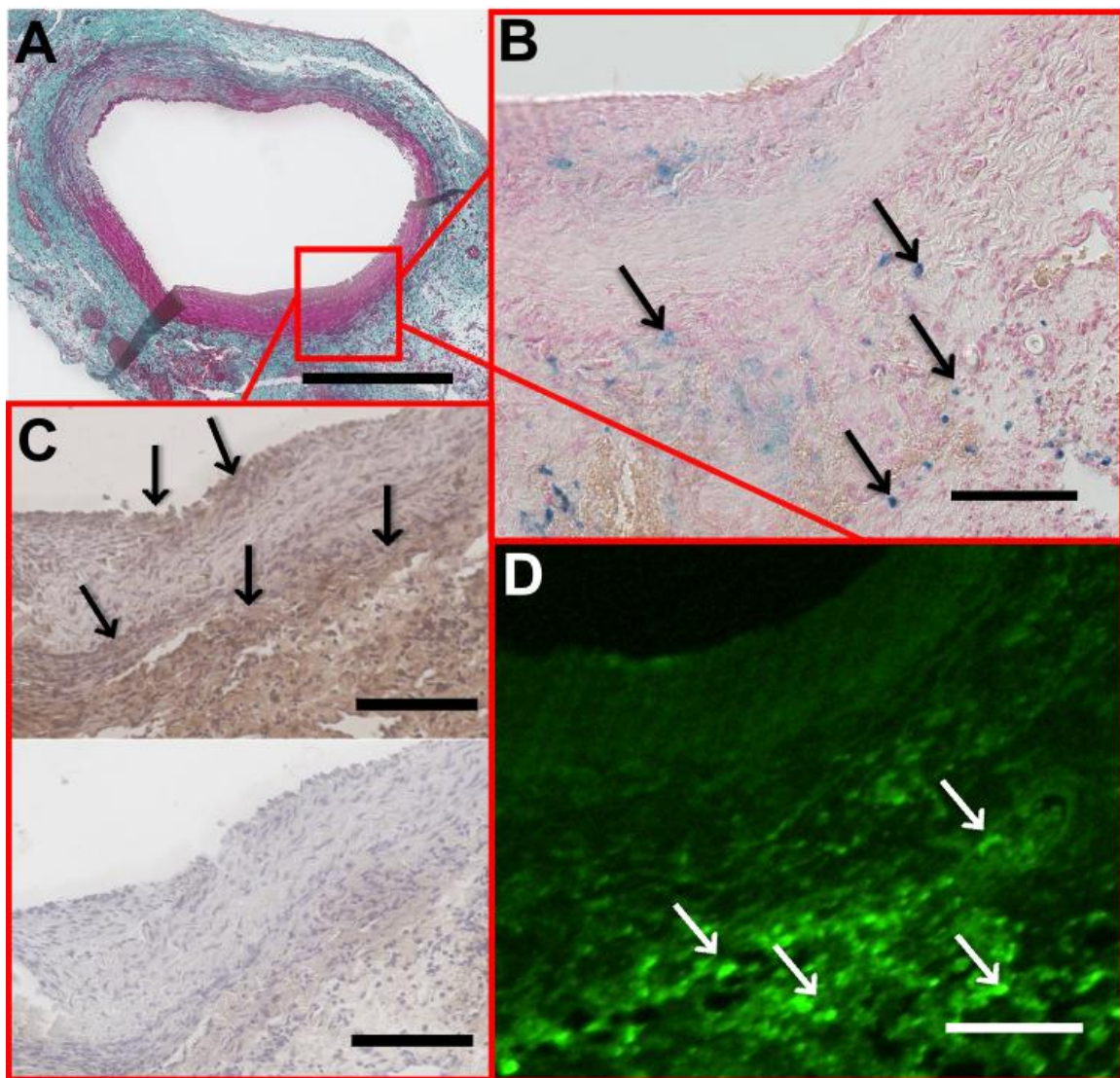


Figure 7. Histological analysis of AAA. Paraffin sections were stained by Masson trichrome (A). Perls revealing iron presence in blue in the AAA wall (black arrows) (B). Immunostaining of P-Selectin found on the endothelium layer and inside the AAA wall (black arrows, top), with control section without primary antibody shown at the bottom (C). Fluorescence microscopy observation of FITC MP-Fucoidan microparticles in the arterial wall (white arrows) (D). Scale bars: 500 μm (A), 100 μm (B, C, D).

DISCUSSION

In this study, we developed fucoidan functionalized polysaccharide micro-sized particles.

The described water-in-oil emulsion process coupled to the crosslinking of pullulan, dextran, FITC-dextran, fucoidan and dextran coated USPIO resulted in reproducible productions of 4 types of polysaccharide microparticles; non functionalized and non loaded pullulan/dextran microparticles (MP), functionalized non loaded fucoidan/pullulan/dextran microparticles (MP-Fucoidan), iron loaded non functionalized (MPIO) and fucoidan functionalized microparticles (MPIO-Fucoidan).

SEM images show that the addition of fucoidan and dextran coated USPIO did not affect the surface morphology, all being with smooth surfaces, and size measurements revealed the same diameter distribution with a common mean diameter around 2.5 μm (no significant difference). More than 98% of all microparticles presented a diameter under 10 μm . According to Charoenphol *et al.*, this size is well adapted for vascular targeting purpose since their results suggest that spheres presenting a diameter of 2 to 5 μm are optimal for targeting the wall in medium to large vessels relevant in several cardiovascular diseases [25, 26].

EDX analysis revealed sulfur presence at the surface of both type of microparticles prepared with fucoidan (MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan) but not for other microparticles, confirming the presence of the sulfated polysaccharide fucoidan. MP-Fucoidan contained slightly more fucoidan than MPIO-Fucoidan (0.90 ± 0.05 % (w/w) versus 0.60 ± 0.01 % (w/w), $p < 0.01$), and this phenomenon is likely due to the repulsion between anionic coverage of USPIO and the anionic polysaccharide fucoidan [27, 28]. Electrostatic repulsion forces may induce a lower content of fucoidan in presence of carboxymethylated dextran coated USPIO.

EDX analysis also confirmed the presence of iron on both type of microparticles loaded with the dextran coated USPIO (MPIO and MPIO-Fucoidan). There was no significant difference in iron concentration between both types of iron loaded microparticles, showing that the addition of fucoidan did not reduce the iron presence. Flame spectroscopy measurement revealed an amount of iron of 21.36 ± 1.03 mM and 19.92 ± 0.46 for MPIO and MPIO-Fucoidan suspensions (for 1.5 % w/v suspensions). For in vivo experiment, we injected 0.56 mg Fe/kg dose in rats and phase 1 of clinical trial have validated doses ranging from 0.3 to 1.7 mg Fe/kg administered in humans clinical trials using the same Sinerem® USPIO [29].

We then demonstrated that the functionalized microparticles have a strong affinity for human activated platelets. Using flow cytometry, we demonstrated that MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan have binding affinities higher than non functionalized MP and MPIO (2.9 ± 0.4 and 2.3 ± 0.3 MFI ratios for MP-Fucoidan and MPIO-Fucoidan respectively versus 1.1 ± 0.1 and 1.3 ± 0.2 MFI ratios for MP and MPIO respectively, $p < 0.001$ in both cases). Although less fucoidan was trapped in MPIO-Fucoidan than in MP-Fucoidan, there was not any significant decrease of their binding to activated platelets. We also evidenced that this affinity is specific to P-Selectin since we measured the same level of interaction with activated-then-P-Selectin-blocked platelets than with non activated platelets.

The intravital microscopy observation permitted to study the dynamic in vivo interaction of the functionalized microparticles on an activated endothelium.

We demonstrated that after injection into the blood stream, fucoidan functionalized microparticles rapidly bind to the activated vessel wall. The measured affinity happens to be over 18 times more important with the presence of fucoidan ligand at the surface of the microparticles than with microparticles without fucoidan. The use of this sulfated polysaccharide as targeting ligand for activated endothelial cells was therefore highly relevant and the ability of the developed MP-Fucoidan to target a pathological vessel wall was evidenced.

The observation of microparticle dynamic interaction further revealed that among all the firmly adherent fucoidan functionalized microparticles, some of them slowly advance in the direction of the flow along the activated endothelium. This slow motion is similar to the rolling phenomena which characterize the leukocytes adherence on activated endothelium. We measured that the identified rolling MP-Fucoidan advanced with a mean velocity of $10.5 \pm 2.0 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ which is in the same order than leukocyte rolling velocity found in the literature [30, 31]. This rolling behavior is specific to the presence of fucoidan, since none of the MP rolled on the activated endothelium. These results show that the interaction of fucoidan functionalized microparticles with activated cells mimick that of leukocytes.

We further assessed the magnetic resonance imaging (MRI) properties of the microparticles of iron oxide and in vitro MRI studies showed that MPIO and MPIO-Fucoidan displayed strong ability to negatively enhance T2* signal. The addition of fucoidan did not interfere with superparamagnetic properties of micro-sized particles of iron oxide since fucoidan functionalized or non functionalized MPIO both similarly decreased T2* signal and were characterized by similar values of r2* relaxation rates ($562.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for MPIO and $563.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for MPIO-Fucoidan). Our technology exhibit superparamagnetic properties in agreement with a recent relaxometry study which stated a r2* value of $635 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ on $1.63 \mu\text{m}$ MPIO [32].

In vivo MRI experiments clearly revealed a specific area of T2* signal uptake localized in the aneurysm wall in all AAA rats injected with MPIO-Fucoidan whereas no such areas were observed on AAA rats injected with non functionalized control MPIO. Image analysis indicated that the negative contrast enhancement is significant from 30 minutes after the injections, with a mean $\Delta\text{NSE} \%$ of about -50%. In a feasibility study of AAA MR imaging in human patients with non targeted USPIO Sinerem®, Sadat *et al.* obtained the same magnitude of T2* signal decrease in aneurysmal wall 36 hours after the injection ($T2^* = 37.8 \pm 13.5 \text{ ms}$ pre-injection versus $T2^* = 20.4 \pm 8.8 \text{ ms}$ post-injection) [33]. In this case, a long circulation time was needed to have a sufficient USPIO taken up by macrophages whereas our targeted approach benefit from a rapid visualization of the pathology. Furthermore, the confrontation of post-injection transversal AAA MRI acquisitions reveals that USPIO-uptake areas in that study were not as clearly defined than the MPIO-Fucoidan-uptake areas we observed. In fact, our results emphasize the specificity of micro-sized functionalized molecular

MR imaging probes versus non functionalized nano-sized probes which are susceptible of passive accumulation [34].

Thus, the herein described imaging tool provides similar level of contrast enhancement than USPIO while shortening the time of the diagnostic procedure and improving the specificity of the signal.

The histological studies of the harvested AAA after the in vivo MRI experiments revealed that these specific contrast enhanced signal correspond to MPIO-Fucoidan accumulated into the media layer of AAA wall, and were clearly identified with iron staining and fluorescent microscopy observation. It should be noticed that this specific accumulation within the aneurysmal wall mimics the accumulation of macrophages [35-37]. The fucoidan functionalized microparticles which exhibited leukocyte like rolling behavior on an activated endothelium would then mimic the whole adhesion, trans-intima migration and medial localization processes of leukocytes (mainly of monocytes/macrophages).

We further demonstrated that the microparticles are localized in the same areas where P-Selectin is expressed. More precisely, the P-Selectin was detected within the media layer, where the MPIO-Fucoidan are accumulated, and on the intima layer, where we assume they have bonded before rolling and diffusing through the degraded AAA wall. The developed tool is therefore able to highlight on MR images the sites of the AAA wall where leukocytes are highly recruited. Hence, this technology may be used to monitor the high biologically active areas of aneurysms which are known to be more prone to growth and rupture [9, 38].

The strategy to develop a leukocyte mimetic targeting device coupled to an MRI contrast agent was also developed by McAteer *et al.*, who produced microparticles of iron oxide targeted toward VCAM-1 and P-Selectin (PV-MPIO) to image atherosclerotic lesions [15]. Despite some similarities, both technologies present distinct attractive features. Indeed, this dual ligand system which has a mean diameter of 1 μm which represents lower vessel occlusion risk than the 2.5 μm MPIO-Fucoidan described in this publication. They obtained the same magnitude of contrast enhancement with a signal attenuated by half in macrophage lesion area on in vivo T2*-weighted MR imaging of atherosclerosis plaque in apolipoprotein E-deficient mice model.

However, the main difference between both technologies resides in the design of the microparticles. Indeed, unlike PV-MPIO systems, MPIO-Fucoidan are not constituted by one single large iron core but rather by ultrasmall particles, leaving some space available for incorporation of any other molecule of interest. Besides, the property to diffuse in the aneurysmal wall could be of great interest for future works which will consist in the vectorization of a therapeutic molecule. Indeed, one promising therapeutic strategy for AAA aims to inhibit the intensive proteolytic activity induced by macrophages accumulated into the aneurysmal wall [39, 40]. The herein developed leukocyte mimetics could vehicule proteolytic inhibitors directly where their activity are needed while permitting the monitoring of AAA evolution with MR imaging. At this point, the use of biodegradable polysaccharides to produce a carrier will be an evident attractive feature for controlled drug release purposes. Moreover, as described by Eniola *et al.*, these leukocyte mimetic constructs exhibit a

binding avidity reflecting the advancement of the pathology and therefore provide a mean to self adjust the amount of therapeutics according to the inflammation degree [41].

CONCLUSION

The developed injectable polysaccharide microparticles of iron oxide functionalized with fucoidan constitute a very promising molecular magnetic resonance imaging (MRI) tool for the diagnostic of abdominal aortic aneurysm (AAA) and any other arterial diseases characterized by the expression of P-Selectin. We validated in vivo the targeting capacities of this technology on an activated endothelium mouse model and observed dynamic adhesion behaviors which are similar to leukocyte rolling. The in vitro MRI studies confirmed the super paramagnetic properties of the MPIO-Fucoidan and the in vivo administration to AAA rats demonstrated their ability to highlight on MR images the area of high inflammatory activity into the aneurysmal wall. This leukocyte mimetic innovative technology showed strong ability for MRI assessment of AAA and exhibited promising targeting properties for a therapeutic application. Future works will consist in the incorporation of therapeutic molecule inhibiting the massive proteolytic activity localized in aneurysmal wall.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Inserm and University Paris 13. T. Bonnard is a recipient of the French Ministry of Higher Education and Research Scholarship (ED Galilée, University Paris 13). The authors would like to thank C. Ménager and A. Michèle (PECSA - Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques, UMR 7195 UPMC, CNRS, ESPCI) for flame spectroscopy measurements and technical helps, F. Nadaud (UTC Compiègne, France) for SEM images, EDX analyses and technical help, P. Jame (Service Centrale d'Analyse, Villeurbanne, France) for UV fluorescence spectroscopy measurements. We also acknowledge the financial support from ANR-12-EMMA-0020-01 "MicroSound", NMP4-LA-2012-309820 "NanoAthero" and the Centre d'explorations fonctionnelles - Imagerie (CEFI, institut Claude Bernard).

COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interest exists.

Appendix A. Video of fluorescence intravital microscopy observation

Rolling behavior of microparticles could be difficult to observe on Fig 4. The video data corresponding to the intravital microscopy acquisition shown in Fig 3B and Fig 4 can be found in the online version.

REFERENCES

- [1] Von Allmen RS, Powell JT. The management of ruptured abdominal aortic aneurysms: screening for abdominal aortic aneurysm and incidence of rupture. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2012;53:69-76.
- [2] Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:92-102.
- [3] Hong H, Yang Y, Liu B, Cai W. Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm: the present and the future. *Curr Vasc Pharmacol* 2010;8:808-19.
- [4] Klink A, Hyafil F, Rudd J, Faries P, Fuster V, Mallat Z, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:338-47.
- [5] Schaeffter T, Dahnke H. Magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Handb Exp Pharmacol* 2008:75-90.
- [6] Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008;118:2382-92.
- [7] Sosnovik DE, Weissleder R. Emerging concepts in molecular MRI. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:4-10.
- [8] Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:987-94.
- [9] Choke E, Cockerill G, Wilson WR, Sayed S, Dawson J, Loftus I, et al. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:227-44.
- [10] Vallabhaneni SR, Gilling-Smith GL, How TV, Carter SD, Brennan JA, Harris PL. Heterogeneity of tensile strength and matrix metalloproteinase activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Endovasc Ther* 2004;11:494-502.
- [11] Choudhury RP, Fisher EA. Molecular imaging in atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:983-91.
- [12] Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1280-6.
- [13] Hannawa KK, Cho BS, Sinha I, Roelofs KJ, Myers DD, Wakefield TJ, et al. Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:353-9.
- [14] Chen X, Wong R, Khalidov I, Wang AY, Leelawattanachai J, Wang Y, et al. Inflamed leukocyte-mimetic nanoparticles for molecular imaging of inflammation. *Biomaterials* 2011;32:7651-61.
- [15] McAteer MA, Mankia K, Ruparelina N, Jefferson A, Nugent HB, Stork LA, et al. A leukocyte-mimetic magnetic resonance imaging contrast agent homes rapidly to activated endothelium and tracks with atherosclerotic lesion macrophage content. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1427-35.
- [16] Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater* 2010;6:3640-8.
- [17] Shi L, Aid R, Le Visage C, Chew SY. Biomimicking polysaccharide nanofibers promote vascular phenotypes: a potential application for vascular tissue engineering. *Macromol Biosci* 2012;12:395-401.
- [18] Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 2008;13:1671-95.

- [19] Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2009;1790:141-6.
- [20] Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Biol Chem* 1998;273:32506-13.
- [21] Derkaoui SM, Le Visage C, Letourneur D. Crosslinked polysaccharide beads and their biomedical uses. WO Patent 2,012,028,623; 2012.
- [22] Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2007;82A:336-42.
- [23] Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 1990;82:973-81.
- [24] Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac JM, Suzuki M, Meulemans A, Louedec L, et al. Radiolabeled Fucoidan as a P-Selectin Targeting Agent for In Vivo Imaging of Platelet-Rich Thrombus and Endothelial Activation. *J Nucl Med* 2011;52:1433-40.
- [25] Charoenphol P, Huang RB, Eniola-Adefeso O. Potential role of size and hemodynamics in the efficacy of vascular-targeted spherical drug carriers. *Biomaterials* 2010;31:1392-402.
- [26] Charoenphol P, Mocherla S, Bouis D, Namdee K, Pinsky DJ, Eniola-Adefeso O. Targeting therapeutics to the vascular wall in atherosclerosis--carrier size matters. *Atherosclerosis* 2011;217:364-70.
- [27] Di Marco M, Guilbert I, Port M, Robic C, Couvreur P, Dubernet C. Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings. *Int J Pharm* 2007;331:197-203.
- [28] Zhu A, Yuan L, Jin W, Dai S, Wang Q, Xue Z, et al. Polysaccharide surface modified Fe₃O₄ nanoparticles for camptothecin loading and release. *Acta Biomater* 2009;5:1489-98.
- [29] McLachlan SJ, Morris MR, Lucas MA, Fisco RA, Eakins MN, Fowler DR, et al. Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 1994;4:301-7.
- [30] Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF- α -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002;99:336-41.
- [31] Eriksson EE, Werr J, Guo Y, Thoren P, Lindbom L. Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and $\alpha(4)$ integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ Res* 2000;86:526-33.
- [32] Kotek G, van Tiel ST, Wielopolski PA, Houston GC, Krestin GP, Bernsen MR. Cell quantification: evolution of compartmentalization and distribution of iron-oxide particles and labeled cells. *Contrast Media Mol Imaging* 2012;7:195-203.
- [33] Sadat U, Taviani V, Patterson AJ, Young VE, Graves MJ, Teng Z, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of abdominal aortic aneurysms--a feasibility study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;41:167-74.
- [34] McAteer MA, Akhtar AM, von Zur Muhlen C, Choudhury RP. An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide. *Atherosclerosis* 2010;209:18-27.
- [35] Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:543-52.

- [36] Kothapalli CR, Ramamurthi A. Induced elastin regeneration by chronically activated smooth muscle cells for targeted aneurysm repair. *Acta Biomater* 2010;6:170-8.
- [37] Sho E, Sho M, Hoshina K, Kimura H, Nakahashi TK, Dalman RL. Hemodynamic forces regulate mural macrophage infiltration in experimental aortic aneurysms. *Exp Mol Pathol* 2004;76:108-16.
- [38] Richards JM, Semple SI, MacGillivray TJ, Gray C, Langrish JP, Williams M, et al. Abdominal aortic aneurysm growth predicted by uptake of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide: a pilot study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2011;4:274-81.
- [39] Sylvester A, Sivaraman B, Deb P, Ramamurthi A. Nanoparticles for localized delivery of hyaluronan oligomers towards regenerative repair of elastic matrix. *Acta Biomater* 2013;9:9292-302.
- [40] Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, et al. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 2005;11:1330-8.
- [41] Omolola Eniola A, Hammer DA. In vitro characterization of leukocyte mimetic for targeting therapeutics to the endothelium using two receptors. *Biomaterials* 2005;26:7136-44.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a permis de développer la synthèse de microparticules polysaccharides injectables dans la circulation sanguine, pouvant être combinées à un agent ciblant et à deux types d'agents de contraste. Nous avons validé l'utilisation de ce système comme outil d'imagerie moléculaire de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) en tomodensitométrie par émission monophotonique (TEMP) et en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous allons maintenant revenir sur les résultats encourageants que nous avons obtenus avec les microparticules dans les 2 projets de cette thèse. Nous discuterons dans un premier temps de l'avenir clinique de cette nouvelle technologie en tant **qu'outil d'imagerie moléculaire** pour la **TEMP** et pour l'**IRM**. Nous verrons que nous avons également combiné notre support polysaccharide à un **agent de contraste échogène** et nous présenterons les résultats préliminaires obtenus avec cette 3^{ème} modalité d'imagerie. Enfin, nous expliquerons en quoi les propriétés de ciblage des microparticules fonctionnalisées semblent adéquates **pour vectoriser un principe actif** dans la paroi des anévrismes.

Outil d'imagerie TEMP

Le premier projet a permis la mise au point d'un outil d'imagerie moléculaire prometteur pour le diagnostic de l'anévrisme de l'aorte abdominale et potentiellement toutes les autres pathologies artérielles caractérisées par l'expression de P-Sélectine. En effet, les microparticules polysaccharides fonctionnalisées avec des chaînes de fucoïdane et radiomarquées au technétium 99m (^{99m}Tc) ont apporté une excellente prise de contraste en imagerie TEMP au niveau d'anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) chez le rat.

Plus précisément, cet outil s'avère plus performant que le **fucoïdane libre radiomarké** dont la prise de contraste apportée se limite au thrombus intraluminal dans le même modèle d'AAA obtenu par perfusion d'élastase dans l'aorte abdominale de rats [72]. Les images d'autoradiographie des coupes transversales des AAA (Figure S3, Projet 1, p 64) révèlent clairement que les microparticules apportent un signal dans toute la paroi anévrismale et pas seulement dans la zone thrombosée. Avec un diamètre hydrodynamique plus grand et plusieurs ligands en surface, notre système présente vraisemblablement une capacité de ciblage améliorée par rapport à la macromolécule en solution [76, 77].

Nous avons également confronté notre technologie avec le seul outil d'imagerie moléculaire utilisé actuellement en clinique ; le **¹⁸F-fluoro-deoxy-glucose** (¹⁸F-FDG). En révélant en imagerie TEP les cellules à forte activité métabolique, le ¹⁸F-FDG est actuellement d'une grande utilité pour le diagnostic des AAA [49, 125]. Dans une étude clinique réalisée avec une cohorte de 39 patients dont 24 patients sains, 12 patients présentant un AAA peu avancé (dit asymptomatique) et 3 patients présentant un AAA très avancé (dit symptomatique), le signal apporté par le ¹⁸F-FDG dans la paroi des anévrismes est 2,5 fois plus élevé que le signal mesuré dans la paroi de l'aorte abdominale de

patients sains, auxquels on a injecté le même produit [48]. Dans notre étude, sur des anévrismes correspondant à un état symptomatique, nous mesurons une augmentation de signal plus importante, avec un ratio de 3,5 comparé au signal obtenu sur une aorte saine.

La Figure 19 ci-dessous présente l'imagerie moléculaire de l'AAA chez le rat obtenue en TEMP couplée à de la tomodensitométrie (TDM) avec les microparticules radiomarquées au ^{99m}Tc que nous avons développées (Figure 19 A), en TEMP avec le fucoïdane libre radiomarqué au ^{99m}Tc (Figure 19 B) et en TEP avec ^{18}F -FDG (Figure 19C). La comparaison des images confirme notre analyse à savoir que la prise de contraste obtenue avec les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane est intense et couvre tout l'AAA, celle obtenue avec le ^{99m}Tc -Fucoïdane est aussi intense mais limitée au thrombus intraluminal (ILT) et celle obtenue avec le ^{18}F -FDG couvre tout l'anévrisme, à l'instar du signal apporté par nos microparticules, mais avec un rehaussement plus faible.

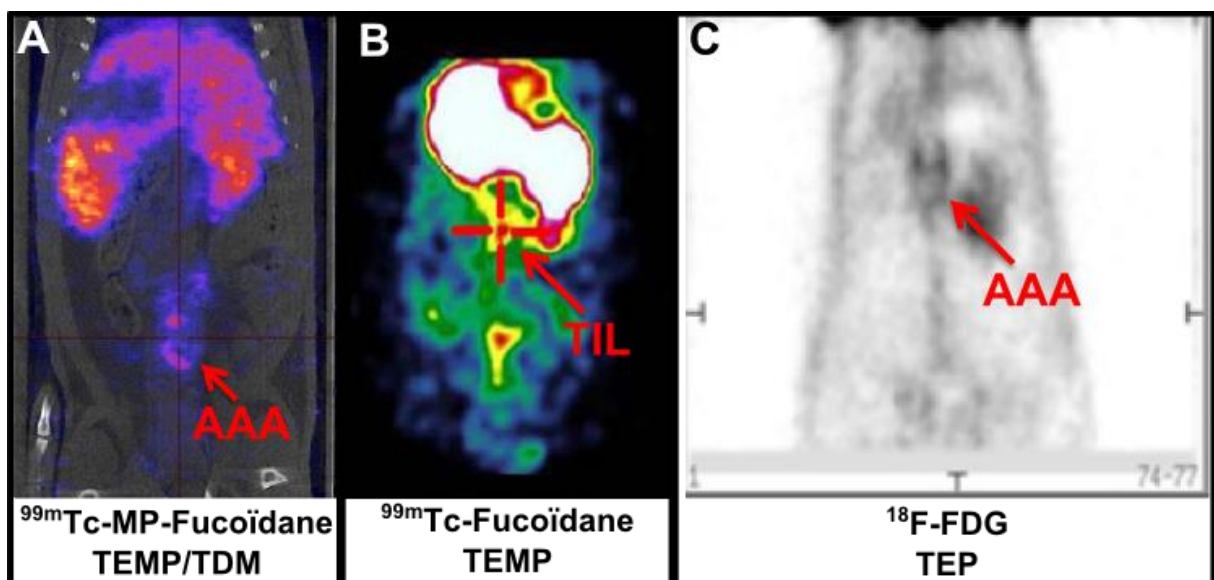


Figure 19. Plans coronaux des acquisitions en scintigraphie obtenues avec 3 méthodes d'imagerie moléculaire de l'AAA chez le rat. A. Image TEMP/TDM d'un rat présentant un AAA (induit par perfusion d'élastase) après injection de ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane. B. Image TEMP d'un rat présentant un AAA (induit par perfusion d'élastase) après injection de ^{99m}Tc -Fucoïdane [72]. C. Image TEP d'un rat présentant un AAA (induit par xéno greffe de l'aorte abdominal décellularisée d'un cochon d'inde [126]) après injection de ^{18}F -FDG [127].

Notre système apporte donc un signal équivalent à celui d'une méthode d'ores et déjà utilisée en clinique, en ce qui concerne la détection d'AAA à un stade avancée. Mais l'utilité clinique d'un tel outil d'imagerie ne se limite pas à ce diagnostic tardif. En effet, apporter une caractérisation moléculaire de la paroi pathologique doit permettre plus qu'une simple détection de la maladie, cela doit également permettre de **mesurer le degré d'inflammation** afin de prévoir **les risques d'évolution** de la pathologie.

La littérature sur la capacité du ^{18}F -FDG à remplir cette mission de prévision des risques de rupture de l'AAA n'est pas unanime. Des études cliniques expliquent que ce radiotracer qui révèle l'activité

métabolique des cellules serait capable de prédire l'évolution et le risque de rupture des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) [48, 79, 128]. Toutefois, la corrélation entre cellules à forte activité métabolique détectée dans la paroi artérielle et évolution de l'AAA est discutée. Une étude clinique explique même qu'une relation inverse a été observée : sur une cohorte de 25 patients présentant un AAA, le lien entre le rehaussement mesuré en TEP après injection de ^{18}F -FDG et la croissance de l'AAA sur 1 an mesurée par échographie a été corrélé négativement [129].

Pour cette raison, le défi de l'imagerie moléculaire reste non résolu en ce qui concerne la prédiction d'évolution des AAA et d'autres outils de diagnostic permettant d'identifier l'expression pathologique d'autres molécules de la paroi des AAA sont nécessaires. Bien que la méthode ^{18}F -FDG couplée à l'imagerie TEP ait permis d'améliorer le diagnostic des AAA, mais également celui de nombreuses tumeurs et autres maladies liées à une activité inflammatoire conséquente, il semble que les cellules à forte activité métabolique ne constituent pas la cible idéale pour l'imagerie moléculaire de l'AAA. La recherche médicale dans ce domaine a donc pour objectif de mettre au point un outil de prévision plus fiable et les $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdane ont, pour le moment, tous les atouts nécessaires pour répondre à ce besoin. En effet, leurs capacités de détection des anévrismes à un stade avancé semblent aussi bonnes, voire meilleures. Il reste maintenant à étudier la capacité de notre outil d'imagerie moléculaire de la P-Sélectine à prédire l'évolution de cette maladie.

Les connaissances dans les mécanismes biologiques impliqués dans la formation, la progression puis la rupture des anévrismes ne sont pas encore suffisamment précises pour établir une corrélation claire entre l'expression de la P-Sélectine et l'évolution de cette pathologie. Toutefois, on sait que cette molécule clé est impliquée, via son interaction avec la P-Sélectine Glycoprotéine Ligand-1 (PSGL-1) :

- Dans le recrutement des cellules immunitaires lors du processus inflammatoire lié à la progression des AAA. Il a été démontré qu'un knockout de la P-Sélectine inhibe la formation d'AAA suite à une perfusion d'élastase dans l'aorte abdominale chez la souris [124].
- Dans la thrombogénèse artérielle en induisant la formation d'agrégats leucocytes-plaquettes et en favorisant la coagulation [130, 131]. Il a été démontré qu'un knockout de la P-Sélectine inhibe la formation de thrombose induite par chlorure de fer chez la souris [132].

La littérature fournit donc des éléments qui tendent à relier l'expression de la P-Sélectine avec l'évolution des anévrismes et des thrombi intra-anévrismaux. Ce lien semble plus spécifiquement lié au processus inflammatoire que l'on cherche à identifier que ne l'est la consommation du glucose détectée par le ^{18}F -FDG. Le choix de la P-Sélectine comme cible d'imagerie moléculaire semble donc être une stratégie prometteuse quant à la réalisation d'un outil permettant de prédire l'évolution des anévrismes. Toutefois, cette théorie demande à être confirmée et une partie des futurs travaux qui s'inscriront dans la suite de mon projet de thèse consistera à tester la capacité des $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MP-Fucoïdane à prédire la croissance et le risque de rupture des AAA.

Risque de toxicité induit par un tel outil d'imagerie moléculaire :

La première étude de ce projet de thèse a donc permis de démontrer l'efficacité et le fort potentiel clinique des microparticules polysaccharides radiomarquées.

Mais avant d'administrer cet outil d'imagerie moléculaire chez l'homme, il ne suffit pas de valider son efficacité, il faut également **évaluer les risques de toxicité**. L'institution ICH (International Conference on Harmonisation) qui a pour mission d'harmoniser les différentes réglementations propres aux autorités d'Europe, du Japon et des Etats-Unis concernant la mise sur le marché des produits pharmaceutiques préconise ainsi un certain nombre de tests de toxicité à effectuer en préclinique avant de passer aux essais cliniques chez l'homme [133].

Croyant fermement à leur potentiel clinique, nous avons décidé d'entamer les études de toxicité induite par les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane.

Dans un premier temps, nous avons testé l'éventuel **hémotoxicité** induite par les microparticules ; c'est-à-dire la toxicité vis-à-vis des globules rouges. Pour cela, nous avons simplement étudié *in vitro* la viabilité des globules rouges après 1h d'incubation en présence de suspensions de microparticules, en se plaçant dans des concentrations reproduisant les conditions que nous avons testé *in vivo* chez le rat. Nous avons observé que les suspensions de microparticules fonctionnalisées ou non fonctionnalisées induisent une hémotoxicité minime, comparable à la faible hémotoxicité provoquée par l'incubation avec du sérum physiologique. Ces premières données très positives concernant la toxicité de l'outil d'imagerie développé sont présentées dans la partie résultat du premier projet de cette thèse.

Afin d'étudier plus précisément le temps de circulation des microparticules après injection dans la circulation sanguine, nous avons mesuré **les cinétiques sanguine et plasmatique** des microparticules.

Pour cela nous avons injecté les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane dans les mêmes conditions que pour les expériences *in vivo* du premier projet (200 μL de suspensions à 5% (w/w) correspondant à une activité d'environ 37 MBq) et nous avons mesuré la radioactivité dans le sang et le plasma à différents temps post-injection afin d'évaluer la quantité de microparticules encore circulant à ces différents temps (Figure 20 A et 20 B).

Nous avons également étudié **la biodistribution** des microparticules dans les différents organes après injection chez des rats sains (toujours dans les mêmes conditions). Nous avons pour cela sacrifié les rats à 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures après injection et nous avons mesuré la radioactivité retrouvée dans les différents tissus de l'organisme, puis remonté au pourcentage de radioactivité par organe (Figure 20 C).

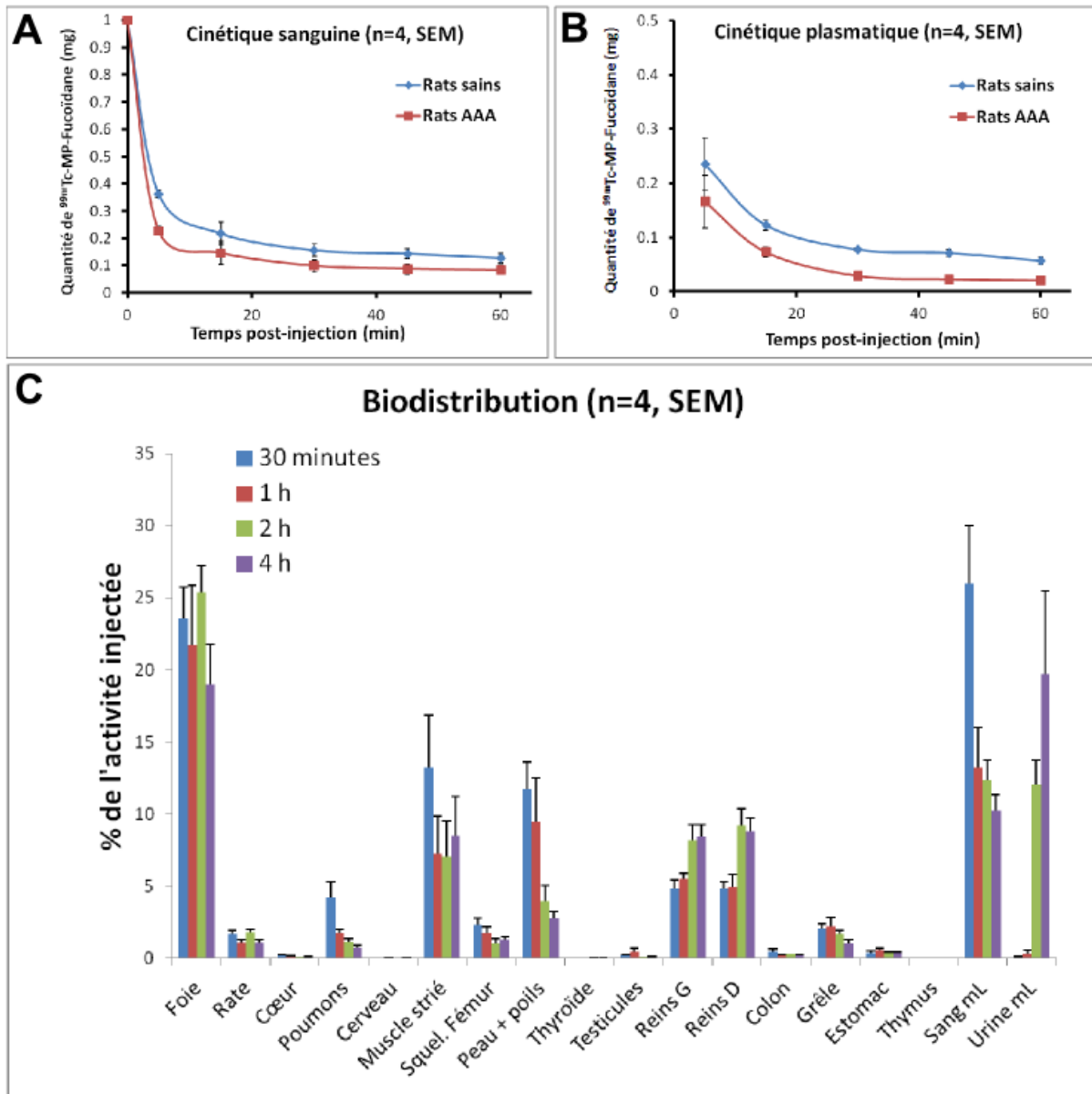


Figure 20 : Etudes pharmacocinétiques des ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane. Cinétique sanguine (A) et plasmatique (B) chez des animaux sains et présentant un AAA. C. Biodistribution des ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane à 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures après injection.

Les cinétiques révèlent une élimination très rapide des compartiments sanguins et plasmatiques chez les rats sains et les rats AAA. L'élimination semble légèrement plus rapide pour les rats malades que pour les rats sains. En étudiant la biodistribution on comprend que les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane sont rapidement assimilées par les organes de clairance (foie, reins, rate) puis éliminées par voie urinaire. De plus, la quantité piégée dans les poumons semble diminuer avec le temps, ce qui suggère que les microparticules n'obstruent pas les capillaires écartant ainsi le risque d'embolie pulmonaire.

Nous avons également engagé une collaboration avec l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) afin d'évaluer la radiotoxicité induite par nos microparticules radiomarquées. A

partir des données de biodistribution à différents temps post-injection, le Laboratoire d'Évaluation de la Dose Interne avec lequel nous avons travaillé possède les compétences pour évaluer les risques engendrés par les radiations des microparticules radiomarquées au ^{99m}Tc .

L'ensemble de ces résultats est prometteur quant à la toxicité et l'élimination rapide par les organes de clairance des ^{99m}Tc -MP-Fucoïdanes et fera l'objet d'une publication dont je serai le second auteur et Aurélie Desbrée, chercheur au laboratoire d'évaluation de la dose interne, sera le premier auteur.

Outil d'IRM

Le second projet de cette thèse a permis de valider l'utilisation des microparticules polysaccharides comme outil d'imagerie moléculaire pour une autre modalité d'imagerie, l'IRM, qui est à l'heure actuelle couramment employée par les médecins pour le diagnostic des pathologies artérielles.

Les microparticules fonctionnalisées avec des chaînes de fucoïdane et chargées en oxyde de fer (MPIO-Fucoïdane) ont apporté une nette prise de contraste dans certaines zones de la paroi anévrismale, après injection dans la circulation sanguine de rats présentant un modèle d'AAA. La sensibilité de détection n'est toutefois pas aussi bonne qu'avec les microparticules radiomarquées en TEMP. Les MPIO-Fucoïdane n'apportent en effet qu'un signal limité à certaines zones présentant une forte activité inflammatoire tandis que les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane apportent en TEMP un signal couvrant plus largement l'anévrisme. Cette différence n'est pas surprenante compte tenu du fait que la TEMP permet une sensibilité de détection plus fine des agents de contraste que l'IRM.

L'étude histologique des anévrismes après imagerie a démontré que les microparticules fonctionnalisées diffusent dans la paroi artérielle dégradée et s'accumulent dans les zones où la P-Sélectine est exprimée. Mais pour obtenir un rehaussement de signal en IRM suffisamment clair pour être interprété, il faut une accumulation de MPIO-Fucoïdane suffisamment dense. Par conséquent, ce 2nd outil d'imagerie moléculaire ne permet de révéler clairement la P-Sélectine que dans les zones où son expression est particulièrement abondante.

Toutefois, même si les MPIO-Fucoïdane développées n'auront certainement pas un grand intérêt pour détecter les anévrismes peu actifs où la P-Selectine n'est alors que peu présente, ils peuvent s'avérer utiles pour évaluer les risques d'évolution et de rupture des AAA actifs. En effet, la littérature concernant les différents effets biologiques liés aux risques de rupture des AAA atteste que les zones de haute activité inflammatoire dans la paroi anévrismale sont plus prédisposées à la rupture [134, 135]. Ainsi, un outil d'imagerie capable de révéler en IRM ces zones à forte activité biologique permettrait de mieux prédire le risque de rupture des anévrismes et donc d'en améliorer la prise en charge.

Des agents de contraste permettant d'identifier en IRM ces zones de haute activité inflammatoire sont d'ores et déjà validés cliniquement pour une aide au diagnostic des AAA. Ainsi, un essai clinique a démontré la faisabilité d'une telle méthode en injectant les mêmes USPIO Sinerem[®] de la compagnie Guerbet que nous avons incorporés dans nos microparticules [39]. Ces nanoparticules de fer recouvertes de chaînes de dextrane sont spontanément captées par les macrophages après injection dans le sang et se retrouvent ainsi dans les zones d'accumulation de macrophages qui correspondent aux zones de haute activité inflammatoire dans la paroi anévrismale. Cette méthode

apporte donc une prise de contraste au niveau de la paroi anévrysmale qui est d'une part suffisante pour avoir un intérêt clinique et d'autre part comparable à la prise de contraste apportée par les MPIO-Fucoïdane que nous développons. De plus, pour obtenir une prise de contraste avec les USPIO non fonctionnalisées, il faut attendre 36 heures après l'injection pour avoir une accumulation suffisante tandis qu'avec nos microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane, la prise de contraste est distinctive dès 20 minutes après l'injection, ce qui facilitera grandement son utilisation en clinique.

Finalement, même si le rehaussement de signal n'est pas aussi intense qu'avec les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane, les MPIO-Fucoïdane pourraient tout de même avoir un intérêt clinique comme outil d'imagerie moléculaire de l'AAA et potentiellement des autres pathologies artérielles caractérisées par une forte expression de la P-Sélectine. Par ailleurs, l'IRM étant une modalité d'imagerie médicale plus largement disponible dans les hôpitaux et présentant moins de risque pour le patient que les méthodes de scintigraphie et de tomodensitométrie, le développement d'un outil d'imagerie moléculaire pour l'IRM aura toujours une grande utilité. Il faut toutefois garder à l'esprit que les MPIO-Fucoïdane développées dans ce projet de thèse présentent un diamètre maximal de 10 μm , ce qui entraîne un risque potentiel d'occlusion vasculaire et de fait limite son utilisation en clinique. Par conséquent, pour les futurs travaux concernant l'utilisation de ces microparticules comme outil d'imagerie moléculaire, la première étape devra s'attacher à trouver un moyen de réduire leur taille.

Outil d'échographie

Nous avons également travaillé sur l'incorporation d'un 3^{ème} type d'agent de contraste dans nos microparticules fonctionnalisées afin de développer un outil d'imagerie moléculaire pour l'échographie.

Pour cela nous avons mis au point un procédé permettant d'encapsuler du perfluorooctyl bromide (PFOB) liquide à l'intérieur des microparticules polysaccharides (Figure 21 A). Le PFOB est incorporé dans la phase aqueuse du procédé d'émulsion-réticulation à laquelle nous avons ajouté du Tween 80 (10 % (v/v)) afin de permettre l'émulsion du PFOB dans la phase aqueuse. On reproduit ensuite les mêmes étapes afin d'émulsionner la phase aqueuse contenant elle-même une émulsion de PFOB.

Nous avons mesuré *in vitro* la capacité des microparticules chargées en PFOB à être détectée en échographie (Figure 21 B). Le signal échogène mesuré, grâce à un dispositif d'échographie *in vitro* en flux, est significativement plus important lorsque les microparticules sont chargées en PFOB que lorsqu'elles ne contiennent pas d'agent de contraste.

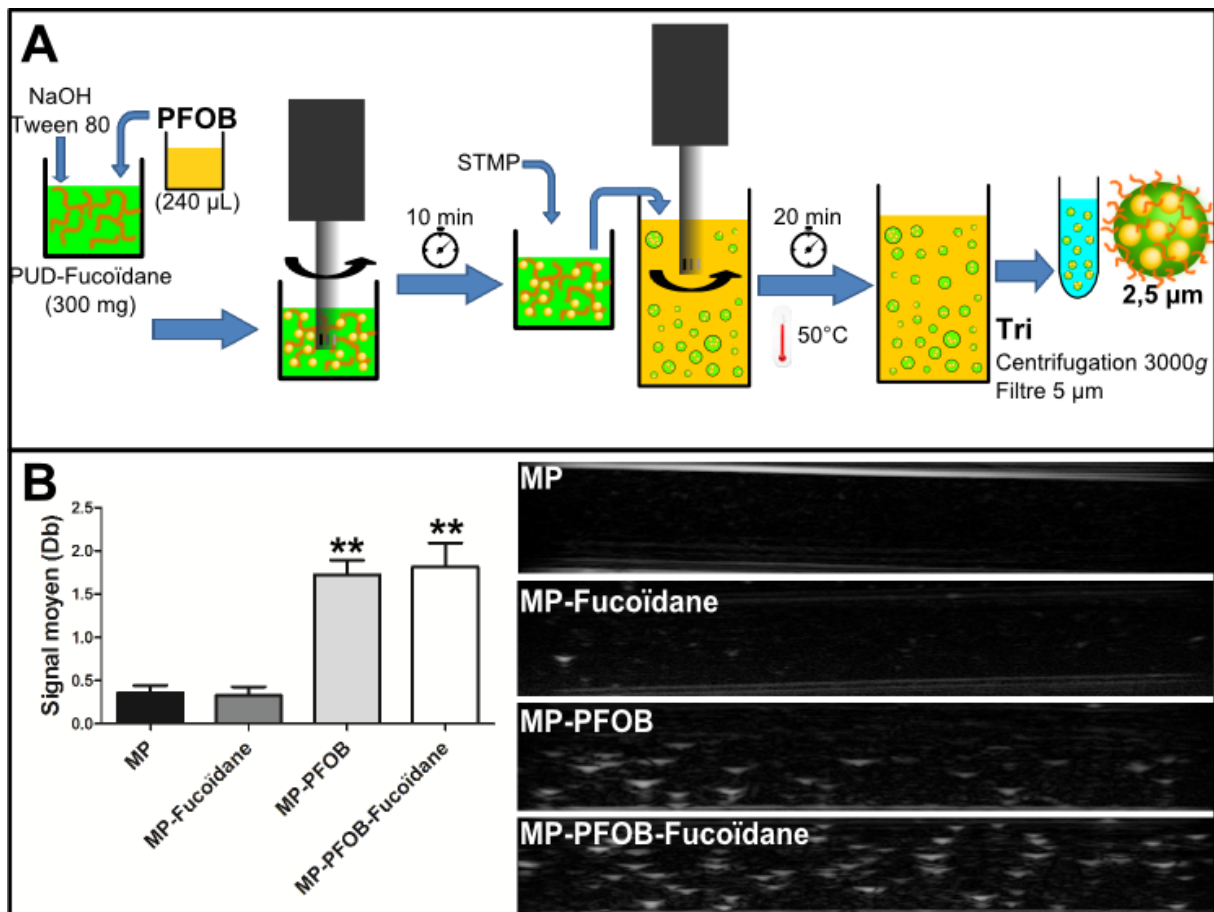


Figure 21. A. Schéma du procédé de fabrication des microparticules incorporant du PFOB liquide. B. Etude d'échographie *in vitro* des microparticules fonctionnalisées ou non avec du fucoïdane, incorporant ou non du PFOB.

Un tel outil d'imagerie moléculaire aurait un intérêt clinique considérable compte tenu du faible coût et de la très large disponibilité de l'échographie dans les hôpitaux. De plus, l'échographie doppler étant d'ores et déjà la méthode la plus couramment utilisée pour le dépistage des AAA, la mise en place d'un dépistage en imagerie moléculaire avec cette modalité serait d'autant plus simple.

Ces résultats préliminaires encourageants ont donné naissance au projet « Microsound » qui a obtenu un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Le développement de ce 3^{ème} outil de diagnostic sera poursuivi dans le cadre de ce projet.

Au cours de cette thèse, nous avons ainsi développé une méthode permettant la fabrication de microparticules outils d'imagerie moléculaire multi-modalités. Nous avons validé l'efficacité de cet outil en préclinique sur des modèle *in vivo* de pathologies artérielles sur 2 modalités (la TEMP et l'IRM) et *in vitro* en échographie. Le fort potentiel clinique que laisse présager l'ensemble de ces résultats, ont encouragé l'Inserm à déposer un brevet pour protéger les procédés de fabrication de ces 3 types de microparticules (^{99m}Tc-MP-Fucoïdane, MPIO-Fucoïdane et MP-PFOB-Fucoïdane). Ce brevet, qui figure en annexe de ce manuscrit et dont je suis co-auteur, a été déposé dans un premier

temps auprès de l'INPI en Février 2012 sous le titre français « *Billes de polysaccharide réticulé comprenant un agent d'imagerie* » et publié depuis Août 2013 (WO2013124444). Un an plus tard, il a fait l'objet d'une extension PCT sous le titre anglais « *Crosslinked polysaccharide beads comprising an imaging agent* ».

Ces microparticules ont donc un avenir prometteur en tant qu'outil diagnostique, nous allons maintenant expliquer en quoi elles ont également un fort potentiel comme outil thérapeutique.

Outil thérapeutique

Après injection dans la circulation sanguine de rats présentant des AAA induits par élastase, les ^{99m}Tc-MP-Fucoïdane, aussi bien que les MPIO-Fucoïdane, sont retrouvées en histologie au sein de la paroi artérielle dégradée des AAA.

Nous avons dans un premier temps cherché à expliquer cette localisation singulière et nous pensons que nos microparticules polysaccharides adoptent un comportement *in vivo* proche de celui des leucocytes. En effet, le fucoïdane présente des groupes sulfatés qui constituent des fonctions homologues au site d'accroche du ligand naturel des leucocytes (la PSGL-1) [110, 121]. Ainsi, fonctionnaliser les microparticules avec du fucoïdane leur confère des propriétés de ciblage proches de celles que l'on observe chez les leucocytes lors de processus inflammatoires [15]. Dans le 2nd projet, nous avons observé que les microparticules fonctionnalisées avançaient lentement le long d'un endothélium activé. Nous pensons que ce lent mouvement est apparenté au phénomène de roulement qui caractérise l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales activées [136]. Au final, nous pensons avoir développé une technologie qui mime les leucocytes avec l'adhésion à la paroi artérielle enflammée en se liant à la P-Sélectine, le roulement le long de la paroi endothéliale activée puis la transmigration dans la paroi artérielle [137]. Cela expliquerait comment les microparticules diffusent dans la paroi anévrismale.

Nous avons donc développé une technologie capable de cibler l'anévrisme puis de diffuser dans sa paroi dégradée en suivant un comportement analogue à celui des leucocytes. Or, comme nous l'avons expliqué dans la partie bibliographie, cette dégradation pathologique de la paroi dans les anévrismes est due à une activité protéolytique intense induite par plusieurs types de leucocytes qui ont migré dans la paroi suite à un recrutement déclenché par le processus inflammatoire [123, 138]. Avec nos microparticules qui imitent le ciblage des leucocytes, nous avons donc développé un système capable de cibler le cœur de l'activité protéolytique responsable de l'évolution de la pathologie. Ce ciblage sera d'autant plus adapté qu'il sera directement lié au degré d'inflammation et donc à l'état d'avancement de la pathologie. Notre technologie constitue donc un moyen idéal pour la vectorisation d'une molécule thérapeutique au sein des anévrismes.

Les travaux de recherche sur les microparticules développées dans cette thèse seront donc également poursuivis dans l'axe thérapeutique. Plus précisément, en ce qui concerne les anévrismes de l'aorte abdominale, je propose de combiner les microparticules fonctionnalisées avec un ou plusieurs inhibiteurs d'enzymes décrits dans la littérature comme ayant une action thérapeutique pour cette pathologie. Ces molécules auraient pour effet de limiter l'activité protéolytique responsable de la dégradation de la média dans la paroi anévrismale et permettraient donc d'inhiber

la progression de la pathologie [139, 140]. Certaines de ces molécules induiraient même une reconstruction de la matrice extracellulaire et permettraient ainsi de réduire la taille des anévrismes [141].

Pour une telle future application, l'utilisation d'un agent de contraste permettrait alors de suivre le devenir des microparticules *in vivo* dans la paroi de l'anévrisme tout en évaluant l'effet thérapeutique. Je pense notamment que les MPIO-Fucoïdane développées pendant cette thèse apporteraient, avec un suivi IRM, tous les moyens nécessaires pour bien observer l'accumulation d'un tel outil tout en mesurant l'évolution du diamètre des AAA.

Le choix d'un support polysaccharide pour la conception d'un tel outil thérapeutique s'avère alors judicieux. En effet, de précédents travaux du laboratoire ont démontré que lors d'une implantation sur un cœur ayant subi une ischémie, des pastilles poreuses de pullulane/dextrane sont biodégradées en un mois [109]. Nos microparticules constituées d'un hydrogel similaire (même composition en polysaccharide à l'exception du fucoïdane et même taux de réticulation) ont donc de fortes chances de se dégrader de la même façon lorsqu'elles se retrouveront au milieu d'un tissu présentant une importante activité inflammatoire, comme c'est le cas lorsqu'elles s'accumulent dans la paroi des AAA. Il est important de mentionner que cette dégradation se ferait en grande partie par une coupure des molécules de polysaccharides en oligosaccharides, voire même en unités constitutives de glucose, avec un risque limité de toxicité locale. Cette biodégradabilité des microparticules pourraient probablement être exploitée comme un moyen de libération contrôlée de molécules thérapeutiques au sein de la paroi anévrismale.

CONCLUSION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires, notamment les pathologies des artères, demeurent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Malgré les progrès en imagerie médicale, le diagnostic de ces maladies reste encore trop peu efficace et actuellement, nous manquons de méthodes non invasives permettant l'identification et la caractérisation des différentes pathologies artérielles. La stratégie de l'imagerie moléculaire qui propose de développer des agents de contraste capables de révéler spécifiquement les molécules exprimées par les parois artérielles lésées, semble être sur la bonne voie pour répondre à ce problème clinique.

L'objectif de ce projet de thèse était de mettre au point un tel outil d'imagerie moléculaire à partir d'un support de type microparticule polysaccharide combiné à un agent ciblant les pathologies artérielles et à des agents de contraste permettant une détection en tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous avons dans un premier temps développé un procédé d'obtention de microparticules polysaccharides fonctionnalisées avec du fucoïdane et pouvant être soit radiomarquées extemporanément au technétium 99m (^{99m}Tc) soit chargées en nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (USPIO). Nous avons ainsi obtenu 2 types de microparticules : les ^{99m}Tc -MP-Fucoïdane et les MPIO-Fucoïdane qui constituent des outils de diagnostic pour l'imagerie TEMP et pour l'IRM respectivement. Nous avons ensuite démontré leur efficacité comme outil d'imagerie moléculaire de la P-Sélectine. Les microparticules développées apportent une nette prise de contraste en imagerie TEMP ou en IRM au niveau des zones de la paroi anévrismale caractérisées par une haute activité inflammatoire sur des modèles d'AAA chez le rat. Nous avons enfin étudié précisément leurs propriétés de ciblage et nous avons observé que les microparticules fonctionnalisées avec du fucoïdane sont capables, après adhésion à la P-Sélectine, de rouler le long d'un endothélium activé et de migrer au sein d'une paroi anévrismale dégradée.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont donc permis la mise au point d'un outil d'imagerie moléculaire prometteur pouvant être combiné à plusieurs agents de contraste. Cette technologie innovante a apporté des résultats prometteurs chez le petit animal et présente un fort potentiel clinique, surtout dans le cas où elle est combinée avec du ^{99m}Tc pour être utilisée en TEMP. Les microparticules développées constituent également un support idéal de thérapie moléculaire, notamment dans le cas où elles sont combinées avec un agent de contraste IRM.

Enfin, mes travaux de thèse et les résultats qu'ils ont générés ont été valorisés par un dépôt de brevet par l'Inserm portant sur l'utilisation des microparticules polysaccharides fonctionnalisées avec du fucoïdane et incorporant divers agents d'imagerie pour le diagnostic moléculaire des pathologies artérielles.

BIBLIOGRAPHIE

1. W.H.O., *World Health Statistics* 2013.
2. *Causes of death 2008 summary tables* 2008. **World health Organization.**
3. Kahle, W., H. Leonhardt, and W. Plater, *Anatomie-Tome 2: Viscères*. 1978, Flammarion.
4. Epstein, F.H. and R. Ross, *Atherosclerosis—an inflammatory disease*. *New England journal of medicine*, 1999. **340**(2): p. 115-126.
5. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(9): p. 938-49.
6. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(6): p. 1015-22.
7. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
8. Gibbins, J.M., *Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 16): p. 3415-25.
9. Klink, A., et al., *Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(6): p. 338-47.
10. Diehm, N., et al., *Novel insight into the pathobiology of abdominal aortic aneurysm and potential future treatment concepts*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007. **50**(3): p. 209-17.
11. Miller, F.J., Jr., et al., *Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(4): p. 560-5.
12. Kibbe, M., T. Billiar, and E. Tzeng, *Inducible nitric oxide synthase and vascular injury*. *Cardiovasc Res*, 1999. **43**(3): p. 650-7.
13. Pearce, W.H. and A.E. Koch, *Cellular components and features of immune response in abdominal aortic aneurysms*. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **800**: p. 175-85.
14. Shi, G.P., et al., *Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(9): p. 1191-7.
15. Shimizu, K., R.N. Mitchell, and P. Libby, *Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. 987-94.
16. Folkesson, M., et al., *Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(2): p. 427-33.
17. Holmes, D.R., et al., *Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications*. *J Vasc Surg*, 1995. **21**(5): p. 761-71; discussion 771-2.
18. Swartbol, P., L. Truedsson, and L. Norgren, *Adverse reactions during endovascular treatment of aortic aneurysms may be triggered by interleukin 6 release from the thrombotic content*. *J Vasc Surg*, 1998. **28**(4): p. 664-8.
19. Hellenthal, F.A., et al., *Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation*. *Nat Rev Cardiol*, 2009. **6**(8): p. 543-52.
20. *Pertinence de la mise en place d'un programme de dépistage des anévrismes de l'aorte abdominale en France*. 2011, Haute Autorité de Santé.
21. Fuster, V., F. Lois, and M. Franco, *Early identification of atherosclerotic disease by noninvasive imaging*. *Nat Rev Cardiol*, 2010. **7**(6): p. 327-33.
22. Miller, J.C., *Imaging for Carotid Artery Stenosis*. *Radiology rounds*, 2012. **10**(9).

23. van der Worp, H.B. and J. van Gijn, *Clinical practice. Acute ischemic stroke*. N Engl J Med, 2007. **357**(6): p. 572-9.
24. Blévec, D.L. *chirurgie-vasculaire.net*. 2013.
25. Weissleder, R. and U. Mahmood, *Molecular imaging*. Radiology, 2001. **219**(2): p. 316-33.
26. Kaufmann, R.B., et al., *Quantification of coronary artery calcium by electron beam computed tomography for determination of severity of angiographic coronary artery disease in younger patients*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**(3): p. 626-32.
27. Taroni, P., et al., *Clinical trial of time-resolved scanning optical mammography at 4 wavelengths between 683 and 975 nm*. J Biomed Opt, 2004. **9**(3): p. 464-73.
28. Luker, G.D.L., K. E., *Optical imaging: current applications and future directions*. J Nucl Med, 2008. **49**(1): p. 1-4.
29. Rosenthal, M.S., et al., *Quantitative SPECT imaging: a review and recommendations by the Focus Committee of the Society of Nuclear Medicine Computer and Instrumentation Council*. J Nucl Med, 1995. **36**(8): p. 1489-513.
30. Rahmim, A. and H. Zaidi, *PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges*. Nucl Med Commun, 2008. **29**(3): p. 193-207.
31. Ramaswamy, A.K., et al., *Molecular imaging of experimental abdominal aortic aneurysms*. Scientific World Journal, 2013. **2013**: p. 973150.
32. Gambhir, S.S., et al., *A tabulated summary of the FDG PET literature*. J Nucl Med, 2001. **42**(5 Suppl): p. 1S-93S.
33. Maddahi, J., *Properties of an ideal PET perfusion tracer: new PET tracer cases and data*. J Nucl Cardiol, 2012. **19 Suppl 1**: p. S30-7.
34. Saraste, A., S.G. Nekolla, and M. Schwaiger, *Cardiovascular molecular imaging: an overview*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(4): p. 643-52.
35. Zolle, I., et al., *Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine*. 2007, Vienna, Austria: Springer.
36. Runge, V.M., *Safety of approved MR contrast media for intravenous injection*. J Magn Reson Imaging, 2000. **12**(2): p. 205-13.
37. Burtea, C., et al., *Magnetic resonance molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in inflammatory lesions using a peptide-vectorized paramagnetic imaging probe*. J Med Chem, 2009. **52**(15): p. 4725-42.
38. McAteer, M.A., et al., *An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide*. Atherosclerosis, 2010. **209**(1): p. 18-27.
39. Richards, J.M., et al., *Abdominal aortic aneurysm growth predicted by uptake of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide: a pilot study*. Circ Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(3): p. 274-81.
40. Tang, T.Y., et al., *The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(22): p. 2039-50.
41. Bucki, M., *Modélisation Biomécanique des Tissus Mous du Cerveau et Développement d'un Neuronavigateur Permettant la Prise en Compte Per-Opératoire du Brain-Shift*. 2008, Université Joseph Fourier: Grenoble.
42. Liu, Y., et al., *Molecular imaging of inflammation and platelet adhesion in advanced atherosclerosis effects of antioxidant therapy with NADPH oxidase inhibition*. Circ Cardiovasc Imaging, 2013. **6**(1): p. 74-82.
43. Villanueva, F.S., et al., *Myocardial ischemic memory imaging with molecular echocardiography*. Circulation, 2007. **115**(3): p. 345-52.
44. Lees, A.M., et al., *Imaging human atherosclerosis with 99mTc-labeled low density lipoproteins*. Arteriosclerosis, 1988. **8**(5): p. 461-70.

45. Okada, M., Y. Morimoto, and T. Sugimoto, [Early diagnosis and therapy of deep venous thrombosis with 111 indium labeled platelets]. Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr, 2001. **118**: p. 497-500.
46. Beilvert, A., et al., Tyrosine polyethylene glycol (PEG)-micelle magnetic resonance contrast agent for the detection of lipid rich areas in atherosclerotic plaque. Magn Reson Med, 2009. **62**(5): p. 1195-201.
47. Hong, H., et al., Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm: the present and the future. Curr Vasc Pharmacol, 2010. **8**(6): p. 808-19.
48. Reeps, C., et al., Increased 18F-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. J Vasc Surg, 2008. **48**(2): p. 417-23; discussion 424.
49. Sakalihasan, N., et al., Positron emission tomography (PET) evaluation of abdominal aortic aneurysm (AAA). Eur J Vasc Endovasc Surg, 2002. **23**(5): p. 431-6.
50. Thiagarajan, P. and J.F. Tait, Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17420-3.
51. Kietselaer, B.L., et al., Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. N Engl J Med, 2004. **350**(14): p. 1472-3.
52. Rouzet, F., et al., Technetium 99m-labeled annexin V scintigraphy of platelet activation in vegetations of experimental endocarditis. Circulation, 2008. **117**(6): p. 781-9.
53. Sarda-Mantel, L., et al., 99mTc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. 2153-9.
54. Nury, C., et al., Detection of endogenous matrix metalloproteinase-12 active form with a novel broad spectrum activity-based probe. J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5636-44.
55. Sheth, R.A., M. Maricevich, and U. Mahmood, In vivo optical molecular imaging of matrix metalloproteinase activity in abdominal aortic aneurysms correlates with treatment effects on growth rate. Atherosclerosis, 2010. **212**(1): p. 181-7.
56. Goergen, C.J., et al., Influences of aortic motion and curvature on vessel expansion in murine experimental aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(2): p. 270-9.
57. Lancelot, E., et al., Evaluation of matrix metalloproteinases in atherosclerosis using a novel noninvasive imaging approach. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 425-32.
58. McEver, R.P., Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. Thromb Haemost, 2001. **86**(3): p. 746-56.
59. Wang, X., et al., Novel single-chain antibody-targeted microbubbles for molecular ultrasound imaging of thrombosis: validation of a unique noninvasive method for rapid and sensitive detection of thrombi and monitoring of success or failure of thrombolysis in mice. Circulation, 2012. **125**(25): p. 3117-26.
60. Nahrendorf, M., et al., Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. Circulation, 2006. **114**(14): p. 1504-11.
61. Segers, F.M., et al., Scavenger receptor-AI-targeted iron oxide nanoparticles for in vivo MRI detection of atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(8): p. 1812-9.
62. Montagne, A., et al., Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. Neuroimage, 2012. **63**(2): p. 760-70.
63. Sirol, M., et al., Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contrast agent. Circulation, 2005. **112**(11): p. 1594-600.
64. Choudhury, R.P., V. Fuster, and Z.A. Fayad, Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 913-25.

65. Foreman, K.E., et al., *C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1147-55.
66. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
67. Leeuwenberg, J.F., et al., *E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro*. Immunology, 1992. **77**(4): p. 543-9.
68. Paschos, K.A., D. Canovas, and N.C. Bird, *The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis*. Cell Signal, 2009. **21**(5): p. 665-74.
69. Hiramatsu, Y., H. Tsujishita, and H. Kondo, *Studies on selectin blocker. 3. Investigation of the carbohydrate ligand sialyl Lewis X recognition site of P-selectin*. J Med Chem, 1996. **39**(23): p. 4547-53.
70. Kannagi, R. *selectin mediated cell recognition and its structural basis*. Beyond Glycogenes 2002.
71. McAteer, M.A., et al., *A leukocyte-mimetic magnetic resonance imaging contrast agent homes rapidly to activated endothelium and tracks with atherosclerotic lesion macrophage content*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(6): p. 1427-35.
72. Rouzet, F., et al., *Radiolabeled Fucoïdan as a P-Selectin Targeting Agent for In Vivo Imaging of Platelet-Rich Thrombus and Endothelial Activation*. J Nucl Med, 2011. **52**(9): p. 1433-1440.
73. Bourekas, E.C., R.H. Tupler, and E.H. Turbner, *Indium-111 imaging of an inflammatory abdominal aortic aneurysm*. J Nucl Med, 1992. **33**(8): p. 1553-5.
74. Ryo, U.Y. and S.M. Pinsky, *Radionuclide angiography with 99m technetium-RBCs*. CRC Crit Rev Clin Radiol Nucl Med, 1976. **8**(1): p. 107-28.
75. Allen, T.M., et al., *Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1066**(1): p. 29-36.
76. Jung, H., A.D. Robison, and P.S. Cremer, *Multivalent ligand-receptor binding on supported lipid bilayers*. J Struct Biol, 2009. **168**(1): p. 90-4.
77. Wang, X., O. Ramstrom, and M. Yan, *Glyconanomaterials: synthesis, characterization, and ligand presentation*. Adv Mater, 2010. **22**(17): p. 1946-53.
78. Zern, B.J., et al., *Reduction of nanoparticle avidity enhances the selectivity of vascular targeting and PET detection of pulmonary inflammation*. ACS Nano, 2013. **7**(3): p. 2461-9.
79. Sakalihan, N., R. Hustinx, and R. Limet, *Contribution of PET scanning to the evaluation of abdominal aortic aneurysm*. Semin Vasc Surg, 2004. **17**(2): p. 144-53.
80. Bachelet, L., et al., *Affinity of low molecular weight fucoïdan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009. **1790**(2): p. 141-146.
81. Dimastromatteo, J., et al., *In vivo molecular imaging of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice using VCAM-1-specific, 99mTc-labeled peptidic sequences*. J Nucl Med, 2013. **54**(8): p. 1442-9.
82. Hartung, D., et al., *Radiolabeled Monocyte Chemotactic Protein 1 for the detection of inflammation in experimental atherosclerosis*. J Nucl Med, 2007. **48**(11): p. 1816-21.
83. Palabrica, T.M., et al., *Thrombus imaging in a primate model with antibodies specific for an external membrane protein of activated platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(3): p. 1036-40.
84. Starmans, L.W., et al., *Evaluation of In-labeled EPep and FibPep as tracers for fibrin SPECT imaging*. Mol Pharm, 2013.
85. Reynolds, P.R., et al., *Detection of vascular expression of E-selectin in vivo with MR imaging*. Radiology, 2006. **241**(2): p. 469-76.
86. Vymazal, J., et al., *Thrombus imaging with fibrin-specific gadolinium-based MR contrast agent EP-2104R: results of a phase II clinical study of feasibility*. Invest Radiol, 2009. **44**(11): p. 697-704.

87. Yang, H., et al., *Adhesion of bio-functionalized ultrasound microbubbles to endothelial cells by targeting to vascular cell adhesion molecule-1 under shear flow*. Int J Nanomedicine, 2011. **6**: p. 2043-51.
88. Diaz-Lopez, R., et al., *The performance of PEGylated nanocapsules of perfluorooctyl bromide as an ultrasound contrast agent*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1723-31.
89. Sanvicens, N. and M.P. Marco, *Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 425-33.
90. McLachlan, S.J., et al., *Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent*. J Magn Reson Imaging, 1994. **4**(3): p. 301-7.
91. Tibbals, H.F., *Medical nanotechnology and nanomedicine*. 2010: CRC Press.
92. Shi, Y. and X. Li, *Biomedical applications and adverse health effects of nanomaterials*. J Nanosci Nanotechnol, 2012. **12**(11): p. 8231-40.
93. Vardharajula, S., et al., *Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 5361-74.
94. Bottini, M., N. Rosato, and N. Bottini, *PEG-modified carbon nanotubes in biomedicine: current status and challenges ahead*. Biomacromolecules, 2011. **12**(10): p. 3381-93.
95. Agrawal, P., G.J. Strijkers, and K. Nicolay, *Chitosan-based systems for molecular imaging*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(1): p. 42-58.
96. Storm, G. and D.J. Crommelin, *Liposomes: quo vadis?* Pharmaceutical Science & Technology Today, 1998. **1**(1): p. 19-31.
97. Li, K., et al., *Multifunctional dendrimer-based nanoparticles for in vivo MR/CT dual-modal molecular imaging of breast cancer*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 2589-600.
98. Kim, Y., et al., *Dendrimer probes for enhanced photostability and localization in fluorescence imaging*. Biophys J, 2013. **104**(7): p. 1566-75.
99. Gupta, A.S., *Nanomedicine approaches in vascular disease: a review*. Nanomedicine, 2011. **7**(6): p. 763-79.
100. Olivier Andreoletti, D.L.B., Declan Bolton, Patrick Butaye, Paul Cook, Robert Davies, Pablo S. Fernández Escámez, John Griffin, Tine Hald, Arie Havelaar, Kostas Koutsoumanis, Roland Lindqvist, James McLauchlin, Truls Nesbakken, Miguel Prieto, Antonia Ricci, Giuseppe Ru, Moez Sanaa, Marion Simmons, John Sofos and John Threlfall, *Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update)* EFSA Journal, 2012. **10**(12): p. 84.
101. R. Anton, S.B., D. Boskou, L. Castle, R. Crebelli, W. Dekant, K.-H. Engel, S. Forsythe, W. Grunow, J. Ireland, J.-C. Larsen, C. Leclercq, W. Mennes, M.-R. Milana, I. Pratt, I. Rietjens, K. Svensson, P. Tobback, F. Toldrá, *Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Pullulan PI-20 for use as a new food additive*. EFSA Journal, 2004 **85**: p. 1-32.
102. Larm, O., B. Lindberg, and S. Svensson, *Studies on the length of the side chains of the dextran elaborated by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512*. Carbohydr Res, 1971. **20**(1): p. 39-48.
103. Leathers, T.D., *Biotechnological production and applications of pullulan*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. **62**(5-6): p. 468-73.
104. Miao, X., *Synthesis and characterization of hydrophobically modified derivatives of polysaccharides*. 2006: Grenoble.
105. Autissier, A., et al., *Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process*. Acta Biomater, 2010. **6**(9): p. 3640-8.
106. Autissier, A., D. Letourneur, and C. Le Visage, *Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **82A**(2): p. 336-342.
107. Abed, A., et al., *Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels*. J Biomed Mater Res A, 2011. **96**(3): p. 535-42.

108. Lavergne, M., et al., *Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells*. *Macromol Biosci*, 2012. **12**(7): p. 901-10.
109. Le Visage, C., et al., *Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection*. *Tissue Eng Part A*, 2012. **18**(1-2): p. 35-44.
110. Li, B., et al., *Fucoidan: structure and bioactivity*. *Molecules*, 2008. **13**(8): p. 1671-95.
111. Wijesinghe, W.A.J.P. and Y.-J. Jeon, *Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **88**(1): p. 13-20.
112. Athukorala, Y., et al., *Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea*. *Bioresour Technol*, 2007. **98**(9): p. 1711-6.
113. Min, S.K., et al., *An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative study of Undaria pinnatifida sporophylls and Fucus vesiculosus*. *Phytother Res*, 2012. **26**(5): p. 752-7.
114. Cumashi, A., et al., *A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds*. *Glycobiology*, 2007. **17**(5): p. 541-52.
115. Lee, S.H., et al., *Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from Ecklonia cava in zebrafish model*. *Carbohydr Polym*, 2013. **92**(1): p. 84-9.
116. Uhm, C.S., et al., *Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats*. *Neurosci Lett*, 2003. **353**(1): p. 21-4.
117. Park, H.Y., et al., *Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-kappaB, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells*. *Food Chem Toxicol*, 2011. **49**(8): p. 1745-52.
118. Luo, D., et al., *Fucoidan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **617**(1-3): p. 33-40.
119. Haneji, K., et al., *Fucoidan extracted from Cladosiphon okamuranus Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells*. *Nutr Cancer*, 2005. **52**(2): p. 189-201.
120. Teruya, T., et al., *Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured Cladosiphon okamuranus TOKIDA in U937 cells*. *Int J Biol Macromol*, 2007. **41**(3): p. 221-6.
121. Mehta, P., R.D. Cummings, and R.P. McEver, *Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32506-13.
122. Anidjar, S., et al., *Elastase-induced experimental aneurysms in rats*. *Circulation*, 1990. **82**(3): p. 973-81.
123. Krettek, A., G.K. Sukhova, and P. Libby, *Elastogenesis in human arterial disease: a role for macrophages in disordered elastin synthesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(4): p. 582-7.
124. Hannawa, K.K., et al., *Attenuation of experimental aortic aneurysm formation in P-selectin knockout mice*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1085**: p. 353-9.
125. Kotze, C.W., et al., *Increased metabolic activity in abdominal aortic aneurysm detected by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT)*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009. **38**(1): p. 93-9.
126. Allaire, E., et al., *The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts*. *Surgery*, 1997. **122**(1): p. 73-81.
127. Sarda-Mantel, L., et al., *Comparison of 18F-fluoro-deoxy-glucose, 18F-fluoro-methyl-choline, and 18F-DPA714 for positron-emission tomography imaging of leukocyte accumulation in the aortic wall of experimental abdominal aneurysms*. *J Vasc Surg*, 2012. **56**(3): p. 765-73.

128. Reeps, C., et al., *Glucose metabolism in the vessel wall correlates with mechanical instability and inflammatory changes in a patient with a growing aneurysm of the abdominal aorta*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2009. **2**(6): p. 507-9.
129. Kotze, C.W., et al., *What is the relationship between (1)(8)F-FDG aortic aneurysm uptake on PET/CT and future growth rate?* *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011. **38**(8): p. 1493-9.
130. Furie, B. and B.C. Furie, *Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(4): p. 171-8.
131. Vandendries, E.R., B.C. Furie, and B. Furie, *Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(3): p. 459-66.
132. Yokoyama, S., et al., *Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(8): p. 1280-6.
133. ICH, *ICH Harmonised Safety Guideline*. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 1998.
134. Choke, E., et al., *A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2005. **30**(3): p. 227-44.
135. Vallabhaneni, S.R., et al., *Heterogeneity of tensile strength and matrix metalloproteinase activity in the wall of abdominal aortic aneurysms*. *J Endovasc Ther*, 2004. **11**(4): p. 494-502.
136. Dunne, J.L., et al., *Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 336-41.
137. Kehoe, J.W. and C.R. Bertozzi, *Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions*. *Chem Biol*, 2000. **7**(3): p. R57-61.
138. Hellenthal, F.A., et al., *Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration*. *Nat Rev Cardiol*, 2009. **6**(7): p. 464-74.
139. Miralles, M., et al., *Indomethacin inhibits expansion of experimental aortic aneurysms via inhibition of the cox2 isoform of cyclooxygenase*. *J Vasc Surg*, 1999. **29**(5): p. 884-92; discussion 892-3.
140. Liao, S., et al., *Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors*. *J Vasc Surg*, 2001. **33**(5): p. 1057-64.
141. Yoshimura, K., et al., *Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase*. *Nat Med*, 2005. **11**(12): p. 1330-8.

ANNEXE : BREVET

Crosslinked polysaccharide beads comprising an imaging agent

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for preparing beads comprising imaging agent. The present invention further provides beads highly useful for medical imaging.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Medical imaging is a widely used technique allowing the visualization of the organs and the cells within a human body. For several critical conditions medical imaging became a key factor in the diagnosis of said conditions and the management of the appropriate therapies.

New strategies for carrying out such imaging are currently under investigation, especially as for the development of new imaging molecules. Proper choice of an imaging molecule constitutes the key for providing an accurate image.

Imaging molecules need to provide very target-specific binding and sufficient stability in the circulation to allow strong and selective accumulation. They need to be non-toxic and sensitively detectable. Highly controlled physical characteristics should help obtain more uniform kinetic behavior and contribute to the implementation of quantitative detection techniques.

Because of problems inherent with the use of many presently available imaging molecules, there is an unfulfilled need for new agents adaptable for clinical use.

There is indeed a need for imaging molecules which alleviates concerns with known imaging molecules and allows high contrast images to be achieved, with low toxicity. It would also be desirable to provide molecules for use in medical imaging that provide specific biodistribution (permitting a variety of organs to be targeted), have a size sufficiently small to permit free circulation through a subject's vascular system or by blood perfusion, while being ultimately metabolized and/or

excreted by the subject. There is also a need for drug delivery materials that allow drugs or other therapeutic agents to be delivered to tissues or portions of the body in an effective manner. There is also a need for agents that allow drugs or other therapeutic agents to be introduced into cells of the body.

SUMMARY OF THE INVENTION

The inventors fill the foregoing need by new molecules and strategies for carrying out an imaging method. The inventors indeed developed beads, useful for several well known imaging techniques such as MRI, ultrasound and scintigraphy. More specifically, the inventors developed a method for preparing beads comprising an imaging agent. Said method is advantageous since it may easily be adapted for providing a very specific type of beads, depending on its purpose and adapted to a given imaging technique. In addition, the inventors developed a method for obtaining a new kind of entity for imaging, which are polysaccharide beads comprising an imaging agent and which may be specific to selectins thanks to the presence of fucoidan. The inventors therefore met the burden to create a new class of entities useful for imaging techniques. In addition, they further developed a new class of molecules able to target a specific tissue while imaging.

In a first object, the invention relates to a method for preparing beads comprising an imaging agent comprising the following steps :

- i) preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of at least one polysaccharide, an amount of an imaging agent and an amount of a cross linking agent ;
- ii) dispersing said alkaline aqueous solution into an hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ; and
- iii) transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide;

wherein,

said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof.

In one embodiment, said polysaccharide is fucoidan. In another embodiment, said polysaccharide is pullulan.

In another embodiment, the method of the invention comprises a further step iv) of incubating the beads obtained in step iii) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads.

In a second aspect, the invention provides a method for preparing beads comprising radioactive imaging compounds comprising the following steps :

- a) preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of fucoidan, an amount of at least one polysaccharide and an amount of a cross linking agent ;
- b) dispersing said alkaline aqueous solution into an hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ;
- c) transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide; and
- d) putting the obtained beads in contact with radioactive imaging compounds chosen in the group consisting of carbon-11 (¹¹C), nitrogen-13 (¹³N), oxygen-15 (¹⁵O) and fluorine-18 (¹⁸F), , gallium-68 (⁶⁸Ga), yttrium-91 (⁹¹Y), indium-111 (¹¹¹In), rhenium-186 (¹⁸⁶Re), thallium-201 (²⁰¹Tl), terbium and mixtures thereof:

wherein,

said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof.

In one embodiment, said polysaccharide is fucoidan. In another embodiment, said polysaccharide is pullulan.

In another embodiment, the method of the invention comprises a step c') after step c) and before step d) of incubating the beads obtained in step c) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads.

In a third aspect, the invention relates to a bead comprising an imaging agent obtainable by any of the methods of the invention.

In a fourth aspect, the invention relates to the use of the bead obtainable by any of the methods of the invention as a contrast agent.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definition

As used herein, the term "**polysaccharide**" refers to a molecule comprising two or more monosaccharide units.

As used herein, the term "**alkaline solution**" refers to a solution having a pH strictly superior to 7.

As used herein, the term "**aqueous solution**" refers to a solution in which the solvent is water.

As used herein, the term "**cross-linking**" refers to the linking of one polysaccharide chain to another one with covalent bonds.

As used herein, the term "**cross-linking agent**" encompasses any agent able to introduce cross-links between the chains of the polysaccharides of the invention.

As used herein, the term "**beads**" is used in an interchangeable manner and refer to polysaccharide composition obtainable according to any of the methods of the invention and having a substantially spherical or ovoid shape.

As used herein, the expression "**beads of the invention**", "**imaging entities**" or "**contrasting agent**" are used interchangeably refer to the beads obtained by the methods of the invention, i.e. beads comprising an imaging agent.

As used herein, the term "**nanobeads**" encompasses bead shaving a size of at least 1 nm and inferior to 1000 nm, the term "**microbeads**" encompasses beads having a size of at least 1 μm and inferior to 1000 μm , the term "**macrobeads**" encompasses beads having a size of at least to 1 mm.

As used herein, the term "**biodegradable**" refers to materials that degrade in vivo to non-toxic compounds, which can be excreted or further metabolized.

As used herein, the term "**freeze-drying**" refers to the drying of a deep-frozen material under high vacuum by freezing out the solvent (ie. water) and then evaporating it in the frozen state.

As used herein, the term "**surfactant**" refers to a compound that lowers the surface tension of water.

As used herein, the terms "**non-aqueous phase**", "**lipophilic phase**", "**hydrophobic phase**", and "**oily phase**" may be used in an interchangeable manner.

As used herein, "**w/o emulsion**" or "**water-in-oil emulsion**", refers to the dispersion of an aqueous phase into a lipophilic phase. The term "w/o emulsion" encompasses stable and non-stable emulsion.

As used herein, the term "**imaging agent**" refers to a molecule that can be used to detect specific biological elements using imaging techniques.

Therefore, the term encompasses molecules detectable by well known imaging techniques such as planar scintigraphy (PS), Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), Positron Emission Tomography (PET), contrast-enhanced ultrasonography (CEUS), Magnetic Resonance Imaging (MRI), fluorescence spectroscopy, Computed Tomography, ultrasonography, X-ray radiography, or any combination thereof.

In the context of the invention, said term encompasses:

A) MRI imaging compounds selected in the group consisting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}), and mixtures thereof;

B) radioactive imaging compounds selected in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), technetium-99m (^{99m}Tc), indium-111 (^{111}In), iodine-131 (^{131}I), rhenium-186 (^{186}Re), and thallium-201 (^{201}Tl), terbium and mixtures thereof;

C) contrast-enhanced ultrasonography imaging compounds such as perfluorooctyl bromide (PFOB);

D) fluorescence imaging compounds selected in the group consisting of quantum dots (*i.e.*, fluorescent inorganic semiconductor nanocrystals) and fluorescent dyes such as Texas red,

fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), rhodamine, fluorescein, carbocyanine, Cy-3TM and Cy-5TM (*i.e.*, 3- and 5-N,N'-diethyltetra-methylindodicarbocyanine, respectively), Cy5.5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680, and Atto 565 dyes, merocyanine, styryl dye, oxonol dye, BODIPY dye (*i.e.*, boron dipyrromethene difluoride fluorophore), terbium, and

E) mixtures thereof.

As used herein, the expression "**beads comprising fucoidan**" refers to beads comprising fucoidan obtainable according to the methods of the invention.

In one embodiment, said beads are obtained directly by the methods of the invention because of the presence of fucoidan in the alkaline aqueous solution of step i) or a). In this particular embodiment, the fucoidan is thus in the very structure of the bead. Its presence can be found within the bead as well as on the surface of said beads.

In an alternative embodiment, said beads are obtained by incubating the beads of the invention with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads. In this particular embodiment, the fucoidan is thus on the surface of the beads.

The term "**fucoidan**" or "**fucoidan moiety**" refers to any fucoidan entity exhibiting high affinity, specificity and/or selectivity for selectins. As used herein, the term "**selectin**" has its art understood meaning and refers to any member of the family of carbohydrate-binding, calcium-dependent cell adhesion molecules that are constitutively or inductively present on the surface of leukocytes, endothelial cells or platelets. The term "**E-selectin**", as used herein, has its art understood meaning and refers to the cell adhesion molecule also known as SELE, CD62E, ELAM, ELAM1, ESEL, or LECAM2 (Genbank Accession Numbers for human E-selectin: NM_000450 (mRNA) and NP_000441 (protein)). As used herein, the term "**L-selectin**" has its art understood meaning and refers to the cell adhesion molecule also known as SELL, CD62L, LAM-1, LAM1, LECAM1, LNHR, LSEL, LYAM1, Leu-8, Lyam-1, PLNHR, TQ1, or hLHRc (Genbank Accession Numbers for human L-selectin: NM_000655 (mRNA) and NP_000646 (protein)). The term "**P-selectin**", as used herein, has its art understood meaning and refers to the cell adhesion molecule also known as a SELP, CD62, CD62P, FLJ45155, GMP140, GRMP, PADGEM, or PSEL (Genbank Accession Numbers for human P-selectin: NM_003005 (mRNA) and NP_002996 (protein)).

The terms “**binding affinity**” and “**affinity**” are used herein interchangeably and refer to the level of attraction between molecular entities. Affinities can be expressed quantitatively as a dissociation constant (K_d or K_D), or its inverse, the association constant (K_a or K_A).

The terms “**pathological condition associated with selectins**”, “**disease associated with selectins**” and “**disorder associated with selectins**” are used herein interchangeably. They refer to any disease condition characterized by undesirable or abnormal selectin-mediated interactions. Such conditions include, for example, disease conditions associated with or resulting from the homing of leukocytes to sites of inflammation, the normal homing of lymphocytes to secondary lymph organs, the interaction of platelets with activated endothelium, platelet-platelet and platelet-leukocyte interactions in the blood vascular compartment, and the like. Examples of such disease conditions include, but are not limited to, tissue transplant rejection, platelet-mediated diseases (e.g., atherosclerosis and clotting), hyperactive coronary circulation, acute leukocyte-mediated lung injury (e.g., adult respiratory distress syndrome – ARDS), Crohn’s disease, inflammatory diseases (e.g., inflammatory bowel disease), autoimmune diseases (e.g., multiple sclerosis, myasthenia gravis), infection, cancer (including metastasis), thrombosis, wounds and wound-associated sepsis, burns, spinal cord damage, digestive tract mucous membrane disorders (e.g., gastritis, ulcers), osteoporosis, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, asthma, allergy, psoriasis, septic shock, stroke, nephritis, atopic dermatitis, frostbite injury, adult dyspnoea syndrome, ulcerative colitis, systemic lupus erythematosus, diabetes and reperfusion injury following ischemic episodes.

As used herein, the term “**subject**” refers to a human or another mammal (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, dog, cat, cattle, swine, sheep, horse or primate). In many embodiments, the subject is a human being. In such embodiments, the subject is often referred to as an “**individual**” or to a “**patient**” if the subject is afflicted with a disease or clinical condition. The terms “subject”, “individual” and “patient” do not denote a particular age, and thus encompass adults, children and newborns.

The term “**effective amount**”, when used herein in reference to an imaging agent refers to any amount of said imaging agent which is sufficient to fulfill its intended purpose(s) (e.g., the purpose may be the detection and/or imaging of selectins present in a biological system or in a subject, and/or the diagnosis of a disease associated with selectins).

The term “**biological sample**” is used herein in its broadest sense. A biological sample is generally obtained from a subject. A sample may be of any biological tissue or fluid that can produce

and/or contain selectins. Frequently, a sample will be a "clinical sample", *i.e.*, a sample derived from a patient. Such samples include, but are not limited to, bodily fluids which may or may not contain cells, *e.g.*, blood, urine, saliva, cerebrospinal fluid (CSF), synovial fluid, tissue or fine needle biopsy samples, and archival samples with known diagnosis, treatment and/or outcome history. Biological samples may also include sections of tissues such as frozen sections taken for histological purposes. The term "*biological sample*" also encompasses any material derived by processing a biological sample. Derived materials include, but are not limited to, cells (or their progeny) isolated from the sample, proteins or other molecules extracted from the sample. Processing of a biological sample may involve one or more of: filtration, distillation, extraction, concentration, inactivation of interfering components, addition of reagents, and the like.

As used herein, the abbreviation "MPIO" refers to beads of the invention comprising at least one USPIO.

As used herein, the abbreviation "MPIO-Fuoidan" refers to beads of the invention comprising at least one fuoidan and USPIO.

As used herein, the abbreviation "MP-PFOB" refers to beads of the invention comprising at least one PFOB molecule.

As used herein, the abbreviation "MP-PFOB-Fuoidan" refers to beads of the invention comprising at least one fuoidan and PFOB.

As used herein, the abbreviation " $MP-^{99m}Tc$ " refers to beads of the invention comprising at least one ^{99m}Tc molecule. The abbreviation " $MP-^{99m}Tc$ -fuoidan" refers to microparticles of the invention comprising at least one fuoidan and ^{99m}Tc .

Method for preparing crosslinked beads comprising an imaging agent

In a first object, the invention relates to a method for preparing beads comprising an imaging agent comprising the following steps :

- i) preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of at least one polysaccharide, an amount of at least one imaging agent and an amount of a cross linking agent ;

ii) dispersing said alkaline aqueous solution into an hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ; and

iii) transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide;

wherein

said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof.

By encapsulating the imaging agent in the polysaccharide beads, the invention provides improved molecules useful for imaging techniques. Indeed, the beads of the invention may concentrate a large amount of imaging agents, which ultimately brings a much higher density of imaging agents at the site to be imaged, and therefore a much better contrast. In this embodiment, the imaging agent is encapsulated within the structure of the bead.

In a specific embodiment said polysaccharide is fucoidan. Step iii) therefore provide a bead comprising fucoidan and an imaging agent.

Alternatively, the method of the invention further comprises a step iv) of incubating the beads obtained in step iii) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads. In this embodiment, step iv) thus provides:

- a polysaccharide bead comprising an imaging agent with fucoidan on its surface; or
- a polysaccharide bead comprising imaging agent having fucoidan on its surface, wherein said polysaccharide is fucoidan.

In both of these embodiments, by coupling an imaging agent to a bead comprising fucoidan, the invention provides a new class of imaging entities which are useful in several medical imaging techniques such as MRI signal, in ultrasound or in scintigraphy and in which the imaging entities specifically target a given tissue, thanks to the selectivity of fucoidan toward selectins.

Preferably, said at least one imaging agent is chosen among:

- A) MRI imaging compounds selected in the group consisting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}), and mixtures thereof;

- B) radioactive imaging compounds selected in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), , gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), indium-111 (^{111}In), iodine-131 (^{131}I), rhenium-186 (^{186}Re), and thallium-201 (^{201}Tl), terbium and their mixture thereof;
- C) contrast-enhanced ultrasonography imaging compounds such as perfluorooctyl bromide (PFOB), acoustically active microbubbles and acoustically active liposomes;
- D) fluorescence imaging compounds selected in the group consisting of quantum dots (*i.e.*, fluorescent inorganic semiconductor nanocrystals), fluorescent dyes such as Texas red, fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), rhodamine, fluorescein, carbocyanine, Cy-3TM and Cy-5TM (*i.e.*, 3- and 5-N,N'-diethyltetra-methylindodicarbocyanine, respectively), Cy5.5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680 and Atto 565 dyes, merocyanine, styryl dye, oxonol dye, BODIPY dye (*i.e.*, boron dipyrromethene difluoride fluorophore), and mixtures thereof;
- E) X-ray contrast compounds such as iodine;
- F) mixtures thereof.

In a second aspect, the invention relates to a method for preparing beads comprising radioactive imaging compounds comprising the following steps :

- a)preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of fucoidan, an amount of at least one polysaccharide and an amount of a cross linking agent ;
- b)dispersing said alkaline aqueous solution into an hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ; and
- c)transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide,
- d)putting the obtained beads in contact with radioactive imaging compounds chosen in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), , gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), indium-111 (^{111}In), rhenium-186 (^{186}Re), thallium-201 (^{201}Tl), terbium, and mixtures thereof,

wherein

said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof.

In a specific embodiment, said polysaccharide is fucoidan. Step d) therefore provides a bead comprising fucoidan and at least one radioactive imaging.

In an alternative embodiment, the method of the invention comprises a step c') after step c) and before step d) of incubating the beads obtained in step c) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads. In this embodiment, step d) provides a bead having fucoidan and at least one radioactive imaging compounds on its surface. In both of these embodiments, the bead of the invention comprises fucoidan and at least one radioactive imaging compound which allows the imaging entities of the invention to specifically target a given tissue, thanks to the selectivity of fucoidan toward selectins.

Typically, the step of dispersing the alkaline aqueous solution into the hydrophobic phase comprising a surfactant is performed under mechanical stirring. Typically, such a dispersing step is performed during 10 min. Alternatively, the emulsification process can be performed using a high performance disperser, such as Polytron® Homogenizer.

In a specific embodiment, the method of the invention further comprises the following steps:

- v) or e) of submerging said polysaccharide beads into an aqueous solution; and
- vi) or f) of washing said polysaccharide beads.

Typically, the beads are washed in water or phosphate buffer saline (PBS).

In another embodiment, the method of the invention further comprises a further step vii) or g) of calibrating the beads of the invention according to their size. Typically, the beads are calibrated according to their size using appropriate nylon filter. The skilled man is aware of the nylon filter adapted for the purpose of the invention.

In still another embodiment, the method of the invention further comprises a further step viii) or h) of freeze-drying said beads. Freeze-drying may be performed with any apparatus known in the art. There are essentially three categories of freeze dryers: rotary evaporators, manifold freeze dryers, and tray freeze dryers. Such apparatus are well known in the art and are commercially available such as a freeze-dryer Lyovac (GT2, STERIS Rotary vane pump, BOC EDWARDS). Basically, the vacuum of the chamber is from 0.1 mBar to about 6.5 mBar. The freeze-drying is performed for a

sufficient time to remove at least 98.5 % of the water, preferably at least 99% of the water, more preferably at least 99.5%. Typically, the freeze drying step is performed for 24 hours.

Preferably, the polysaccharide is a mixture of pullulan/dextran. Typically, the weight ratio of pullulan to dextran is 75:25 w/w.

Preferably, the weight ratio of pullulan to fucoidan is comprised between about 9:1 to about 9:2 w/w.

Typically, the imaging agent is in a solution or a suspension form. Preferably, the weight ratio of polysaccharides to imaging agent is comprised between about 50:1 to about 2:1. Typically, said cross-linking agent is selected from the group consisting of trisodium trimetaphosphate (STMP), phosphorus oxychloride (POCl_3), epichlorohydrin, formaldehydes, hydrosoluble carbodiimides, and glutaraldehydes. Preferably, for the purpose of the present invention, said cross-linking agent is STMP.

Typically, the weight ratio of the polysaccharide to the cross linking agent is in the range from 15:1 to 1:1, preferably 6:1.

The skilled artisan is aware of the hydrophobic phases suitable for the purpose of the present invention. Non-limiting examples of hydrophobic phases are vegetal oils, such as canola oil, corn oil, cottonseed oil, safflower oil, soybean oil, extra virgin olive oil, sunflower oil, palm oil, MCT oil, and trioleic oil. Preferably, for the purpose of the present invention, said hydrophobic phase is canola oil. Alternatively, said hydrophobic phase is a silicon fluid. Typically, the quantity of hydrophobic phase in the w/o emulsion (volume of lipophilic phase/volume of the water-in-oil emulsion; v/v) represents from 10% to 99% v/v, preferably from 20% to 80% v/v, preferably from 50% to 80% v/v and most preferably about 70% v/v of the w/o emulsion.

Typically, the surfactant present in the hydrophobic phase of step ii) or b) may be an ionic surfactant, such as sodium lauryl sulfate, or a, such as polyoxyethylene ethers, polyoxyethylene esters, and polyoxyethylene sorbitan and mixtures thereof. In a preferred embodiment, said surfactant is Tween 80.

In one embodiment of the invention, the alkaline aqueous solution of step i) or a) further comprises an amount of a porogen agent. Thus, the invention also provides porous beads. Non-limiting examples of porogen agents are sodium chloride, calcium chloride, ammonium carbonate, ammonium bicarbonate, calcium carbonate, sodium carbonate, and sodium bicarbonate and mixtures thereof. Preferably, for the purpose of the invention, said porogen agent is sodium chloride.

Typically, the weight ratio of the polysaccharide to the porogen agent is in the range from 12:1 to 1:12. In a preferred embodiment, such weight ratio of the polysaccharide to the porogen agent is about 12:14. Typically, the density of the pores is from about 4% to 75%, preferably from about 4% to about 50%.

In a further embodiment, the alkaline solution further comprises a drug. The invention thus provides beads comprising a drug, said beads being highly adapted for administering said drug within a target tissue in the human or animal body. Typically, said drug is a drug having therapeutic effect, such as hormones, chemotactic agent, antibiotic, steroidal or non-steroidal analgesic, immunosuppressant, or anti-cancer drug.

In one particular embodiment, the method of the invention may comprise a further step consisting of hydrating the beads as prepared according to the invention. Said hydration may be performed by submerging the beads in a solution, preferably an aqueous solution (e.g., de-ionized water, water filtered via reverse osmosis, a saline solution, or an aqueous solution containing a suitable active ingredient) for an amount of time sufficient to produce a bead having the desired water content. Typically, when a bead comprising the maximum water content is desired, the bead is submerged in the aqueous solution for an amount of time sufficient to allow the bead to swell to its maximum size or volume. Typically, the bead is submerged in the aqueous solution for at least about 1 hour, preferably at least about 2 hours, and more preferably about 4 hours to about 24 hours. It is understood that the amount of time necessary to hydrate the bead to the desired level will depend upon several factors, such as the composition of the used polysaccharides, the size and thickness of the beads, and the temperature of the solution, as well as other factors.

The method of the invention can further include the step of sterilizing the beads using any suitable process. The beads can be sterilized at any suitable point. A suitable irradiative sterilization technique is for example an irradiation with Cesium 137, 35 Gray for 10 minutes. Suitable non-irradiative sterilization techniques include, but are not limited to, UV-exposure, gas plasma or ethylene oxide methods known in the art. For example, the beads can be sterilized using a sterilization system which is available from Abtox, Inc of Mundelein, Illinois under the trade mark PlazLyte, or in accordance with the gas plasma sterilization processes disclosed in US-5413760 and US-5603895.

In the specific embodiment, the beads of the invention comprise fucoidan. The presence of fucoidan is due to:

- the presence of fucoidan in the alkaline aqueous solution of step i) or a) of the methods of the invention; and/or
- the incubation of the beads of the invention with a solution of fucoidan during step iv) or c') of the methods of the invention.

Fucoidans (also called fucosans or sulfated fucans) are sulfated polysaccharides with a wide spectrum of biological activities, including anticoagulant, antithrombotic, antiviral, antitumor, immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant activities (B. Li et al., *Molecules*, 2008, 13: 1671-1695; D. Logeart et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, 30: 501-508). Fucoidans are α -1,2- or α -1,3- linked L-fucose polymers that are sulfated on position 4 and position 2 or 3 following the glycosidic linkage. However, besides fucose and sulfate residues, fucoidans also contain other monosaccharides (e.g., mannose, galactose, glucose, xylose, etc) and uronic acid groups. It is known in the art that the structure of fucoidans from different brown algae varies from species to species. Furthermore, the structure of fucoidans can also be chemically modified. For example, methods have been developed to increase the percentage of sulfate groups of fucoidans in order to obtain oversulfated fucoidans or fucoidan fragments (T. Nishino et al., *Carbohydr. Res.*, 1992, 229: 355-362; S. Soeda et al., *Thromb. Res.*, 1993, 72: 247-256).

In certain embodiments, the fucoidan moieties have an average molecular weight of about 2000 to about 9000 Da, e.g., about 5000, about 6000, about 7000 or about 8000 Da. In other embodiments, the fucoidan moieties have an average molecular weight of about 10,000 to about 90,000 Da, e.g., about 20,000, about 30,000, about 40,000, about 50,000, about 60,000, about 70,000 or about 80,000 Da. In yet other embodiments, the fucoidan moieties have an average molecular weight of about 100,000 to about 500,000 Da.

Fucoidan moieties suitable for use in the present invention are fucoidan moieties that have some degree of attraction for selectins and can play a targeting role when comprised in an imaging agent. Preferably, fucoidan moieties are stable, non-toxic entities that retain their affinity/specificity/selectivity properties under in vitro and in vivo conditions. In preferred embodiments, fucoidan moieties exhibit high affinity and specificity for selectins, i.e., they specifically and efficiently interact with, bind to, or associate with selectins. Suitable fucoidan moieties include fucoidans that exhibit affinity and specificity for only one of the selectins (i.e., for L-selectin, E-selectin or P-selectin) as well as fucoidans that exhibit affinity and specificity for more than one selectin, including those moieties which can efficiently interact with, bind to or associate with all three selectins.. In certain embodiments, a suitable fucoidan moiety interacts with a selectin,

preferably a human selectin, with a dissociation constant (K_d) between about 0.1 nM and about 500 nM, preferably between about 0.5 nM and about 10 nM, more preferably between about 1 nM and about 5 nM. The design of an inventive imaging agent will be dictated by its intended purpose(s) and the properties that are desirable in the particular context of its use. Thus, fucoidan moieties will be chosen based on their known, observed or expected, properties.

For example, in embodiments where the bead of the invention comprising fucoidan is to be used in the diagnosis of neurodegenerative disorders characterized by undesirable or abnormal selectin-mediated interactions in the brain, the bead will preferably be capable of crossing the blood-brain barrier. Therefore, such a bead will preferably contain a fucoidan moiety of low molecular weight (e.g., 2-8 kDa or lower than 5 kDa). In contrast, an imaging agent containing a fucoidan moiety of high molecular weight will be suited for situations in which the agent is to be used, for example to image selectins in the vascular system. Indeed, because of its high molecular weight, the bead will not be able to easily diffuse and will therefore more likely remain within the vascular system, thereby allowing a more selective targeting of the system of interest. A fucoidan moiety of high molecular weight can also have the advantage of being able to carry a high number of detectable moieties, thus increasing the sensibility of the imaging agent (i.e., allowing the detection of lower concentrations of selectins). In addition to their molecular weight, fucoidan moieties may be selected based on their sulfate content. By varying the sulfate content (either by selection of naturally-occurring fucoidans or by chemical modification), it may be possible to modulate the specificity of the fucoidan moiety (and corresponding imaging agent) for one of the selectins (L-selectin, E-selectin or P-selectin). It is known, for example, that binding to P- and E-selectins increases with the presence of sulfate groups on the ligand (T.V. Pochechueva et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, 13: 1709-1712). Alternatively, a fucoidan moiety may be selected based on its structure and, in particular, based on the presence of at least one functional group that can be used (or that can be easily chemically converted to a different functional group that can be used) to associate the fucoidan moiety to a detectable compound. Examples of suitable functional groups include, but are not limited to, carboxy groups, thiols, amino groups (preferably primary amines), and the like.

Imaging agent are molecules that are detectable by imaging techniques such as ultrasonography, Magnetic Resonance Imaging (MRI), Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), fluorescence spectroscopy, Computed Tomography, X-ray radiography, or any combination of these techniques.

Preferably, imaging agent are stable and non-toxic.

In a first embodiment, said at least one imaging agent invention is an MRI imaging compound. In this embodiment, the bead of the invention is designed to be detectable by Magnetic Resonance Imaging (MRI). MRI, which is an application of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), has evolved into one of the most powerful non-invasive techniques in diagnostic clinical medicine and biomedical research. It is widely used as a non-invasive diagnostic tool to identify potentially maleficent physiological anomalies, to observe blood flow or to determine the general status of the cardiovascular system. MRI has the advantage (over other high-quality imaging methods) of not relying on potentially harmful ionizing radiation.

Typically, said MRI imaging compound is a paramagnetic metal ion. Alternatively, said MRI Imaging compound is an ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particle. Therefore, said MRI imaging compound is selected in the group consisting of an ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}). In certain preferred embodiments, the paramagnetic metal ion is gadolinium III (Gd^{3+}). Gadolinium is an FDA-approved contrast agent for MRI.

USPIO particles are composed of a crystalline iron oxide core containing thousands of iron atoms which provide a large disturbance of the Magnetic Resonance signal of surrounding water. In contrast to other types of nanoparticles such as quantum dots (currently under investigation as extremely sensitive fluorescent probes), USPIO particles exhibit a very good biocompatibility. Therefore, the beads of the invention comprising USPIO are highly appropriate use in imaging.

In a specific embodiment, the imaging agent is incorporated within a bead comprising fucoidan. In this embodiment, the bead of the invention is used for detecting selectins by MRI. Such imaging agents may be particularly useful in the diagnosis of cardiovascular pathologies associated with selectins. Indeed, with a diameter comprised between from 5 nm to 10 μm , preferably between 1 μm and 5 μm , beads of the invention are likely to diffuse only weakly outside the vascular space with the exception of more permeable pathological vascular tissues such as atherosclerotic walls.

The inventors have developed beads comprising a fucoidan and USPIO that proved to be efficient at detecting platelet-rich thrombus by MRI, with high sensitivity and specificity, when used for detecting an aneurysm of the abdominal aorta. Said beads showed a strong MRI contrast and a high affinity for the inner wall of an aneurysm.

In a second embodiment, said at least one imaging agent is a radioactive imaging compound. In this embodiment, the bead of the invention is designed to be detectable by a nuclear medicine

imaging techniques such as planar scintigraphy (PS), Positron Emission Tomography (PET) and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT).

Preferably, said radioactive compound is selected in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), indium-111 (^{111}In), iodine-131 (^{131}I), rhenium-186 (^{186}Re), and thallium-201 (^{201}Tl), terbium and mixtures thereof.

SPECT and PET have been used to detect tumors, aneurysms, irregular or inadequate blood flow to various tissues, blood cell disorders, and inadequate functioning of organs, such as thyroid and pulmonary function deficiencies. Both techniques acquire information on the concentration of radionuclides introduced into a biological sample or a patient's body. PET generates images by detecting pairs of gamma rays emitted indirectly by a positron-emitting radionuclide. A PET analysis results in a series of thin slice images of the body over the region of interest (e.g., brain, breast, liver). These thin slice images can be assembled into a three dimensional representation of the examined area. However, there are only few PET centers because they must be located near a particle accelerator device that is required to produce the short-lived radioisotopes used in the technique. SPECT is similar to PET, but the radioactive substances used in SPECT have longer decay times than those used in PET and emit single instead of double gamma rays. Although SPECT images exhibit less sensitivity and are less detailed than PET images, the SPECT technique is much less expensive than PET and offers the advantage of not requiring the proximity of a particle accelerator. Planar scintigraphy (PS) is similar to SPECT in that it uses the same radionuclides. However, PS only generates 2D-information.

Thus, in certain embodiments, the at least one imaging agent is a radionuclide detectable by PET. Examples of such radionuclides include carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F). In other embodiments, the detectable compound is a radionuclide detectable by planar scintigraphy or SPECT. Examples of such radionuclides include technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), indium-111 (^{111}In), rhenium-186 (^{186}Re), thallium-201 (^{201}Tl) and terbium. Preferably, said imaging agent is technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Indeed, technetium-99m is highly appropriate since over 85% of the routine nuclear medicine procedures that are currently performed use radiopharmaceutical methodologies based on $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

The inventors have injected beads of the invention comprising a bead comprising fucoidan and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Technetium in a healthy rat and a rat suffering suffering from an abdominal aortic aneurysm

(AAA). They showed that radioactivity was found 4 times greater in the rat aorta suffering from AAA than that found in the rat aorta of healthy rat. Therefore they have shown that beads of the invention comprising a fucoidan and a radioactive imaging compound are accumulated at the aneurysm and are thus highly appropriate for imaging such aneurysm. In addition, the method of the invention confers valuable properties to the beads obtained thereof, enhancing their effectiveness as a tracer for scintigraphy since a larger number of imaging agent is grouped within the very structure of the beads which ultimately brings a much higher density of imaging agent at the specific site to be imaged. In addition, the microscopic size of the beads allows a better distribution of the imaging agent within the body. Finally, the beads being made of biodegradable polysaccharides, they do not constitute any danger for the subject in which the imaging techniques are operated.

In a third embodiment, said at least one imaging agent is a contrast-enhanced ultrasonography imaging compound. In this embodiment, the bead of the invention is designed to be detectable by contrast-enhanced ultrasonography (CEUS).

Ultrasound is a widespread technology for the screening and early detection of human diseases. It is less expensive than MRI or scintigraphy and safer than molecular imaging modalities such as radionuclide imaging because it does not involve radiation.

Preferably, said contrast-enhanced ultrasonography imaging compound is perfluorooctyl bromide (PFOB).

In a preferred embodiment, for carrying out this particular embodiment of the invention, the bead of the invention has a diameter comprised between 1 μm and 5 μm . Therefore, they are smaller than red blood cells, allowing them to flow easily through the circulation as well as the microcirculation (F.S. Vallanueva et al., Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med., 2008, 5 Suppl. 2: S26-S32).

Preferably, the imaging agent comprises more than one molecule of PFOB. Consequently, they are highly valuable and overcome an important drawback of the imaging technique of prior art, i.e. they allow a better imaging (because of the numbers of molecules of PFOB within the imaging agent) and an enhanced distribution of the imaging agent within the body.

In a fourth embodiment, said at least one imaging agent is a fluorescence imaging compound. In this embodiment, the bead of the invention is designed to be detectable by fluorescence spectroscopy.

Favourable optical properties of fluorescent compound to be used in the practice of the present invention include high molecular absorption coefficient, high fluorescence quantum yield, and photostability. Preferred fluorescent moieties exhibit absorption and emission wavelengths in the visible (i.e., between 400 and 700 nm) or the near infra-red (i.e., between 700 and 950 nm). Selection of a particular fluorescent compound will be governed by the nature and characteristics of the illumination and detection systems used in the diagnostic method. *In vivo* fluorescence imaging uses a sensitive camera to detect fluorescence emission from fluorophores in whole-body living mammals. To overcome the photon attenuation in living tissue, fluorophores with emission in the near-infrared (NIR) region are generally preferred (J. Rao et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 18: 17-25). Numerous fluorescent compounds with a wide variety of structures and characteristics are suitable for use in the practice of the present invention. Preferably, said fluorescent imaging compound is selected in the group consisting of, quantum dots (i.e., fluorescent inorganic semiconductor nanocrystals) and fluorescent dyes such as Texas red, fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), rhodamine, fluorescein, carbocyanine, Cy-3TM and Cy-5TM (i.e., 3- and 5-N,N'-diethyltetra-methylindodicarbocyanine, respectively), Cy5.5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680, and Atto 565 dyes, merocyanine, styryl dye, oxonol dye, BODIPY dye (i.e., boron dipyrromethene difluoride fluorophore), and mixtures thereof. More preferably, said fluorescent imaging compound is fluorescein isothiocyanate.

Beads obtainable according to the invention

The invention relates to a new class of entities useful for imaging that comprise at least one imaging agent. Indeed, the invention relates to beads obtainable by the methods of the invention. These beads are the only ones which have the remarkable properties provided by the invention. They are valuable since they:

- allow high contrast imaging;
- exhibit low toxicity;
- are biodegradable,
- are ultimately metabolized and/or excreted by the subject, so that it limits any risk or contamination for said subject;
- have an appropriate size for enhancing biodistribution;
- permit free circulation within the patient's vascular system.

Preferably, said beads have a substantially spherical or ovoid shape.

Typically, said polysaccharide beads have a size comprised from 5 nm to 5mm, preferably from 5 nm to 1 mm, preferably from 5 nm to 10µm, preferably from 5 nm to 5 µm, more preferably from 1 µm to 5 µm. The size of the beads would be chosen with precaution by the skilled man in regard with the desired use. The size of the beads of the invention is dependent on the characteristics and parameters of the method of preparing such beads. Typically, the size of the beads of the invention may depend on the nature of the polysaccharide, the agitation provided during the process and the distribution of the polysaccharide within the beads.

The inventors showed that the beads of the invention comprising fucoidan are characterised by the presence of sulphur at their surface, whereas the beads not comprising fucoidan are characterised by the absence of sulphur at their surface.

This demonstrates the presence of fucoidan at the surface of beads comprising fucoidan.

Therefore, the presence of sulphur discriminates the beads of the invention and the beads of prior art.

The skilled person in the art may easily determine whether a given bead has sulphur on its surface or not. Typically, he may use confocal imaging techniques on beads prepared with fluorescent fucoidan. FITC-labelled fucoidan can be observed on the surface of beads as well as inside the bead structure.

In one particular embodiment, the beads of the invention comprise a drug. Said beads thus present the dual advantages to permit medical imaging while providing a drug for treating a patient.

The beads obtainable by the method of the invention can be packaged in any suitable packaging material. Desirably, the packaging material maintains the sterility of the beads until the packaging material is breached.

When used in the purpose of carrying out a scintigraphy, the beads may be stocked as long as necessary before putting them in contact with a radioactive imaging compound in order to obtain a polysaccharide bead comprising fucoidan and said radioactive imaging compound.

Use of the crosslinked polysaccharide beads comprising an imaging agent according to the invention

The invention relates to the use of the beads of the invention as contrasting agent. More specifically, the invention provides beads obtainable by the methods of invention for use in Magnetic Resonance Imaging, wherein said at least one imaging agent is a MRI imaging compound.

Preferably, said MRI imaging compound is selected in the group consisting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}), and mixtures thereof.

The invention further provides beads obtainable by the methods of invention for use in ultrasonography, wherein said at least one imaging agent is a contrast-enhanced ultrasonography imaging compound.

Preferably, said contrast-enhanced ultrasonography imaging compound is perfluorooctyl Bromide.

The invention also provides beads obtainable by the methods of the invention comprising fucoidan and at least one radioactive imaging compound for use in scintigraphy, wherein said radioactive imaging compound is selected in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), technetium-99m (^{99m}Tc), indium-111 (^{111}In), iodine-131 (^{131}I), rhenium-186 (^{186}Re), and thallium-201 (^{201}Tl), terbium and mixtures thereof.

In one aspect, the present invention provides beads obtainable according to the methods of the invention for use for detecting the presence of selectins in a patient, wherein said beads comprises fucoidan and an imaging agent. For this purpose, an effective amount of the imaging agent of the invention is administrated to the patient.

More specifically, the invention provides targeted reagents that are detectable by imaging techniques and methods allowing the detection, localization and/or quantification of selectins in *in vitro* and *ex vivo* systems as well as in living subjects, including human patients.

The present invention provides methods for detecting the presence of selectins in a biological system comprising the step of contacting the biological system with beads comprising an imaging agent obtainable by the method of the invention.

The contacting is preferably carried out under conditions that allow the imaging agent to interact with selectins present in the system so that the interaction results in the binding of the beads to the selectins thanks to the presence of fucoidan. The bead that is bound to selectins present in the system is then detected using an imaging technique. One or more images of at least part of the biological system may be generated. The contacting may be carried out by any suitable method known in the art. For example, the contacting may be carried out by incubation.

The biological system may be any biological entity that can produce and/or contain selectins. For example, the biological system may be a cell, a biological fluid or a biological tissue. The biological system may originate from a living subject (e.g., it may be obtained by drawing blood, by biopsy or during surgery) or a deceased subject (e.g., it may be obtained at autopsy). The subject may be human or another mammal. In certain preferred embodiments, the biological system originates from a patient suspected of having a clinical condition associated with selectins.

The administration is preferably carried out under conditions that allow the imaging agent (1) to reach the area(s) of the patient's body that may contain abnormal selectins (i.e., selectins associated with a clinical condition) and (2) to interact with such selectins so that the interaction results in the binding of the imaging agent to the selectins. After administration of the *selectin-targeted imaging agent* and after sufficient time has elapsed for the interaction to take place, the imaging agent bound to abnormal selectins present in the patient is detected by an imaging technique. One or more (e.g., a series) images of at least part of the body of the patient may be generated. The person skilled in the art will know, or will know how to determine, the most suitable moment in time to acquire images following administration of the imaging agent. Depending on the imaging technique used (e.g., MRI), one skilled in the art will also know, or know how to determine, the optimal image acquisition time (i.e., the period of time required to collect the image data).

Administration of the selectin-targeted imaging agent can be carried out using any suitable method known in the art such as administration by oral and parenteral methods, including intravenous, intraarterial, intrathecal, intradermal and intracavitary administrations, and enteral methods.

The beads comprising fucoidan and at least one imaging agent according to the methods of the invention are highly suitable for diagnosing a pathological condition associated with selectins. The diagnosis can be achieved by examining and imaging parts of or the whole body of the patient or by examining and imaging a biological system (such as one or more samples of biological fluid or biological tissue) obtained from the patient. One or the other method, or a combination of both, will be selected depending of the clinical condition suspected to affect the patient. Comparison of the results obtained from the patient with data from studies of clinically healthy individuals will allow determination and confirmation of the diagnosis.

The beads of the invention, used in medical imaging are also valuable for following the progression of a pathological condition associated with selectins. For example, this can be achieved

by repeating the method over a period of time in order to establish a time course for the presence, localization, distribution, and quantification of “abnormal” selectins in a patient.

They can also be used to monitor the response of a patient to a treatment for a pathological condition associated with selectins. For example, an image of part of the patient’s body that contains “abnormal” selectins (or an image of part of a biological system originating from the patient and containing “abnormal” selectins) is generated before and after submitting the patient to a treatment. Comparison of the “before” and “after” images allows the response of the patient to that particular treatment to be monitored.

Pathological conditions that may be diagnosed, or whose progression can be followed using the beads herein may be any disease and disorder known to be associated with selectins, i.e. any condition that is characterized by undesirable or abnormal interactions mediated by selectins. Examples of such conditions that may advantageously be diagnosed using methods provided herein include, but are not limited, thrombosis, myocardial ischemia/reperfusion injury, stroke and ischemic brain trauma, neurodegenerative disorders, tumor metastasis and tumor growth, and rheumatoid arthritis. In a specific embodiment, the beads of the invention may be detected within an organ or a tissue, preferably within a muscle. In this embodiment, the beads of the invention comprise a drug to be delivered in a said target organ or tissue. The presence of the beads is then determined by imaging techniques because of the presence of the imaging agent within the beads.

Therefore, the beads of the invention are suitable for delivering a drug while determining whether the beads have reached the targeted organ or tissue. The person skilled in the art would thus adapt the size of the beads suitable for this purpose, i.e. for targeting organs or tissues.

FIGURES LEGEND

Figure 1: Fluorescence confocal microscopy of large beads comprising FITC labeled fucoidan.

Figure 2: Presentation of the composition of the large beads in percentage of signal detected by Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis for each element C, O, Na, Cl, Fe, F.

Figure 3: Distribution of the size of the large beads according to the invention.

Figure 4: Mean fluorescence intensity of small MP and MP fucoidan on platelet rich plasma (PRP) not activated, activated and activated then incubated 20 minutes with anti P-Selectin in order to block P-Selectin expression.

The interaction of FITC fluorescent small MP and MP fucoidan are tested on unactivated platelets rich plasma (PRP), platelets rich plasma activated with TRAP (20 μ M) and platelets rich plasma activated then P-Selectin blocked with CD62P (100 μ M). The mean fluorescence intensity was measured in the area of double positivity.

Figure 5: Quantification of the number of large beads comprising a fluorescent imaging agent in mice as a function of time after injection; large beads with and without fucoidan associated with the activated endothelium, control group (large beads with fucoidan associated with the non activated endothelium).

Figure 6: Quantification of the number of large beads with fucoidan comprising an imaging agent (fluorescent FITC and/or echogenic PFOB and/or MPIO) versus control beads without fucoidan, associated with the activated endothelium (expressed per 100 leukocytes in the region of interest).

Figure 7: MRI transversal T_2^* -weighted images of the aneurysm of an AAA rat before injection and after injection into the carotid artery of large MPIO comprising fucoidan (200 μ L of 150 mg/mL in 0.9% NaCl) at 65 minutes, 81 minutes and 115 minutes after injection.

Figure 8: Ultrasound in two-dimensional mode of large beads of the invention (250 mg / mL in 0.9% NaCl) without PFOB (a) and with PFOB (b). Mean contrast (in dB) of large beads with and without PFOB (c)

Figure 9: Ultrasound in two-dimensional mode of the aneurysm of an AAA rat before injection (a) and after injection into carotid artery of large microparticles comprising PFOB and fucoidan (200 μ L of 150 mg/mL in 0.9% NaCl) at 5 seconds (b) and 5 minutes (c) after injection.

Figure 10: Frontal section of scan images and superimposed (NanoSPECT / CTPLUS) after injection into the penis vein of small ^{99m}Tc -MP-fucoidan (200 μ L of a 50 mg/mL suspension in NaCl 0.9%) in a healthy rat (a) and in a rat suffering from an AAA (c). Control after injection of non functionalized small ^{99m}Tc -MP in a rat suffering from an AAA (b).

Figure 11: Average activity measured by autoradiography on sections of healthy rat abdominal aorta (n = 17 slices) and rat suffering from AAA (n = 35 slices). n = 1 rat.

Figure 12: Masson trichrome staining of an AAA cryosection from an AAA rat sacrificed 30 minutes after injection of small microparticles comprising fucoidan and FITC dextran (200 μ L of a 50 mg/mL suspension in NaCl 0.9%). 3a. P-Selectin immunostaining (left) and control (right). 3b. Fluorescence microscopy. 3c. Alcian blue staining.

Figure 13: Development and characterization of beads larger than 10 microns, observed by fluorescence microscopy

- (a) The addition of PFOB in the preparation leads to the presence of non-fluorescent droplets, which correspond to the PFOB, observed within the MP
- (b) Representative size distribution of the beads, prepared with or without PFOB, with an average size of 49 microns.
- (c) The beads were observed by electron microscopy environmental
- (d) Cavities were also observed in the MP prepared in the presence of PFOB
- (e) The Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis confirmed the presence of fluorine in the beads MP-PFOB, whereas MP alone do not contain
- (f). Ultrasound in two-dimensional mode of beads (250 mg/mL in 0.9% NaCl) without PFOB.
- (g) Ultrasound in two-dimensional mode of beads (250 mg/mL in 0.9% NaCl) with PFOB

EXAMPLES

I - Development of beads

Reagents

- Pullulan: 9 g (Hayashibara, M = 200 000 g / mol);
- Dextran: 3 g (Sigma, M = 500 000 g / mol);
- Dextran-FITC: 100 mg (Sigma, M = 500 000 g / mol);
- Fucoidan: 1.2 g (Sigma, M = 57 000 g / mol);
- Trisodium trimetaphosphate, STMP: 150mg (Sigma, M = 305.89 g / mol);
- Rapeseed oil: 30 ml (Commercial, HLB = 7);
- Span 80: 7.5 g (Sigma, M = 428.62 g / mol);
- Tween 80: 3 g (Fluka Chemika, M = 1310 g / mol); and
- SnCl₂: 1 mg (Sigma, M = 84 g / mol)

Detectable compounds

- USPIO: 40 mL (Sinerem, Guerbet, 20mg Fe / mL);
- Perfluorooctyl Bromide, PFOB: 240 microL (Sigma, M = 498.962 g / mol);
- ^{99m}Tc: 500 microL (corresponding to an activity of about 10 mCi; and Xavier Bichat Hospital, Department of Nuclear Medicine).

1. Preparation of aqueous phase

This aqueous phase is formed by pullulan and dextran, supplemented with one or more detectable compound (FITC fluorophore, USPIO, PFOB). This aqueous phase may be in the form of a solution, suspension or emulsion oil-in-water (O/W).

Preparation of the solution of pullulan / dextran

9 g of pullulan (Hayashibara, M = 200,000 g / mol) and 3 g of dextran (Sigma, M = 500,000 g / mol) are solubilised in 40 mL of purified water in a 100 mL beaker. The solution is stirred with a magnetic stirrer until obtaining a homogeneous solution.

Preparation of the solution pullulan / FITC Dextran

9 g of pullulan (Hayashibara, 200,000 g/mol), 3 g of dextran (Sigma, 500,000 g/mol) and 100 mg of FITC-dextran (Sigma, 500,000 g/mol) are solubilised in 40 mL of purified water in a 100 mL beaker and the solution is stirred with a magnetic stirrer until obtaining an homogeneous solution.

Preparation of the solution pullulan / Dextran / fucoïdan

9 g of pullulan (Hayashibara, M = 200,000 g / mol), 3 g of dextran (Sigma, M = 500,000 g / mol) and 1.2 g of fucoïdan (Sigma, M = 57,000 g / mol) are solubilised in 40 mL of purified water in a 100 mL beaker and the solution is stirred with a magnetic stirrer until obtaining an homogeneous solution.

Preparation of the suspension of pullulan / dextran-USPIO

9 g of pullulan (Hayashibara, M = 200,000 g / mol) and 3 g of dextran (Sigma, M = 500,000 g / mol) are solubilised in 40 mL of a suspension of USPIO (Sinerem, Guerbet, 20 mg Fe / mL) in a 100 mL beaker and we stir with a magnetic stirrer until a homogeneous suspension.

Preparation of the solution pullulan / Dextran / fucoïdan USPIO

9 g of pullulan (Hayashibara, M = 200,000 g / mol), 3 g of dextran (Sigma, M = 500,000 g / mol) and 1.2 g of fucoïdan (Sigma, M = 57,000 g / mol) are solubilised in 40 mL of a suspension of USPIO (Sinerem, Guerbet, 20mg Fe / mL) in a 100 mL beaker and the solution is stirred with a magnetic stirrer until obtaining an homogeneous suspension.

Preparation of emulsion pullulan / PFOB-dextran

240 microL of PFOB (perfluorooctylbromide, Sigma, M = 498.962 g / mol), 30 mg of Tween 80 (Sigma, M = 428.62 g / mol) and 30 microL of NaOH (10M) were added to 300mg of pullulan / dextran in a sample tube and we create an emulsion of PFOB in the pullulan/dextran by mixing with a dispenser (Polytron PT 3100, Kinematica) with a rod (5/7, 5 mm - REF: PT- 07/2EC-B101 DA) for 20 seconds at 28 000 rev / min.

Preparation of emulsion pullulan / Dextran / fucoidan-PFOB

240 microL of PFOB (perfluorooctylbromide, Sigma, M = 498.962 g / mol), 30 mg of Tween 80 (Sigma, M = 428.62 g / mol) and 30 microL of NaOH (10M) were added to 300mg of pullulan / Dextran-fucoidan in a sample tube and we create an emulsion of PFOB in the pullulan / Dextran-fucoidan by mixing with a dispenser (Polytron PT 3100, Kinematica) with a rod (5/7, 5 mm - REF 07/2EC-B101 PT-DA) for 20 seconds at 28 000 rev / min.

2. Preparation of micro-emulsification and cross-linking process

Preparation of the oil phase (surfactant HLB 7)

7.5 g of Span 80 and 2.7 g of Tween 80 were mixed in a 10 mL beaker and the mixture was homogenised under magnetic stirring. 460mg of this surfactant was then added to 30 mL of rapeseed oil in a bottle (bottle 30x70 PS, VWR Ref 216-2686), for a concentration of 1.5% (by volume) of surfactant. The solution is then put in a bottle bottle at -20°C for 20 min in order to have a final oil phase at -5 °C.

From this step, two experiments were performed. The first experiment resulted in suspensions of beads with diameters varying from 1 µm from 10 µm and a mean diameter from 1 to 2 µm. For sake of clarity, in the followings, the first experiment is referred to as the "large beads experiment", whereas the second experiment is referred to as "the small beads experiment" The second experiment indeed resulted in suspensions of smaller beads, with diameters varying from 50 nm to 4 µm and a mean diameter from 300 nm to 600 nm.

Emulsification of the aqueous phase of polysaccharides in the oily phase

30 microL of NaOH (10M) was added to 300 mg of the aqueous phase for the large beads experiment, or to 100 mg of the aqueous phase for the small beads experiment. The resulting solution is mixed then incubated for 10 minutes at room temperature.

In order to prepare beads comprising PFOB or beads comprising fucoidan and PFOB, there is no need to add NaOH. Indeed, the emulsions pullulan/dextran-PFOB or pullulan/dextran/fucoidan-PFOB already contain NaOH.

The rod in the bottle of oily phase is placed just above the level of the oil. 30 µl of a solution of the crosslinking agent STMP (Trisodium trimetaphosphate, Sigma, 305.89 g/mol) prepared in 30% (w/v) in water was added to the aqueous phase.

The resulting solution is stirred with the cone of the pipette. The aqueous phase was then collected with a pipette P5000. The aqueous phase is slowly injected to the oil phase under agitation provided with a disperser running at 28 000 rotations/min. The dispersion is performed until homogenisation.

The emulsion is then transferred in an oven, at a temperature of 50 C wherein the crosslinking step takes place for 20 minutes.

Said step results in crosslinked beads. Said beads are placed in PBS and are agitated for 40 minutes at room temperature. The oil phase is eliminated, and the beads are isolated.

In the large beads experiment, after centrifugation at 4100 rpm for 10 minutes, a pellet of beads is obtained. In the small beads experiment, after a first centrifugation at 4100 rpm for 10 minutes, the supernatant is taken carefully (avoiding that any bead from the pellet is taking with) and after a second centrifugation at 8000 rpm for 10 minutes, a pellet of beads is obtained. In both experiments, the supernatant is removed and PBS is added before mixing by vortexing the beads.

Rinsing beads

Centrifugation is performed again, at 4100 rpm for the large beads experiment or at 8000 rpm for the small beads experiment for 10 minutes, and the pellet of beads is resuspended in 0.04% SDS. This step is repeated two times.

After centrifugation at 4100 rpm / 8000 rpm for 10 minutes, the pellet of beads is resuspended in 0.9% NaCl. This step is repeated six times.

Filtration of beads

In the large beads experiment , beads are sorted in solution in 0.9% NaCl through a sieve (AS 200, Retsch) combined with a filter paper nylon mesh opening 5µm (SEFAR NITEX, 03-5/1 115cm).

Storage of beads

After filtration, the suspension of beads in 0.9% NaCl was stored at 4°C.

3. Radiolabelling beads with Technetium (^{99m}Tc)

In order to obtain beads comprising ^{99m}Tc , the addition of ^{99m}Tc on beads is made in an extemporaneous manner.

For this purpose, 30 µl of a solution of SnCl_2 (1 mg/mL, Sigma, M = 84 g / mol), were added to 500 µL of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and 500 µL of 0.9% NaCl to a pellet of 120 mg of beads in a 1,5 mL eppendorf.

Homogenisation is briefly performed with a vortex and the suspension is incubated 1h at room temperature. The particles were then centrifuged and the supernatant was removed.

The labelling yield was calculated after measuring the radioactivity associated with particles and that found in the supernatant.

4. Grafting of fucoidan on polysaccharide beads

The large beads of the invention (100 mg) were incubated with a solution of fucoidan (10mg) in water (1mL) followed by the addition of 10µL NaOH 10M under magnetic stirring for 10min. Grafting of fucoidan was performed by adding 3 mg of sodium trimetaphosphate (STMP) and by incubating the suspension for 20min at 50°C. Beads were then washed by centrifugation 3 times with PBS and 3 times with purified water to remove any free reagents. When fluorescein-labeled fucoidan was grafted on rhodamine-labeled pullulan, fluorescence observations confirmed the presence of green fucoidan on red beads.

II - Physicochemical characterization of beads

1. Form and composition of beads

Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis on small and large beads suspension confirmed the presence of sulphur at the surface of the beads comprising fucoidan and the absence of sulphur at the surface of the beads not comprising fucoidan. This demonstrates the presence of fucoidan at the surface of beads comprising fucoidan.

Additionally, the inventors performed confocal imaging on beads prepared with fluorescent fucoidan. FITC-labeled fucoidan was observed on the surface of beads and also inside the bead structure (Figure 1)

Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis on sections of large beads of different formulations has allowed us to characterize their composition. The beads were included in blocks (50 μ L of solutions at 250 mg/mL in 0.9% NaCl included in Cryomatrix™) frozen in contact with liquid nitrogen, then sectioned (8 microns) using a microtome and finally analyzed.

In each sample, the elements carbon and oxygen were found in large proportions (Figure 2), which is quite normal since they are the key elements present in the polysaccharides used in the beads.

Significant amounts of sodium and chlorine were also found, the beads being suspended in 0.9% NaCl when analyzed. This basic analysis shows the presence of iron in the large beads comprising USPIO, and no iron in suspensions containing other types of large beads.

The presence of fluoride in suspensions of large beads comprising PFOB, while not in suspensions containing other types of large beads, demonstrates the presence of PFOB in the large beads comprising PFOB.

Atomic absorption spectroscopy measurement revealed that a suspension of large beads comprising USPIO (150 mg/mL in NaCl 0,9%) has an iron concentration of 11 mmol/L.

Gas chromatography – mass spectrometry analyses on a suspension of large beads comprising PFOB (150 mg/mL in NaCl 0,9%) indicated a concentration in PFOB of 8,47 mg/mL.

2. Diameter size distribution of beads

Large beads were prepared with dextran-FITC and were observed with optical fluorescence microscope. From digital photos, with the help of an image processing software, the size of the beads was measured. The distribution of particle size (in percentage) is shown in Figure 3.

Small beads suspension was analyzed by dynamic light scattering method (Nano-ZS). A mean hydrodynamic diameter of 360 nm for beads not comprising fucoidan and 500 nm for small beads comprising fucoidan were found. Zeta potential were also measured and the beads comprising fucoidan had a higher electronegativity than the beads not comprising fucoidan (-16.2mV vs -9.1mV).

III - Affinity of beads functionalized with fucoidan

1. Affinity for activated platelets

In a first step, the inventors studied the *in vitro* interaction of small beads with activated platelets. Using flow cytometry, they showed the affinity of small beads functionalized with fucoidan for P-selectin expressed on the surface of activated platelets.

The beads are detected by green fluorescence (FITC) and platelets in red fluorescence (marking CD41-PE-Cy5). A double fluorescent element corresponds to the pair beads/platelets and the area of double positivity thus reflects the affinity between platelets and beads. The highest affinity ("Mean Fluorescence Intensity (MFI) of 67329") is obtained with beads functionalized with fucoidan which were incubated with platelets activated with TRAP (20 μ M) (Figure 4).

The inventors noticed a weak affinity for these same beads when incubated with unactivated platelets (MFI of 7982) or with activated platelets incubated 20 minutes with anti P-Selectin in order to block P-Selectin expression (MFI of 10691). Finally, the inventors showed also a weak affinity for non-functionalized beads, whether they were incubated with activated, unactivated, or activated then blocked platelets (MFI of 8537, 8206 and 8833 respectively).

2. Affinity for activated endothelium

The inventors then assessed the affinity of the large beads for an activated endothelium. They used a model of inflammation of the calcium ionophore in the mouse mesentery. For this purpose, leukocytes were successfully labelled in red fluorescence by retro-orbital injection of rhodamine B (30 µl of a 0.3% solution).

The inventors have then activated the endothelial wall by direct application of calcium ionophore (10 µl to 18 mM). Suspensions of beads or beads comprising fucoidan and FITC were then injected.

The inventors observed interactions at the activated site by intra-vital microscopy fluorescence.

An accumulation of leukocytes was observed at the area of interest, confirming the activation of the endothelium. A significant accumulation of large beads was also observed when they are functionalized with fucoidan. On the contrary, during an injection of non-functionalized beads, very few of them were found at the activated endothelial wall.

To characterize this high affinity, change in the number of beads found in the area of interest was measured. The inventors have thus shown that in the case of large beads prepared without fucoidan, the number of beads found in the activated endothelium is low and does not increase. On the contrary, in the case of injected large beads prepared with fucoidan, the number of beads comprising fucoidan found is higher and increases with time (Figure 5).

The inventors further observed the lack of affinity for large beads comprising fucoidan for unactivated endothelium, since these particles are circulating and are not found at the area of interest. They also quantified the total number of beads accumulated at the activated endothelium at the end of the experiment, this number being expressed over the number of leukocytes found in the area of interest (Figure 6).

The functionalized large beads have an affinity for an activated endothelium over 18 times greater than non-functionalized large beads (187 beads comprising fucoidan on average per 100 leukocytes versus 10 beads per 100 leukocytes). They further demonstrated that functionalized beads prepared in the presence of an imaging compound have a high affinity for activated endothelium, whatever

the imaging agent encapsulated (206 beads with fucoïdan and USPIO and 176 beads with fucoïdan and PFOB, with results expressed per 100 leukocytes in the area of interest).

It is therefore possible to incorporate an imaging compound in the large beads without affecting their affinity for the activated endothelium. The inventors therefore have shown that the large beads of the invention prepared in the presence of fucoïdan, with imaging agent or not, have a strong affinity for an activated endothelium.

IV - Detection of beads by MRI imaging, ultrasound and scintigraphy

1.MRI

Ex vivo, the inventors tested the large MPIO by injecting them into an aneurysm of the abdominal aorta, which is a rat model developed in the laboratory.

After injection of the suspension of large MPIO, the inventors observed interactions by MRI. The beads comprising fucoïdan and USPIO show a strong MRI contrast and a high affinity for the inner wall of an aneurysm.

The inventors then performed histological sections of the aneurysm in which functionalized MPIO were injected. For this purpose, the inventors performed an immunolabeling of P-selectin. They observed that the beads are preferentially localized at the wall of the aneurysm and the fragments of thrombus. In addition, areas where the beads are adsorbed on the wall correspond to areas where P-selectin is expressed and we find much iron in the same places that our beads.

In vivo, the inventors injected the large MPIO comprising fucoïdan, prepared with first example protocol, into the carotid artery of a rat suffering from an abdominal aortic aneurysm (AAA) and a strong MRI contrast were observed at the inner wall, 80 minutes after the injection (Figure 7).

2. Ultrasound

In vitro, using a device for assessing the echogenic particle flow, the inventors demonstrated the echogenicity of the large beads PFOB of the invention (Figure 8). They also showed the echogenicity of beads of average size 49 microns (Figure 13).

Therefore, the inventors have demonstrated the echogenic characteristic of the PFOB large beads of the invention. Those results therefore corroborate that said beads are highly adapted for use as contrasting agents *in vivo*.

In vivo, the inventors tested the large beads comprising PFOB and fucoidan by injecting them (200 microL of 150 mg/mL beads in 0.9% NaCl) into the carotid artery of a rat AAA. Ultrasound imaging showed circulating echogenic beads in the abdominal aorta and accumulation of an echogenic signal in the aneurysmal area, 5 seconds after the injection (Figure 9). As a control, the inventors tested the large beads comprising PFOB but not fucoidan and they showed that these circulating echogenic beads in the abdominal aorta did not accumulate in the aneurysmal area for up to 5 minutes after the injection.

3. Scintigraphy

To detect small and large beads by scintigraphy, the inventors have coupled them to ^{99m}technétium. The stability of this coupling *in vitro* in 0.9% NaCl was tested.

In plasma, the grafting of the technetium is considered stable for 1 hour. The inventors therefore studied the distribution of organic beads 30 minutes after the injection into the penis vein. The manipulation was performed after injection of small beads comprising or not fucoidan and radiolabeled with ^{99m}Tc in a healthy rat and in a rat AAA. Results are presented as percentage of radioactivity in each organ, compared to the total radioactivity injected. At the rat aorta suffering from abdominal aortic aneurysm, radioactivity was found 4 times greater than that found in the rat aorta of healthy rat (8.2% vs. 1.9%). The results indicate that the small beads of the invention are accumulated at the aneurysm.

The inventors further injected small beads comprising fucoidan and ^{99m}Tc (200 microL of 50 mg/mL beads in 0.9% NaCl) into the penis vein in order to image by *in vivo* scintigraphy the presence of these beads in the rat AAA (Figure 10).

On the frontal section of a rat AAA, there is an obvious contrast enhancement in the aneurysm, compared with the abdominal aorta of a healthy rat and with a rat AAA injected with small beads comprising ^{99m}Tc but not fucoidan. These results indisputably show that small ^{99m}Tc -MP-fucoidan can be used to detect *in vivo* by scintigraphy, the presence of AAA in a rat. To quantify this signal, the inventors measured by autoradiography, the radioactivity found on activated cross-sections of 20 microns, produced by a microtome from abdominal aorta of healthy rats and rats bearing AAA (Figure 11). The inventors find an average activity by cutting more than four times the level of the abdominal aorta of rat AAA compared with healthy cell of the rat (3575 counts versus 752 counts, respectively).

The inventors then performed histological sections of the aneurysm of the rat that was injected with functionalized radiolabeled small beads. For this purpose, the inventors performed an immunolabeling of P-selectin and a polysaccharide staining with alcian blue (Figure 12). They observed that the beads are preferentially localized inside the wall of the aneurysm and the fragments of thrombus. In addition, areas where the beads are adsorbed inside the wall correspond to areas where P-selectin is expressed.

CLAIMS

1. Method for preparing beads comprising an imaging agent comprising the following steps :

i) preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of at least one polysaccharide, an amount of an imaging agent and an amount of a cross linking agent ;

ii) dispersing said alkaline aqueous solution into an hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ; and

iii) transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide:

wherein,

said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof; and

wherein said at least one detectable compound is chosen among:

- A) MRI imaging compounds selected in the group consisting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}), and mixtures thereof;
- B) radioactive imaging compounds selected in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), technetium-99m (^{99m}Tc), indium-111 (^{111}In), iodine-131 (^{131}I), rhenium-186 (^{186}Re), and thallium-201 (^{201}Tl), terbium and mixtures thereof;
- C) contrast-enhanced ultrasonography imaging compounds, preferably perfluorooctyl bromide (PFOB), acoustically active microbubbles and acoustically active liposomes;
- D) fluorescence imaging compounds selected in the group consisting of quantum dots, fluorescent dyes such as Texas red, fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), rhodamine, fluorescein, carbocyanine, Cy-3, Cy-5, Cy5.5, Cy7, DY-630, DY-635, DY-680, and Atto 565 dyes, merocyanine, styryl dye, oxonol dye, BODIPY dye;
- E) X-ray contrast compounds such as iodine; and
- F) mixtures thereof.

2. The method according to claim 1, wherein said method further comprises a step iv) of incubating the beads obtained in step iii) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads.

3. The method according to any claim 1 or 2, wherein said at least one detectable compound is an MRI imaging compound selected in the group consisting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs), gadolinium III (Gd^{3+}), chromium III (Cr^{3+}), dysprosium III (Dy^{3+}), iron III (Fe^{3+}), manganese II (Mn^{2+}), and ytterbium III (Yb^{3+}), and mixtures thereof.

4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein said at least one detectable compound is a contrast-enhanced ultrasonography imaging compound, preferably such as perfluorooctyl bromide (PFOB).

5. Method for preparing beads comprising radioactive imaging compounds comprising the following steps :

a) preparing an alkaline aqueous solution comprising an amount of fucoidan, an amount of at least one polysaccharide and an amount of a cross linking agent ;

b) dispersing said alkaline aqueous solution into a hydrophobic phase comprising a surfactant in order to obtain w/o emulsion ;

c) transforming the w/o emulsion into beads by placing said w/o emulsion at a temperature from about 4°C to about 80°C for a sufficient time to allow the cross-linking of said amount of polysaccharide; and

d) putting the obtained beads in contact with radioactive imaging compounds chosen in the group consisting of carbon-11 (^{11}C), nitrogen-13 (^{13}N), oxygen-15 (^{15}O) and fluorine-18 (^{18}F), , gallium-68 (^{68}Ga), yttrium-91 (^{91}Y), indium-111 (^{111}In), rhenium-186 (^{186}Re), thallium-201 (^{201}Tl), terbium, and mixtures thereof;

wherein said polysaccharide is selected from the group consisting of dextran, pullulan, fucoidan, agar, alginic acid, hyaluronic acid, inulin, heparin, chitosan and mixtures thereof.

6. The method according to claim 5, wherein said method further comprises a step c') after step c) and before step d) of incubating the beads obtained in step c) with a solution of fucoidan to graft fucoidan on the surface of the beads.

7. The method according to any one of claims 1 to 6, wherein said method further comprises the following steps:

-v) or e) submerging said beads into an aqueous solution ; and

-vi) or f) washing said beads.

8. The method according to any one of claims 1 to 7, wherein said cross-linking agent is selected from the group consisting of trisodium trimetaphosphate (STMP), phosphorus oxychloride (POCl_3), epichlorohydrin, formaldehydes, hydrosoluble carbodiimides, and glutaraldehydes.

9. The method according to any one of claims 1 to 8, wherein said hydrophobic phase is selected from the group vegetal oils, preferably from canola oil, corn oil, cottonseed oil, safflower oil, soybean oil, extra virgin olive oil, sunflower oil, palm oil, MCT oil, and trioleic oil.

10. The method according to any one of claims 1 to 4 , wherein said at least one imaging agent is detectable by planar scintigraphy (PS), Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), Positron Emission Tomography (PET), contrast-enhanced ultrasonography (CEUS), Magnetic Resonance Imaging (MRI), fluorescence spectroscopy, Computed Tomography, ultrasonography, X-ray radiography, or any combination thereof.

11. A bead obtainable by the method according to any one of claims 1 to 10.

12. The bead according to claim 11, wherein said bead has a size comprised from 5 nm to 10µm, preferably from 5 nm to 5 µm, more preferably from 1 µm to 5 µm.

13. Use of the bead according to claim 11 as a contrasting agent.

14. Microparticle obtainable by the method according to claim 3 for use in magnetic resonance imaging.

15. Microparticle obtainable by the method according to claim 4 for use in ultrasonography.

16. Microparticle obtainable by the method according to claim 5 or 6 for use in scintigraphy.

17. Microparticle obtainable by the method according to claim 1 for use in x-ray-based imaging methods.

ABSTRACT

The present invention relates to a method for preparing beads comprising imaging agent. The present invention further provides beads highly useful for medical imaging.

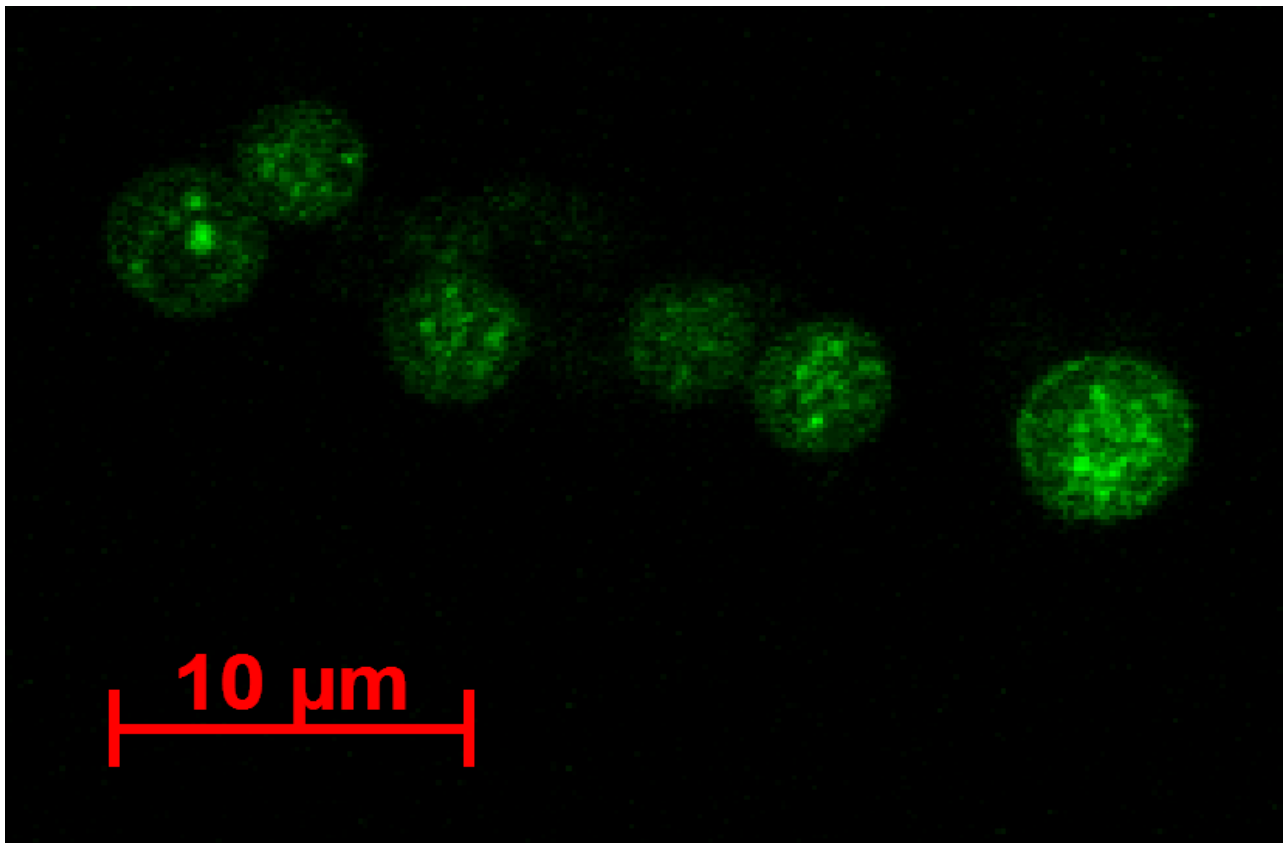


Figure 1/13

	C	O	Na	Cl	Fe	F
MP	56.8	8.1	9.5	13.5	0	0
MPIO	46.8	13.1	12.0	16.9	3.7	0
MP-PFOB	40.6	18.0	13.3	11.7	0	1.6

Figure 2/13

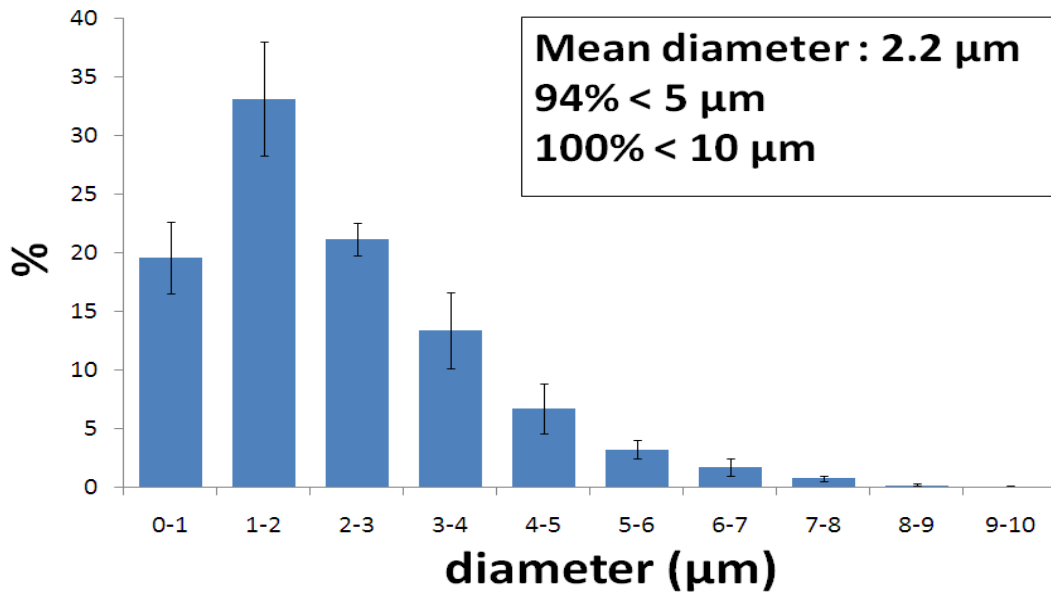


Figure 3/13

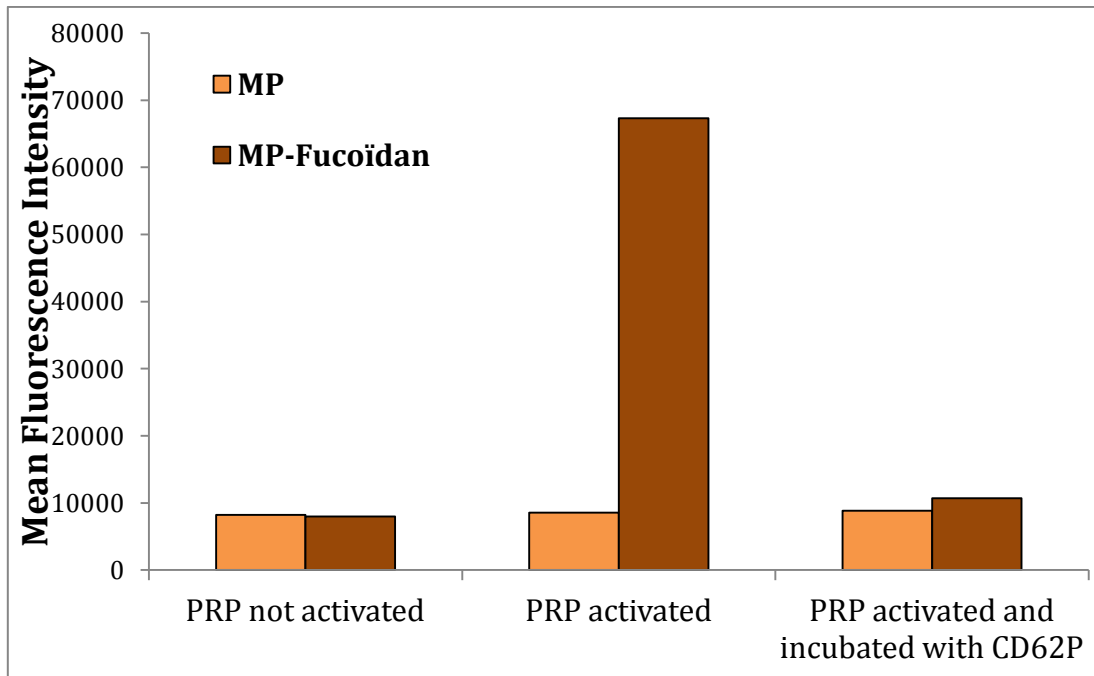


Figure 4/13

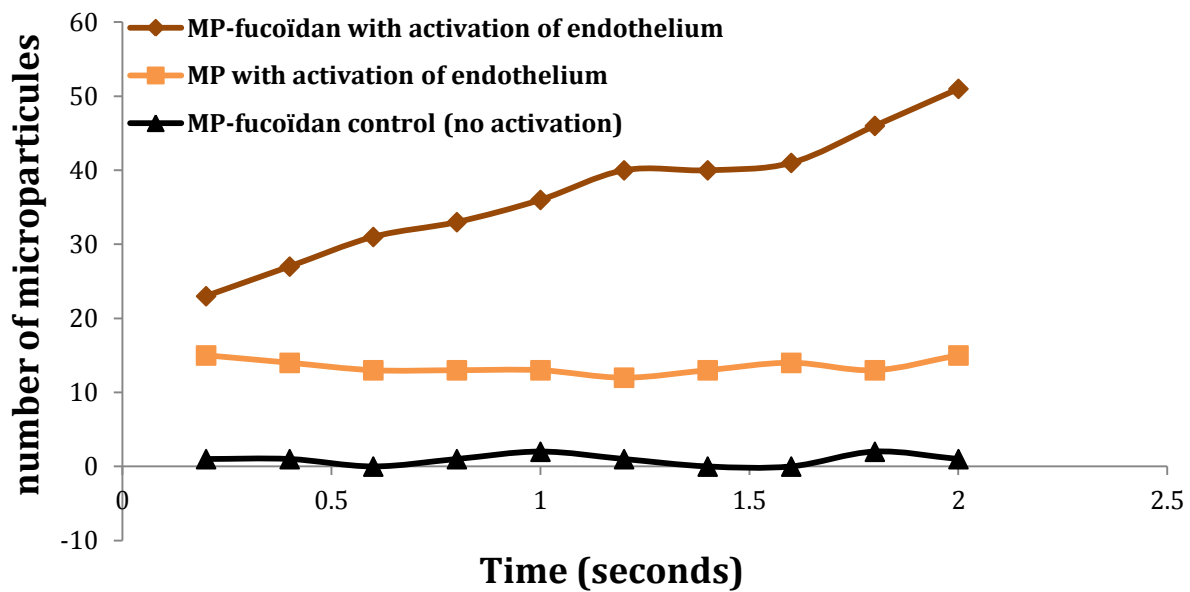


Figure 5/13

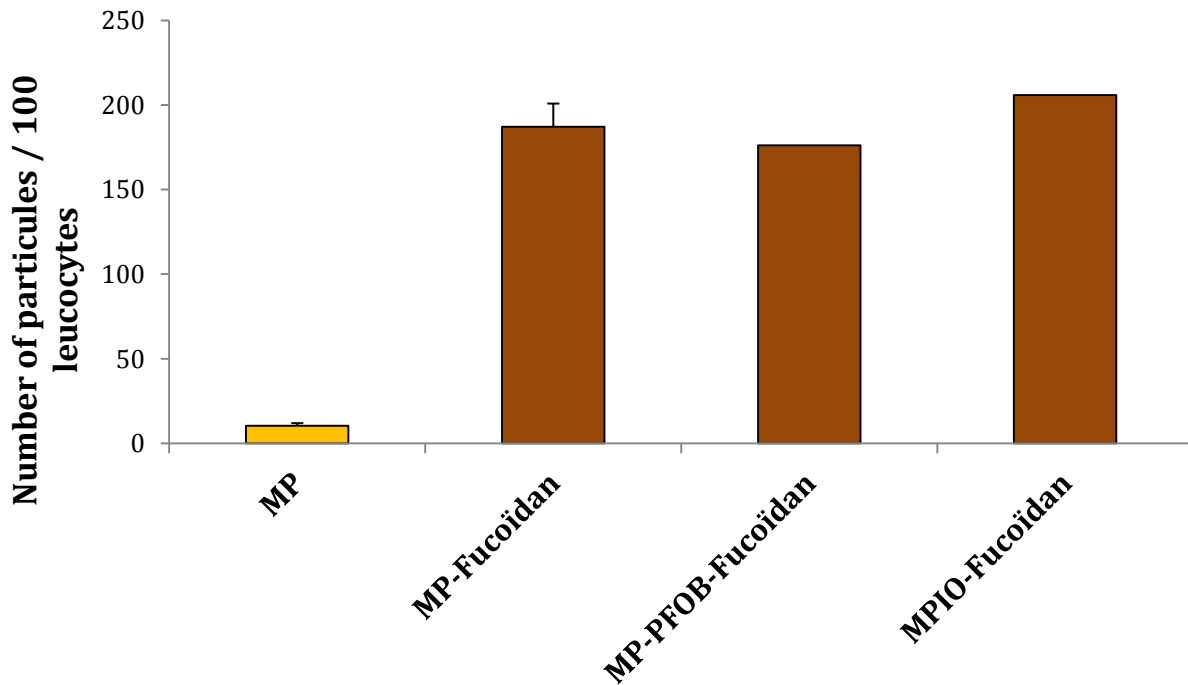


Figure 6/13

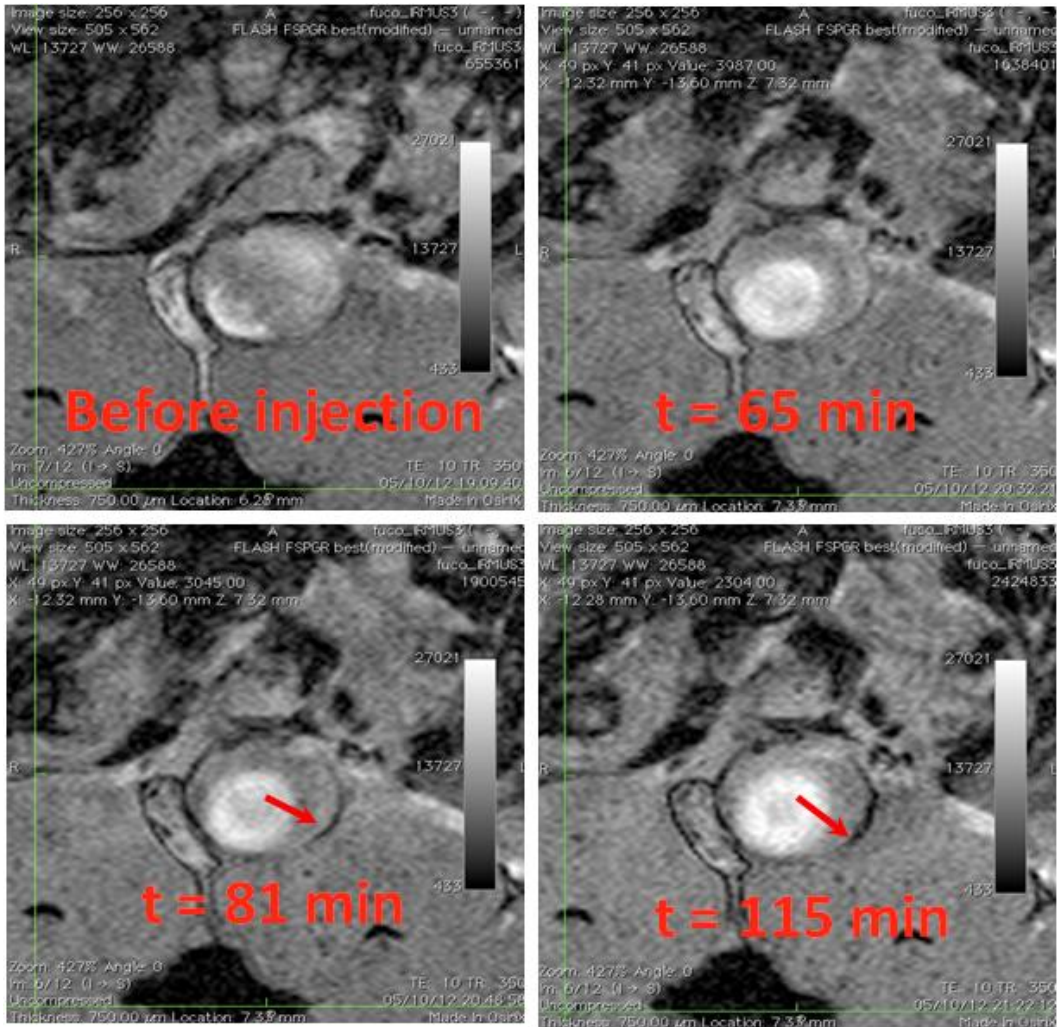


Figure 7/13

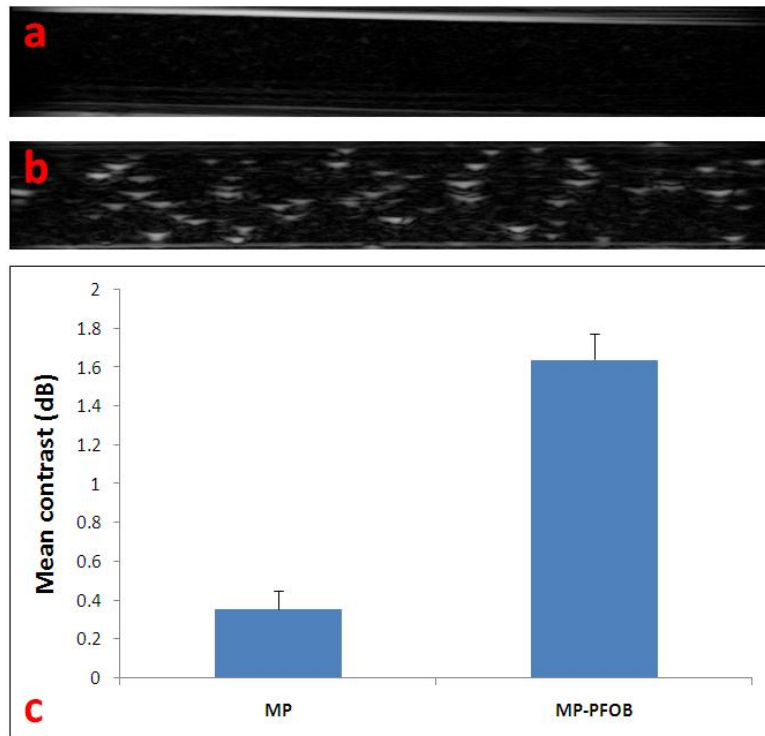


Figure 8/13

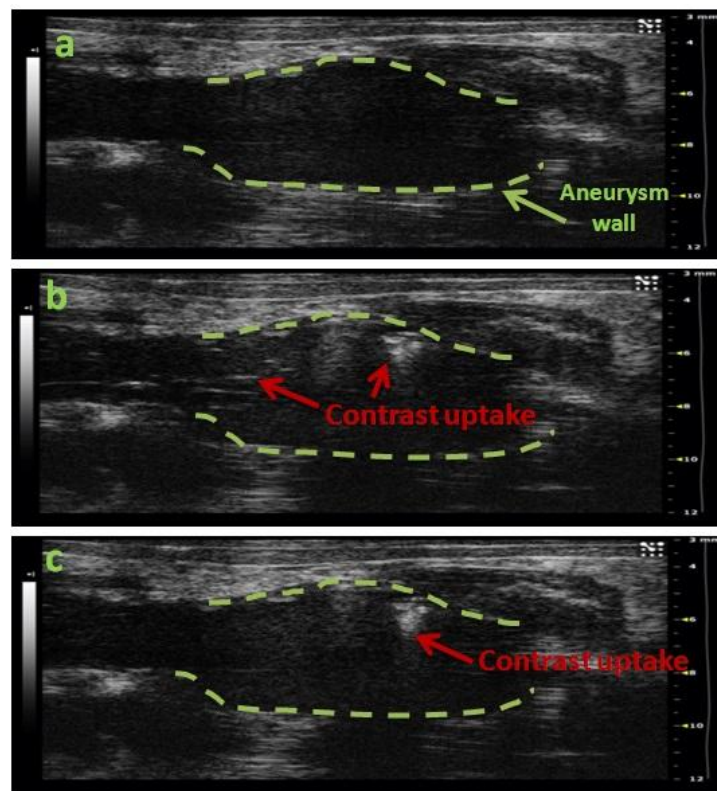


Figure 9/13

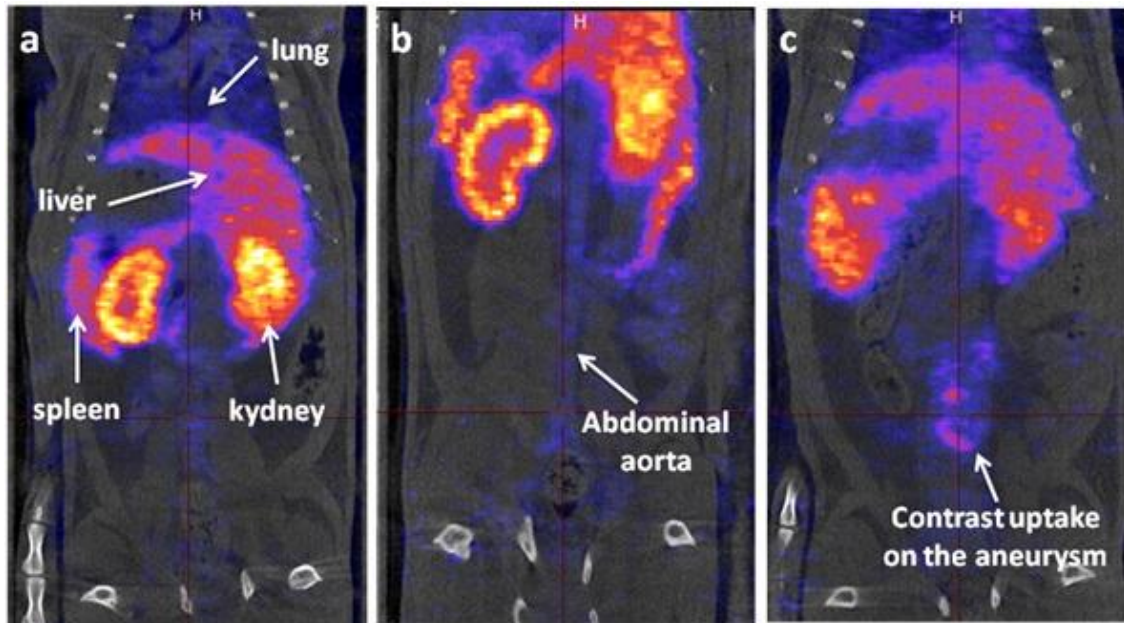


Figure 10/13

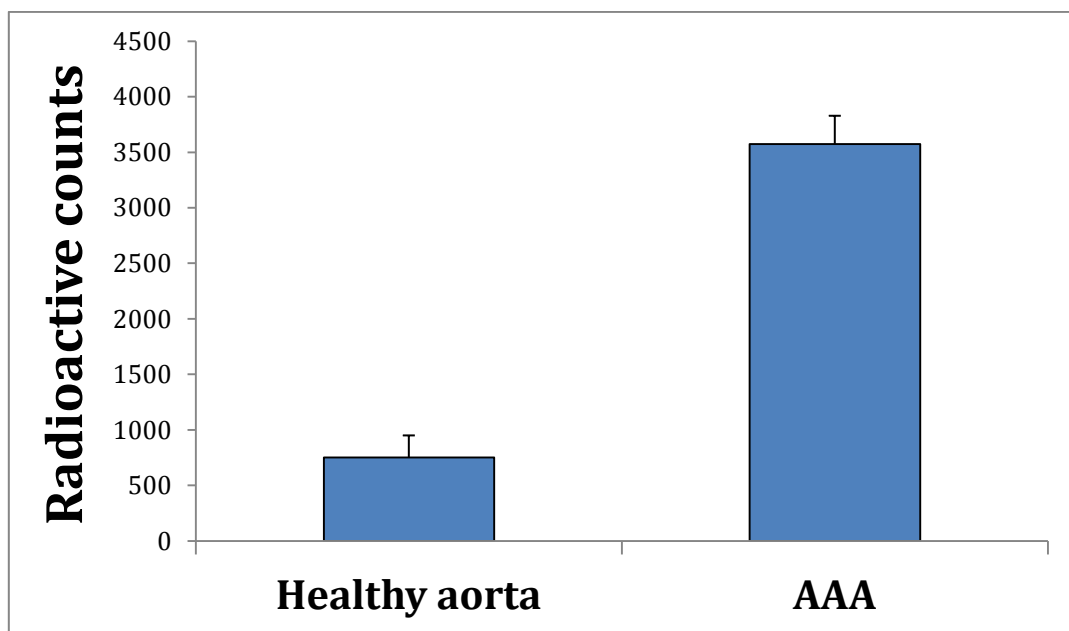


Figure 11/13

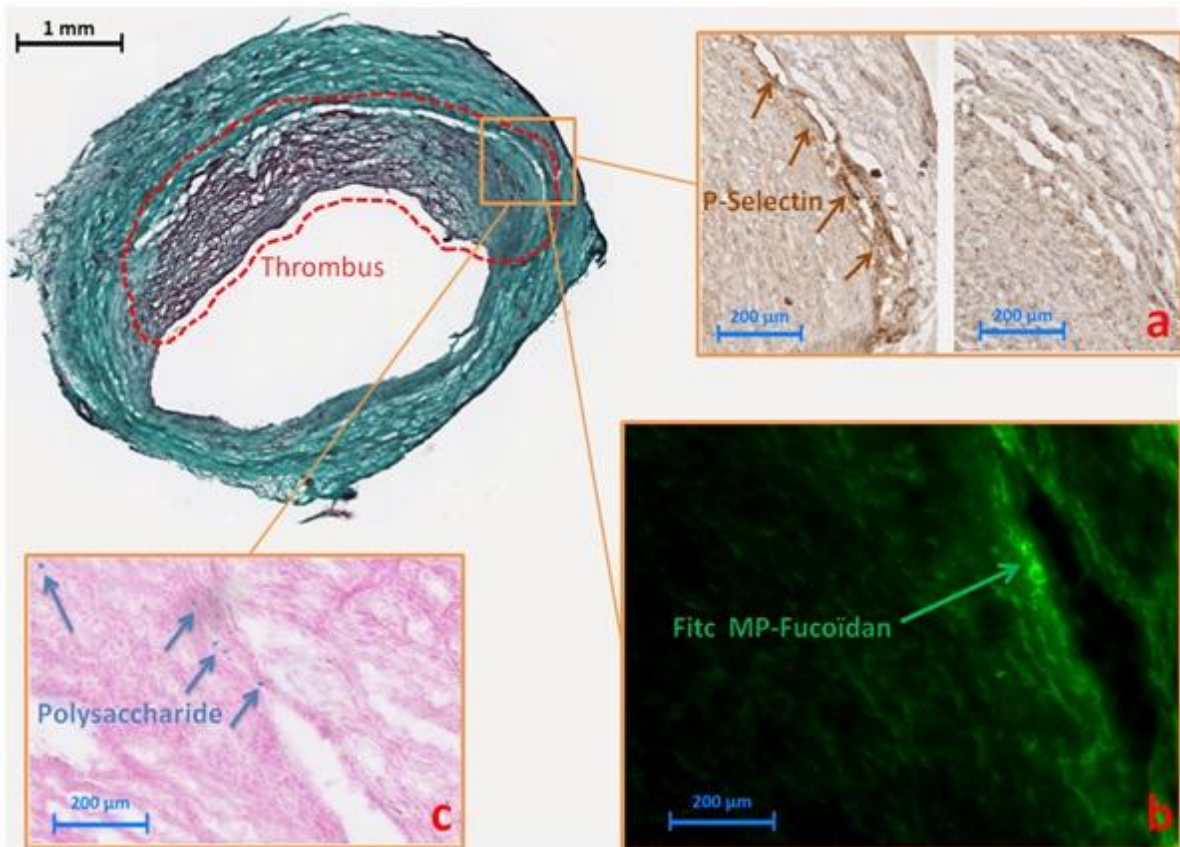


Figure 12/13

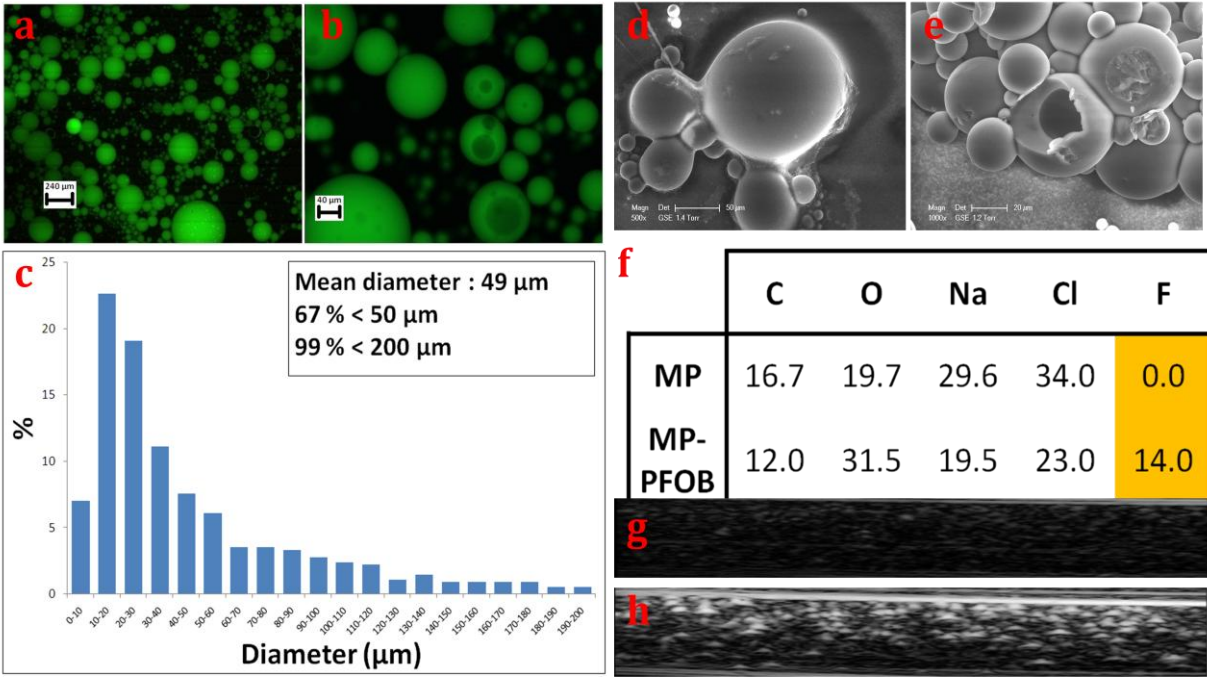


Figure 13/13

Résumé

Les pathologies cardiovasculaires et leurs conséquences représentent actuellement un problème de santé publique majeur dont la prise en charge pourrait être considérablement améliorée par le développement de nouvelles méthodes de diagnostic non invasives. Ce projet doctoral vise à développer des microparticules polysaccharides injectables dans la circulation sanguine permettant l'imagerie moléculaire des pathologies artérielles. Grâce à un procédé d'émulsion-réticulation, nous avons synthétisé ces microparticules qui sont d'une part fonctionnalisées avec du fucoïdane afin de pouvoir cibler la P-Sélectine qui est une molécule d'adhésion exprimée au niveau de la paroi artérielle lésée, et d'autre part, conjuguées à des agents de contraste afin d'apporter un signal en imagerie. Nous avons alors développé 2 outils d'imagerie moléculaire propres à 2 modalités classiques d'imagerie médicale. Afin de suivre les microparticules en tomographie par émission monophotonique de positons (TEMP), nous les avons radiomarquées avec du technétium 99m et pour les détecter en imagerie par résonance magnétique (IRM), nous les avons chargées avec des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques. Nous avons ensuite validé l'efficacité de ces 2 outils d'imagerie moléculaire avec des essais précliniques en imagerie *in vivo* chez le petit animal sur des modèles de pathologies artérielles. Les résultats obtenus sont très encourageants et ces 2 outils d'imagerie moléculaire ont un fort potentiel clinique pour le diagnostic des pathologies artérielles. Nous avons également observé que les microparticules migrent dans la paroi artérielle dégradée au niveau des pathologies étudiées. Cette propriété singulière pourrait s'avérer très intéressante pour les futurs travaux qui consisteront à utiliser ce support pour véhiculer des molécules thérapeutiques au cœur des différentes pathologies artérielles.

Mots clés : Fucoïdane, P-Sélectine, TEMP, IRM, Agents de contraste

Abstract

Cardiovascular diseases and their consequences constitute nowadays a major health issue. Their treatment could be substantially improved with the development of new non invasive diagnostic techniques. The aim of this doctoral project is to develop injectable into blood stream polysaccharide microparticles that would permit molecular imaging of arterial pathologies. From an emulsion-crosslinking process, we synthesized these microparticles which are on the one hand functionalized with fucoidan to target P-Selectin which is expressed at damaged arterial wall, and on the other hand combined with contrast agents to bring an imaging signal. We developed 2 molecular imaging tools dedicated to 2 classical medical imaging modalities. In order to track the microparticles by single photon emission computed tomography, we radiolabeled them with technetium 99m and to detect them by MRI, we loaded them with superparamagnetic nanoparticles of iron oxide. We then have validated the efficiency of these 2 molecular imaging tools with preclinical studies of *in vivo* small animal imaging of arterial disease models. The obtained results are very promising and these 2 molecular imaging tools have a strong clinical potential for the diagnosis of arterial pathologies. We also have observed that the microparticles tend to migrate through the damaged arterial wall. This specific property could turn out to be very interesting for future works which will consist in using this technology to convey therapeutic molecules directly into the core of the arterial pathologies.

Keywords: Fucoidan, P-Selectin, SPECT, MRI, Contrast agents