



HAL
open science

Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM / TEP

Farhan Bouraleh Hoch

► **To cite this version:**

Farhan Bouraleh Hoch. Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM / TEP. Imagerie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCD032 . tel-03141521

HAL Id: tel-03141521

<https://theses.hal.science/tel-03141521>

Submitted on 15 Feb 2021

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

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

Thèse

Pour Obtenir Le Grade De Docteur De l'Université Bourgogne-Franche-Comté

Ecole doctorale Carnot-Pasteur, Spécialité : Chimie

Institut UTINAM UMR 6213-CNRS

**NANOSONDES MULTIMODALES
POUR L'IMAGERIE SIMULTANEE
IRM/TEP**

Présentée et soutenue publiquement le 31 Janvier 2020

Par Monsieur FARHAN BOURALEH HOCH

Sous la direction du professeur Stéphane Roux

Devant le jury composé de :

Françoise CHUBURU

Professeur, Université de Champagne Ardenne

Rapporteur

Nicolas ANTON

Maitre de conférences, Université de Strasbourg

Rapporteur

Franck DENAT

Professeur, Université Bourgogne-Franche-Comté

Examineur

Jérôme DEVY

Maitre de conférences, Université de Champagne Ardenne

Examineur

Stéphane ROUX

Professeur, Université Bourgogne-Franche-Comté

Directeur de thèse

Rana BAZZI

Maitre de conférences, Université Bourgogne-Franche-Comté

Co-encadrante

« Le savoir est la connaissance acquise par l'étude et par l'expérience »

Abbé Roubaud

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Monsieur Stéphane ROUX, Professeur à l'Université de Bourgogne-Franche-Comté, pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager également son expérience et ses conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Je le remercie également pour sa disponibilité à répondre à mes questions, pour sa gentillesse permanente, pour ces nombreux encouragements et pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce travail. Qu'il soit aussi remercié pour son engagement lors des expériences d'imagerie et pour la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier également Docteur Rana BAZZI, Maître de conférences à l'Université de Bourgogne-Franche-Comté pour m'avoir co-encadré tout au long de cette thèse. Je la remercie également pour sa disponibilité au laboratoire, pour ses conseils pour la rédaction et pour sa gentillesse.

Je remercie Monsieur Patrick FIEVET, Directeur de l'équipe Nanoparticules-Contaminants-Membranes (NCM) pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Je le remercie aussi pour ses encouragements lors de la rédaction de ce manuscrit cette thèse.

Je souhaite remercier également Monsieur Sylvain PICAUD, Directeur de l'Institut UTINAM de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche au sein de son laboratoire.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Françoise CHUBURU, Professeur à l'Université de Reims Champagne Ardenne, ainsi qu'à Monsieur Nicolas ANTON, maître de conférences à l'Université de Strasbourg, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'adresse mes remerciements au Professeur Franck DENAT de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) ainsi qu'à Monsieur Jérôme DEVY maître de conférences à l'Université de Champagne Ardenne d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux durant ces trois années. Je remercie Dr Remi CHASSAGNON (Université de Dijon) pour les analyses des clichés MET. Je remercie aussi Dr Nadine MILLOT (Université de Dijon) pour les analyses ATG. Un grand merci à Dr Alexandra OUDOT et Dr Mathieu Moreau (Université de Dijon et CGFL) pour le radiomarquage et l'imagerie IRM/TEP.

Je remercie également Professeur Olivier TILLEMENT à l'Institut Lumière Matière (ILM) pour m'avoir permis de travailler pendant une semaine au sein de son laboratoire à Lyon pour réaliser le dosage des ions europium. Je remercie particulièrement Docteur Vu-long pour son assistance technique pendant cette étude.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Frédéric BOSCHETTI (Chematech), au Docteur Vivek S Thakare et à mademoiselle Alix Deshotel de l'ICMUB (UB, Dijon) pour la synthèse des différents chélateurs utilisés dans le cadre de ma thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Michel FROMM, Professeur à l'Université de Bourgogne-Franche-Comté et à Madame Françoise CHUBURU, Professeur à l'Université Reims Champagne-Ardenne, qui ont bien voulu être les membres du comité de suivi de ma thèse.

Je remercie mes collègues au laboratoire, Gautier, Gloria, Inaya, Alix, qui m'ont témoigné de leur soutien tout au long de la thèse. Merci Gautier pour tes conseils très utiles durant la rédaction du manuscrit, merci Gloria pour avoir été mon « binôme » de thèse durant ces trois ans.

Mes remerciements à ma famille, une pensée particulière à ma grande sœur décédée en 2017, à mes proches, à mes amis pour leur encouragement durant ces trois années.

Mes remerciements à Campus-France pour avoir m'octroyé un financement de six mois par an durant les trois années de la thèse.

Je remercie chaleureusement mes parents pour m'avoir donné toutes les chances d'arriver jusqu'ici et pour leur soutien sans faille. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma gratitude.

Résumé en français

L'imagerie médicale est devenue la pierre angulaire de la lutte contre diverses maladies (cancer, maladies cardiovasculaires) puisqu'elle permet de détecter et de suivre l'évolution de la maladie et d'orienter le traitement. La tendance actuelle consiste à combiner plusieurs techniques d'imagerie complémentaires pour exploiter les avantages de chacune d'elles tout en surmontant leurs limites. Parmi les nombreuses possibilités, la combinaison de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomographie par émission de positon (TEP) semble très intéressante, car elle allie la haute résolution de l'IRM à la sensibilité exceptionnelle de la TEP. Si le développement de ce dispositif constitue en soi un défi de taille, la conception de sondes multimodales constitue également une étape essentielle pour l'exploitation d'imageurs intégrés IRM/TEP. Pour réaliser le développement de sondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM/TEP, deux stratégies basées sur le caractère multifonctionnel des nanoparticules ont été explorées, en gardant à l'esprit que ces agents d'imagerie doivent être éliminés par clairance rénale ($D_h < 10$ nm). La première a consisté en la synthèse de nanoparticules d'or ultrapetites revêtues par deux types différents de chélateur pour une complexation sélective des ions gadolinium (IRM) et des émetteurs de positons (TEP). La deuxième stratégie a reposé sur la réduction d'un sel d'or en présence de molécules dithiolées contenant deux sites de complexation spécifiques. La réduction du sel d'or en présence d'un mélange de deux différents chélateurs ou en présence de molécules dithiolées contenant deux sites de complexation spécifiques a fourni des nanoparticules d'or ultrapetites (taille du cœur d'or (TEM) : 2 à 3 nm et diamètre hydrodynamique (DLS) : 6 - 8 nm) capables d'immobiliser à la fois les ions gadolinium et les ions cuivre-64. En conséquence, la biodistribution de ces nanoparticules a pu être suivie simultanément par IRM et TEP sur un même animal avec le même dispositif d'imagerie IRM/TEP intégré et après une seule injection intraveineuse. Cette étude a également confirmé une libre circulation des nanoparticules et une excrétion rénale sans aucune accumulation indésirable dans l'organisme sain. Ce travail a montré que les nanoparticules d'or ultrapetites revêtues par deux types différents de chélateurs ou des molécules contenant deux sites de complexation spécifiques possèdent un fort potentiel pour l'imagerie bimodale IRM/TEP.

Abstract

Medical imaging has become a cornerstone of the fight against various diseases (cancer, cardiovascular diseases) since it allows to detect and monitor the development of disease and to guide therapy. The current trend is to combine several complementary imaging techniques to exploit the advantages of each while overcoming their limitations. Among the numerous possibilities, the combination of magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) appears very attractive because it allies the high resolution of MRI to the exceptional sensitivity of PET. If the development of this imaging device is in itself a significant challenge, the design of multimodal probes also constitutes an essential step for exploiting MRI/PET fused technology. For achieving the development of multimodal probes for integrated MRI/PET, two strategies based on the multifunctional character of the nanoparticles have been explored, keeping in mind that these nanostructured imaging agents must be removed by renal clearance ($D_h < 10$ nm). The first one consists in the synthesis of ultrasmall gold nanoparticles coated by two different types of chelator for a selective complexation of gadolinium ions (for MRI) and of positron emitters (for PET). The second strategy allowed to reduce gold salt in presence of dithiolated molecules containing two specific complexation sites.

The reduction of gold salt in presence of a mixture of two different dithiolated chelators or in presence of dithiolated molecules containing two specific complexation sites provides ultrasmall gold nanoparticles (core size (TEM): 2-3 nm and hydrodynamic diameter (DLS): 6-8 nm) which are able to immobilize both gadolinium ions and ^{64}Cu (II) ions as it was shown by the characterization after radiolabeling. As a result, the biodistribution of these nanoparticles can be monitored by T_1 -weighted MRI and by PET on a same animal with the same imaging device integrating PET and MRI modalities after a single intravenous injection.

This study confirmed also a free circulation and a renal excretion without any undesirable accumulation within the healthy organs.

This work has shown that ultrasmall gold nanoparticles coated by two different types of chelator or molecules containing two specific complexation sites have a high potential for bimodal imaging MRI/PET.

Glossaire.....	16
----------------	----

Table des matières

Chapitre 1 : Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM/TEP

Introduction générale.....	28
Référence bibliographique	31
1.1 Introduction	37
1.2. Imagerie médicale	38
1.2.1. Historique	38
1.2.2. Les différentes modalités d'imagerie	38
1.2.2.1. L'imagerie X	38
1.2.2.1.1. La Radiographie	38
1.2.2.1.2. LA tomodensitométrie X (Scanner X ou CT).....	39
1.2.2.1.3. Les agents de contraste pour l'imagerie X.....	40
1.2.2.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	42
1.2.2.2.1. Principe de l'IRM.....	43
1.2.2.2.2. Les produits de contraste utilisés en IRM clinique	45
1.2.2.3. Imagerie nucléaire (TEMP/TEP)	47
1.2.2.3.1. Principe de la tomographie par émission monophotonique.....	48
1.2.2.3.2. Principe de la tomographie par émission de positon	49
1.2.2.3.3. Les radioéléments.....	50
1.2.2.4. Echographie.....	52
1.2.2.4.1. Principe.....	52
1.2.2.4.2. Les produits de contraste en échographie	53
1.2.2.5. Imagerie photoacoustique	54
1.2.2.5.1. Principe.....	54
1.2.2.5.2 Les produits de contraste pour l'imagerie photoacoustique	55
1.2.2.6. Imagerie de fluorescence.....	57

1.2.2.6.1. Principe.....	57
1.2.2.6.2. Les sondes fluorescentes et luminescentes	58
1.2.2.6.2.1. Les traceurs fluorescents organiques	58
1.2.2.6.2.2. Les traceurs fluorescents inorganique.....	59
1.2.3. La combinaison des différentes imageries	62
1.3. L'imagerie simultanée IRM/TEP	65
1.3.1. Le projet IMAPPI.....	65
1.3.1.1. L'imageur intégré IRM/TEP	66
1.3.1.2. Le développement de sondes (IRM/TEP).....	67
1.4. Le développement de sonde pour l'imagerie multimodale IRM/TEP.....	67
1.4.1. Principe général.....	67
1.4.2. Agents d'imagerie IRM/TEP	68
1.4.2.1. Agents moléculaire d'imagerie	68
1.4.2.1.1. Généralités.....	68
1.4.2.1.2. Agent de contraste IRM	71
1.4.2.1.2.1. Les agents de contraste paramagnétiques (positifs).....	72
1.4.2.1.2.2. Les agents de contraste super-paramagnétiques	74
1.4.2.1.2. Radiotracteur TEP/TEMP	76
1.4.2.1.3.1. Les atomes radioactifs.....	76
1.4.2.1.3.1.1. Technétium-99	76
1.4.2.1.3.1.2. Indium-111	77
1.4.2.1.3.1.3. Gallium-68	77
1.4.2.1.3.1.4. Cuivre-64.....	79
1.4.2.1.3.1.5. Zirconium-89.....	79
1.4.2.1.3.1.6. Le fluor-18.....	80
1.4.2.1.3.1.7. L'iode	80
1.4.2.1.3.2. Greffage de chélatés de radioéléments.....	81

1.4.2.2. Agent moléculaire d'imagerie bimodale (IRM/TEP)	83
1.4.2.3. Nanoparticules multifonctionnelles pour l'imagerie multimodale	90
1.4.2.3.1. Généralités sur les nanoparticules	90
1.4.2.3.2. Nanoparticules pour l'IRM/TEP	93
1.5. Présentation de la thèse	97
Références bibliographiques	100

Chapitre 2: Synthèse, caractérisation et étude de la biodistribution des nanosondes multifonctionnelles

2.1 Introduction	113
2.2 Synthèses et caractérisation des nanosondes IRM/TEP.....	116
2.2.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs	116
2.2.1.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TADFO, Au@(TADOTAGA) _x (TADFO) _y	117
2.2.1.1.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y , (x/y=2).....	117
2.2.1.1.2. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y	118
2.2.1.1.3. Purification	119
2.2.1.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TANODAGA, Au@(TADOTAGA) _x (TANODAGA) _y	119
2.2.1.2.1. Première stratégie : marquage après synthèse	120
2.2.1.2.1.1 Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2y} (TANODAGA) _y	120
2.2.1.2.1.2. Marquage après synthèse	121
2.2.1.2.2. Deuxième stratégie : marquage avant synthèse	122
2.2.1.2.2.1. Préparation du chélaté	122
2.2.1.2.2.2. Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd)) _{2y} (TANODAGA) _y ,.....	122

2.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par un seul type de molécules mais portant deux sites de coordination spécifiques	123
2.2.2.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA]	124
2.2.2.2. Purification	125
2.2.3. Lyophilisation.....	125
2.2.4. Caractérisation des nanoparticules synthétisées	125
2.2.4.1 La spectrophotométrie UV-visible.....	125
2.2.4.2. Microscopie électronique en transmission (MET).....	126
2.2.4.3. Diamètre hydrodynamique (D_h).....	126
2.2.4.4. Potentiel zêta	128
2.2.4.5. Analyse thermogravimétrie (ATG).....	128
2.2.4.6. Dosage ICP-AES	129
2.2.4.7. Estimation du nombre de ligands disponibles par dosage de l'ion europium(III)	129
2.2.4.8. Etude de la complexation des ions d'intérêt pour l'imagerie	131
2.2.4.8.1. Etude de la complexation de l'ion gadolinium(III)	131
2.2.4.8.1.1. Dosage à la température ambiante :	131
2.2.4.8.1.2. Dosage par saturation des sites disponibles des chélateurs à 80°C :	132
2.2.4.8.2. Etude de la complexation de l'ion zirconium (IV)	132
2.2.4.9. Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or.....	133
2.2.4.9.1. Stabilité à différents pH	133
2.2.4.9.2. Stabilité dans le temps et en milieux physiologique.....	134
2.2.4.9.2.1. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en présence des ions d'intérêt:	134
2.2.4.9.2.2. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en absence des ions d'intérêt:	135
2.2.4.9.2.3. Milieu aqueux et en présence des ions d'intérêt :	135
2.2.4.9.2.4. Milieu aqueux et en absence des ions d'intérêt:	135

2.2.4.10. Radiomarquage et caractérisation du radiomarquage	136
2.2.4.10.1. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)) _x (TADFO) _y avec x/y= 10 et 2 par ⁸⁹ Zr ⁴⁺	136
2.2.4.10.2. Etude de la Stabilité du radiomarquage dans le temps	137
2.2.4.10.3. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)) _{2y} (TANODAGA) _y , et Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64, en présence de l'ion gadolinium (III).....	138
2.2.5. Imagerie simultanée IRM/TEP	138
2.2.5.1. Appareillage et protocole	138
2.2.5.2. Préparation des animaux avec et sans tumeur.....	139
2.2.5.3. Suspensions injectables	140
2.2.5.4. Comptage gamma.....	140
2.2.5.5. Analyse des organes par ICP-AES.....	140
2.3. Résultats et Discussion.....	141
2.3.1. Nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateur Au@(TADOTAGA) _x (TADFO) _y (x/y = 10 et 2)	141
2.3.1.1. Morphologie et stabilité colloïdale	141
2.3.1.2. Analyse de la couche organique.....	147
2.3.1.3. Marquage des nanoparticules par les ions gadolinium (III) et le radioélément zirconium-89.....	150
2.3.1.4. Etude de la biodistribution <i>in vivo</i>	157
2.3.2. Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA) et Au@(TADOTAGA)(TANODAGA), (x/y=10 et 2).....	162
2.3.3. Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	182
2.3.3.1. La plateforme moléculaire TA[DOTAGA-Lys-NODAGA]	182
2.3.3.2. Synthèse et caractérisation morphologique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	184
2.3.3.3. Stabilité colloïdale des suspensions aqueuses de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	185

2.3.3.4. Le radiomarquage des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64.....	189
2.4. Conclusion.....	195
Références bibliographiques	197

Chapitre 3 : La synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour le ciblage actif

3.1. Réflexion sur le ciblage des nanoparticules d'or	200
3.2. Synthèses et caractérisation des nanoparticules d'or.....	203
3.2.1. Synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-EuK]	203
3.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NH ₂]	204
3.2.3. Synthèse de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-Lys-NH ₂]	205
3.2.4. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte composée de (TA[DOTAGA]) et (TA[NODAGA-lys-NH ₂]).....	205
3.3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules d'or	207
3.3.1. Microscope électronique à transmission (MET).....	207
3.3.2. Spectrophotométrie UV-visible	207
3.3.3. Potentiel zêta	207
3.3.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	207
3.3.5. Etude de stabilité colloïdale à différents pH	208
3.4. Résultats et Discussion.....	208
3.4.1. Au@TA[DOTAGA-lys-EuK].....	208
3.4.2. Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂].....	212
3.4.3. Au@[TANODAGA-lys-NH ₂]	216
3.4.4. Au@(TADOTAGA) _{20y} (TANODAGA-Lys-NH ₂) _y	219
3.5. Conclusion.....	223
Références bibliographiques	224
Conclusion générale	225

Glossaire

Abréviation

Agent T₁

Agent T₂

Agent radiosensibilisant

ATG

CAS

CT

C_γ

CGFL de Dijon

⁶⁴Cu²⁺

DLS

DFO

DMSO

DOTA

DOTAGA

Eu³⁺

Effet EPR

¹⁸F-FDG

Ga³⁺

Gd³⁺

Gd-DTPA

Signification

Agents de contraste paramagnétique

Agents de contraste superparamagnétique

Agent qui augmente la dose appliquée par irradiation

Analyse thermogravimétrique

Chromazurol S

Tomodensimétrie

Comptage gamma

Centre Georges François Leclerc de Dijon

Ion divalent du cuivre-64

Diffusion dynamique de la lumière

Desferrioxamine B

Diméthylsulfoxyde

Acide 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétrayl)tétraacétique

Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-glutarique -4,7,10-triacétique

Ion europium(III)

effet de perméabilité et de rétention tissulaire

¹⁸F-fluorodésoxyglucose

Ion gallium(III)

Ion gadolinium(III)

MAGNEVIST

Gj	Rendement radiochimique
HOPO	2-hydroxypyridine-N-oxyde
In ³⁺	Ion indium(III)
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma
IMAPPI	Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging
IN	Imagerie nucléaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intraveineuse
kDA	KiloDalton
Lyophilisation	Séchage à froid
MET	Microscopie électronique à transmission
MRT	Radiothérapie par microfaisceaux
NaBH ₄	Tétrahydruroborate de sodium
NIR	Proche infrarouge
NODAGA	Acide-1, 4,7-triazacyclononane-1-glutarique acide-4,7-diacétique
NOTA	Acide-1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique
NPs	Nanoparticules
Au	Or
PAI	Imagerie photoacoustique
pH	Potentiel hydrogène
PEI	Polyéthylènimine
ζ	Potentiel zêta

RMN	Resonance magnétique nucléaire
RPS	Résonance plasmonique de surface
SPIO	Oxyde de fer superparamagnétique
Sp. UV-Visible	spectrophotométrie UV-Visible
TRAP	Triazocyclononanetriphosphate
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positon
T	Tesla
T ₁	Relaxation longitudinale
T ₂	Relaxation transversale
X-ray	Rayon X
⁸⁹ Zr ⁴⁺	Ion tétravalent du zirconium-89
UCNPs	Nanoparticule à conversion ascendante d'énergie
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic Iron Oxide

Liste des figures

Figure 1 : Principe du scanner X [11]	37
Figure 2: Principe de l'IRM [23].....	41
Figure 3: Schéma des complexes de gadolinium utilisés en IRM [25].....	44
Figure 4: Principe de fonctionnement de la tomographie par émission monophotonique (TEMP) [32].	45
Figure 5: Emission de positon et annihilation [39].	47
Figure 6: Principe de fonctionnement de l'échographie [43].	49
Figure 7: Principe de la fluorescence	54
Figure 8: Les différents fluorophores organiques utilisés en imagerie de fluorescence [59].	56
Figure 9: Tableau périodique des éléments (en couleur jaune, les lanthanides) [61].	57
Figure 10: Spectre d'émission des ions lanthanides [62].....	58
Figure 11: Principe de la luminescence en temps résolu.	58
Figure 12 : Imageur IRM/TEP intégré [67].	64
Figure 13: Les différents radiotraceurs utilisés en TEMP [70].....	67
Figure 14: Equation de la relaxivité de l'agent de contraste en IRM [71].....	68
Figure 15: Interaction dipolaire entre le moment magnétique électroniques du chélate Gd-DOTA et le moment nucléaire des protons des molécules d'eau [73].....	69
Figure 16: Influence de nanoparticules d'oxyde de fer sur le contraste en IRM [78].	72
Figure 17: Formule semi-développée des différents chélateurs (a) (NOTA), (b) NODAGA, (c) DOTAGA	75
Figure 18: Formule semi-développée des chélateurs DOTA et HOPO.....	77
Figure 19: Formule semi-développée des différents chélateurs (a) (DOTA), (b) TETA, (c) CB-TE2A (d) DO3A	79
Figure 20: Sonde moléculaire sensible au pH pour l'imagerie simultanée IRM/TEP [104]	81
Figure 21: la relaxivité du complexe GdDOTA-4AMP-F en fonction du pH [104].	82
Figure 22: Plateforme (IRM/TEP) composé de deux macrocycles DO3A [105].....	82
Figure 23: Plateforme pour l'imagerie simultanée IRM/TEP composée de deux macrocycles différents, DO3A et AAZTA [106].....	83
Figure 24: Mesure de la relaxivité en fonction du pH [106].....	83

Figure 25: Sonde moléculaire (IRM/TEP) à base de polyazamacrocyles : TRAP et DOTA [107].	84
Figure 26: TEP/IRM d'un rat Wistar (plan coronal traversant les reins) : A) avant et B –D) 25 min et 5 min après l'injection d'un mélange de la sonde moléculaire non radioactif à base de polyazamacrocyles (20 μmol) et d'un radioélément (27 MBq, 0,8 nmol): pondéré en T1 (A, B), images de fusion (C) et PET (D) [107].	85
Figure 27: Plateforme (IRM/TEP) à base d'un complexe bimétallique NOTA(^{68}Ga)-[DOTA(Gd)] ₆ [108].	85
Figure 28: Images IRM, TEP et fusion des images TEP/IRM de la tumeur U87MG (xénogreffe) chez des souris SCID 1 heure après l'injection de la sonde NOTA(^{68}Ga)-[DOTA(Gd)] ₆ fonctionnalisée par le peptide RGD [108].	86
Figure 29: Nombre de publication sur les nanoparticules d'or et d'argent de 1997 à 2016 [112].	88
Figure 30: Comparaison de l'ordre de grandeur des nanoparticules et des constituants ...	88
Figure 31: TEP, IRM et fusion IRM/TEP, après injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par OA et NOTA-Ga à une souris porteuse de tumeur HT-29 [118].	91
Figure 32: Les images IRM / TEP sur la même souris avec des nanoparticules d'AGuIX : (a – c) les images IRM d'une souris mâle après injection de 20 μmol d'une suspension de nanoparticules AGuIX solution, 60 min avant l'examen par IRM. (d) une image TEP / TDM avec 0,925 MBq de ^{68}Ga -AGuIX (volume injecté: 150 μl) et placé sur un tampon de polystyrène chaud pendant 30 min [116].	92
Figure 33: Images coronales IRM / TEP simultanées de souris porteuses de tumeurs TS/A (flèches blanches) après injection de SiGdNP@N-1(^{64}Cu) nanoparticule. (a) contrôle l'image IRM pondérée en T1 d'une souris en bonne santé; (b) IRM T1 d'une souris portant une tumeur TS/A, 1 h après l'injection; (e) IRM T1; (f) TEP et (g) fusion des images IRM/TEP de souris porteuse d'une tumeur TS/A, 24 heures après l'injection [119].	93
Figure 34: Etude de la biodistribution <i>in vivo</i> de nanoparticule d'or Au@TADOTAGA($\text{Gd} + ^{64}\text{Cu}$) suivi par IRM/TEP : La première colonne correspond aux images TEP, la deuxième aux images IRM (T1) et la troisième à la fusion des images IRM/TEP	94
Figure 35: Formule semi-développée des différents chélateurs (a) TADOTAGA, (b) (TANODAGA), (c) TADFO, (d) TA[DOTAGA-Lys-NODAGA].	96

Figure 36: Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouverte par un mélange de deux chélateurs différents.....	108
Figure 37: Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une plateforme moléculaire comprenant deux sites de coordination différents.....	108
Figure 38: Schéma de la synthèse de l'acide thioctique (TA) par une amine primaire ...	108
Figure 39: Formule semi-développée des différents chélateurs (a) (TADOTAGA), (b) TANODAGA, (c) TADFO, (d) TA[DOTAGA-lys-TANODAGA].....	109
Figure 40: Schéma de la synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par la couche mixte de chélateurs, Au@(TADOTAGA) _x (TADFO) _y , (x/y= 10 et 2).	111
Figure 41: Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par la couche mixte de chélateurs, Au@(TADOTAGA) _x (TANODAGA) _y , (x/y=10 et 2 avec x+y=n).	113
Figure 42: Schéma de synthèse de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] recouvertes par une couche homogène de ligands possédant chacun deux sites de coordination.	118
Figure 43: Schéma de la couche de solvation et variation du potentiel de surface	121
Figure 44: Equation de Smoluchowski	122
Figure 45: Dispositif d'ultrafiltration du mélange Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO(Zr)) _y	127
Figure 46: Clichés MET des particules d'or (a) Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y et Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y	136
Figure 47: Spectres UV visible des suspensions des nanoparticules d'or (bleu) Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y et (rouge) Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y ,.....	137
Figure 48: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or à différents pH :(a) Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y et (b) Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y	139
Figure 49: Courbes représentant le potentiel zêta en fonction du pH des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y (diamants bleus) et Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y (carrés rouges).	140
Figure 50: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or, (a et b) Au@(TADOTAGA(Gd)) _{10y} (TADFO(Zr)) _y , et (c et d) Au@(TADOTAGA(Gd)) _{2y} (TADFO(Zr)) _y , en milieu aqueux (a et c) et en milieu NaCl/hepes (b et d) à pH 7,4.	141
Figure 51: Courbe d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y	142

Figure 52: Courbe d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules Au@(TADOTAGA)10y(TADFO)y.....	143
Figure 53: Spectre UV-visible de xylénol orange en présence d'une quantité croissante d'ions gadolinium.....	145
Figure 54: Spectre des suspensions de nanoparticules Au@(TADOTAGA)2y(TADFO)y en présence d'ions Zr ⁴⁺ et de Chromazurol S.	146
Figure 55: Radiochromatogramme (CCM) après élution (A) d'une solution d'oxalate de zirconium-89 et (B) d'un mélange d'ions zirconium-89 et de nanoparticules Au@TADOTAGA(Gd)10y(TADFO)y (60 min à 80°C).	148
Figure 56: Radiochromatogramme après élution d'un mélange d'ions zirconium-89 et d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA)x(TADFO)y, (a) x/y=2 et b) x/y=10.....	149
Figure 57: Radiochromatogrammes (CCM) après élution d'un mélange d'ions zirconium-89 et de nanoparticules Au@TADOTAGA(Gd): incubation pendant (A) 60 min à 37°C et (B) 60 minutes supplémentaires à 80°C.....	149
Figure 58: Etude de la stabilité du radiomarquage des suspensions de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))10y(TADFO(⁸⁹ Zr))y dans du sérum de veau fœtal (FBS) et en présence d'un compétiteur EDTA.....	150
Figure 59: Images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 24h après injection par voie intraveineuse de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))2y(TADFO(⁸⁹ Zr))y.....	152
Figure 60: Biodistribution 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))2y(TADFO(⁸⁹ Zr))y d'après le comptage gamma post-mortem.....	153
Figure 61: Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))2y(TADFO(⁸⁹ Zr))y.....	153
Figure 62: Images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 20h après injection par voie intraveineuse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))10y(TADFO(⁸⁹ Zr))y.....	155
Figure 63: Spectres UV visible de suspensions des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))2y(TANODAGA)y (bleue), Au@(TADOTAGA)2y(TANODAGA)y (vert) et Au@(TADOTAGA)10y(TANODAGA)y (rouge).	157

Figure 64: Clichés TEM des particules d'or (a) Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$) (b) Au@($\text{TADOTAGA})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$ et (c) Au@($\text{TADOTAGA})_{10}\text{y}(\text{TANODAGA})_y$	158
Figure 65: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or à différents pH : (a) Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$) (b) Au@($\text{TADOTAGA})_{10}\text{y}(\text{TANODAGA})_y$ et (c) Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$).....	160
Figure 66: Courbe représentant le potentiel zêta en fonction du pH des différentes suspensions de nanoparticules d'or Au@($\text{TADOTAGA})_{10}\text{y}(\text{TANODAGA})_y$ Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$) et Au@($\text{TADOTAGA})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$	161
Figure 67: Spectres UV-visible de suspensions des nanoparticules d'or : (a,b) Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$) et (c,d) Au@($\text{TADOTAGA})_{10}\text{y}(\text{TANODAGA})_y$ en milieu NaCl/hepes (a,c) et milieu aqueux (b,d).....	163
Figure 68: Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules d'or Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$).	164
Figure 69: Courbes d'analyse thermogravimétrique d'une poudre de nanoparticules d'or Au@TADOTAGA.	165
Figure 70: Courbes d'analyse thermogravimétrique d'une poudre de nanoparticules d'or Au@TADOTAGA.	165
Figure 71: Spectre de la luminescence de l'euporium chélaté par différents chélateurs présents à la surface de nanoparticules d'or : (a et b) Au@TADOTAGA, (c et d) Au@TANODAGA et (e et f) Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_x(\text{TANODAGA})_y, (x/y=2)$).	167
Figure 72: Courbes représentant l'évolution du rapport des bandes d'absorption A573/A433 en fonction de la quantité d'ions Gd^{3+} ajoutée à des suspensions colloïdales contenant les nanoparticules d'or (a)Au@TADOTAGA (b) Au@TANODAGA (c) Au@($\text{TADOTAGA})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$	169
Figure 73: Radiochromatogramme après élution d'un mélange d'ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ et de nanoparticules Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2\text{y}(\text{TANODAGA})_y$).	171
Figure 74: Etude de la stabilité du radiomarquage de nanoparticules Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd}^{3+})_2\text{y}(\text{TANODAGA}(\text{Cu}^{64}))_y$) dans du sérum de veau fœtal et en solution aqueuse contenant un complexant compétiteur EDTA.	172

Figure 75: Images IRM,TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 24h après l'injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd)) ₂ y(TANODAGA(⁶⁴ Cu)) _y	173
Figure 76: Mesure post-mortem de la radioactivité par comptage gamma des organes des souris sacrifiées 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)) _x (TANODAGA(⁶⁴ Cu ²⁺)) _y	175
Figure 77: Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)) ₂ y(TANODAGA(⁶⁴ Cu)) _y	175
Figure 78: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA]......	178
Figure 79: Spectre UV-visible d'une suspension aqueuse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA]......	178
Figure 80: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] à différents pH.	179
Figure 81: Courbe représentant le potentiel zêta en fonction du pH d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].	180
Figure 82: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA] en milieu aqueux (a) et en milieu NaCl/hepes (b).....	181
Figure 83: Radiochromatogramme après élution d'une suspension de nanoparticules radiomarquées Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA] par le cuivre-64.....	183
Figure 84: Etude de la stabilité du radiomarcage de nanoparticules (Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴ Cu)]) (courbe violet avec triangle vert) et Au@(TADOTAGA(Gd)) ₂ y(TANODAGA(⁶⁴ Cu ²⁺)) _y (courbe rouge avec losange rouge) dans du sérum de veau fœtal (trait plein) et en solution aqueuse contenant un complexant compétiteur EDTA (trait pointillé).	183
Figure 85: Les images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h puis 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴ Cu)]......	184
Figure 86: Mesure post-mortem de la radioactivité par le comptage gamma des organes des souris sacrifiées 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴ Cu)]......	186

Figure 87: Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴ Cu)].	187
Figure 88: Schéma du chélateur TADOTAGA-Lys-EuK	195
Figure 89: Schéma du chélateur TANODAGA-Lys-NH ₂	196
Figure 90: Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]	201
Figure 91: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]	202
Figure 92: Spectre UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] à différents pH.	203
Figure 93: Courbe du potentiel zêta en fonction du pH pour des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK].	204
Figure 94: Schéma de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂] recouverte par un chélateur trifonctionnel avec une fonction amine primaire.	205
Figure 95: Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂]	206
Figure 96: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂]	207
Figure 97: Spectres UV-visible de suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂] à différents pH.	208
Figure 98: Potentiel zêta des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂] à différents pH.	209
Figure 99: Schéma de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH ₂] recouverte par un chélateur trifonctionnel TA[NODAGA-Lys-NH ₂] présentant une fonction amine primaire.	210
Figure 100: Spectre UV-visible d'une suspension des nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH ₂].	210
Figure 101: Cliché MET des nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH ₂].	211
Figure 102: Schéma de nanoparticules d'or Au@((TADOTAGA) ₂₀ y((TANODAGA-Lys-NH ₂) _y)) recouvertes par une couche mixte de différents chélateurs dont un chélateur trifonctionnel possédant une fonction amine primaire.	212
Figure 103: Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@((TADOTAGA) ₂₀ y((TANODAGA-lys-NH ₂) _y)).	213
Figure 104: Cliché de MET des nanoparticules d'or Au@((TADOTAGA) ₂₀ y((TANODAGA-lys-NH ₂) _y)).	214

Figure 105: Spectres UV-visible de suspensions des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)20y(TANODAGA-lys-NH ₂)y à différents pH.	214
Figure 106: Potentiel zêta des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)20y(TANODAGA-lys-NH ₂)y à différents pH.	215

Liste des tableaux

Tableau 1: Produits de contraste de basse osmolarité [15]	33
Tableau 2: Produits de contraste de haute osmolarité [15]	34
Tableau 3: Les produits de contraste utilisés cliniquement en IRM [25]	38
Tableau 4: Les principales caractéristiques des émetteurs de positons utilisés en TEP [40]	43
Tableau 5: Agents de contraste échographique [46]	46
Tableau 6: Agents de contraste photoacoustique [52]	48
Tableau 7: Comparaison des différentes modalités d'imagerie [63].	55
Tableau 8: Les sondes fluorescentes pour le marquage d'ADN	61
Tableau 9: Principaux radiotraceurs utilisées en imagerie TEP [70]	62
Tableau 10: Les complexes de gadolinium [72]	66
Tableau 11: Réactifs de la synthèse des nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_x(TADFO)_y$ pour ($x/y=10$ et 2)	108
Tableau 12 : Réactifs de la synthèse de nanoparticule $Au@(TADOTAGA)_x(TANODAGA)_y$, ($x/y=10$).....	111
Tableau 13: Paramètre physique de l'ICP-AES.....	113
Tableau 14: Paramètres physiques du dosage des ions europium(III) par fluorimétrie	120
Tableau 15: Résultats récapitulatifs des mesures physico-chimiques $Au@(TADOTAGA)_x(TADFO)_y$ en fonction de x/y de (DLS, TEM, ICP-AES).....	133
Tableau 16: Composition de la couche organique déterminée par ATG.....	139
Tableau 17 : Détermination des nombres de chélateurs par nanoparticules.....	142
Tableau 18: Résultats récapitulatifs des mesures physico-chimiques (DLS, ICP-AES)	154
Tableau 19 : Détermination des nombres de chélateurs par nanoparticules par dosage d'ions gadolinium libre.....	165

Introduction générale

L'imagerie médicale est devenue indispensable pour lutter contre diverses maladies (cancer, maladies cardiovasculaires,...) [1]. Sa contribution dans ce domaine comprend le dépistage, le diagnostic, le suivi de la progression de la maladie et l'évaluation de la réponse au traitement qui est nécessaire à la planification des nouvelles étapes du protocole thérapeutique. La tendance actuelle consiste à combiner plusieurs techniques d'imagerie complémentaires pour exploiter les avantages de chacune tout en surmontant leurs limites [2]. Parmi les nombreuses possibilités, la combinaison de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomographie par émission de positon (TEP) semble très intéressante, car elle allie la haute résolution de l'IRM à la sensibilité exceptionnelle de l'imagerie TEP [3] [4]. Une telle combinaison devrait se traduire par une percée significative dans la lutte contre diverses pathologies, car elle permettrait la détection précoce d'une altération des tissus avec une localisation très précise. Si le développement d'un imageur intégrant ces deux modalités d'imagerie représente en soi un défi de taille qui a été cependant relevé par le projet EquipEx IMAPPI (coordonnateurs Prof. Brunotte et Prof. Cochet, CGFL, Dijon), la conception de sondes multimodales constitue également une étape essentielle pour l'exploitation d'un imageur intégré IRM/TEP. Dans le cadre du projet IMAPPI, nous avons été chargés avec d'autres équipes de chimie de développer des sondes combinant IRM et TEP.

Afin d'atteindre cet objectif, l'équipe NCM peut s'appuyer sur son expérience car elle a développé des nanoparticules d'or radiosensibilisantes qui peuvent être suivies par IRM et imagerie nucléaire [5] [6] [7] [8] [9]. Ces nanoparticules sont composées d'un cœur d'or (2-3 nm) et d'une couche organique de chélateurs linéaires (DTDTPA) ou macrocycliques (TADOTA, TADOTAGA). Ces chélateurs qui ont été fonctionnalisés de façon à posséder un groupe d'ancrage à deux atomes de soufre pour une immobilisation efficace et durable sur les cœurs d'or ont la capacité de former des complexes stables avec les ions gadolinium et des radioéléments. L'immobilisation de ces ions confère aux nanoparticules d'or un comportement de sondes d'imagerie. Les ions gadolinium permettent de suivre la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules d'or par IRM alors que les radioisotopes sous forme ionique rendent possible le suivi des nanoparticules en imagerie nucléaire (TEMP avec technétium-99m, indium-111 et TEP avec gallium-68 et cuivre-64). Grâce au suivi par imagerie, nous avons pu montrer que les nanoparticules possédaient un comportement sain après administration. Les

nanoparticules circulent librement après injection intraveineuse sans accumulation indésirable dans les organes sains et sont éliminées par voie rénale qui constitue un prérequis indispensable pour l'utilisation *in vivo* des nanoparticules non-biodégradables. Bien qu'elle soit relativement modeste, ces nanoparticules d'or se distinguent par leur accumulation préférentielle dans les tumeurs solides. La visualisation de l'accumulation des nanoparticules d'or dans les tumeurs est extrêmement utile pour exploiter l'effet radiosensibilisant au moment le plus opportun. Il a été montré que les nanoparticules d'or améliorent l'effet du traitement par radiothérapie en assurant un meilleur contrôle de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des animaux porteurs de tumeurs cérébrales (gliosarcome 9L implanté dans l'hémisphère droit du cerveau) [9].

Ces travaux antérieurs mettent en exergue le potentiel de ces nanoparticules pour la radiothérapie guidée par imagerie. Ils montrent également l'intérêt de combiner plusieurs modalités d'imagerie, en particulier la bonne résolution de l'IRM avec l'excellente sensibilité de l'imagerie nucléaire.

Cependant, la pertinence de l'interprétation croisée des différentes images est contestable car ces images ont été acquises avec différents animaux, différentes injections et différents imageurs. Afin de s'affranchir de ces limitations, il est indispensable de réaliser l'IRM et l'imagerie nucléaire sur le même animal avec la même injection et le même imageur. L'imagerie simultanée implique que les ions gadolinium et des ions émetteurs de positon soient immobilisés sur la même nanoparticule. Dans le cadre d'un essai préliminaire réalisé au cours de la thèse de Gautier Laurent, il a été montré que les nanoparticules d'or recouvertes par le chélateur macrocyclique TADOTAGA (Au@TADOTAGA) pouvaient être co-marquées à la fois par les ions gadolinium (Gd^{3+}) et par les ions cuivre-64 ($^{64}Cu^{2+}$). Malheureusement le relargage massif du radioisotope après injection intraveineuse a été constaté sur les images TEP. D'après cette expérience et les données de la littérature, nous avons conclu qu'il n'y avait pas de chélateur universel : il fallait pour immobiliser ces deux types d'ions deux chélateurs différents. Cette conclusion constitue le point de départ de mes travaux de thèse qui ont été consacrés au développement de nanoparticules fonctionnalisées par deux types de chélateurs différents. L'utilisation de ces deux types de chélateurs différents a donc pour objectif d'améliorer la sonde bimodale IRM/TEP. Les nouvelles nanoplateformes ainsi synthétisées seront caractérisées afin d'évaluer leur capacité à se comporter comme des sondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.

Ce manuscrit regroupe les principaux résultats de mes travaux de thèse consacrés au développement de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour l'imagerie simultanée IRM/TEP. Il se présente de la manière suivante :

- ✓ Le chapitre 1 est consacré à une étude bibliographique portant sur la description du contexte de cette étude. Dans ce chapitre, ont également été décrites les différentes techniques d'imagerie ainsi que l'utilisation des sondes d'imagerie bimodale. L'étude bibliographique a ensuite porté sur le développement des agents bimodaux à base de nanoparticules d'or multifonctionnelles conçues pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.
- ✓ Le chapitre 2 portera sur la synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles, leur caractérisation et l'étude de la biodistribution *in vivo* par imagerie simultanée IRM/TEP.
- ✓ Le chapitre 3 sera dédié à la synthèse de nanoparticules multifonctionnelles comportant des groupes de ciblage actif.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui ouvre sur de nouvelles perspectives à explorer.

Référence bibliographique

- [1] T. Hussain et Q. T. Nguyen, « Molecular Imaging for Cancer Diagnosis and Surgery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 66, p. 90-100, févr. 2014.
- [2] J. Zhao *et al.*, « Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes », *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, n° 3, p. 320-338, mai 2018.
- [3] D. Stucht, K. A. Danishad, P. Schulze, F. Godenschweger, M. Zaitsev, et O. Speck, « Highest Resolution In Vivo Human Brain MRI Using Prospective Motion Correction », *PLoS ONE*, vol. 10, n° 7, juill. 2015.
- [4] S. R. Cherry, T. Jones, J. S. Karp, J. Qi, W. W. Moses, et R. D. Badawi, « Total-Body PET: Maximizing Sensitivity to Create New Opportunities for Clinical Research and Patient Care », *J. Nucl. Med.*, vol. 59, n° 1, p. 3-12, janv. 2018.
- [5] G. Laurent *et al.*, « Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization », *Nanoscale*, vol. 8, n° 23, p. 12054-12065, juin 2016.
- [6] C. Alric *et al.*, « Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 18, p. 5908-5915, mai 2008.
- [7] D. R. Arifin *et al.*, « Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging », *Radiology*, vol. 260, n° 3, p. 790-798, sept. 2011.
- [8] C. Alric *et al.*, « The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance », *Nanoscale*, vol. 5, n° 13, p. 5930-5939, juin 2013.
- [9] I. Miladi *et al.*, « The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents », *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, févr. 2014.

Chapitre 1
Nanosondes multimodales pour l'imagerie
simultanée IRM/TEP

Table des matières

Chapitre 1 : Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM/TEP

1.1 Introduction	37
1.2. Imagerie médicale	38
1.2.1. Historique	38
1.2.2. Les différentes modalités d'imagerie	38
1.2.2.1. L'imagerie X	38
1.2.2.1.1. La Radiographie	38
1.2.2.1.2. LA tomodensitométrie X (Scanner X ou CT).....	39
1.2.2.1.3. Les agents de contraste pour l'imagerie X.....	40
1.2.2.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	42
1.2.2.2.1. Principe de l'IRM.....	43
1.2.2.2.2. Les produits de contraste utilisés en IRM clinique	45
1.2.2.3. Imagerie nucléaire (TEMP/TEP)	47
1.2.2.3.1. Principe de la tomographie par émission monophotonique.....	48
1.2.2.3.2. Principe de la tomographie par émission de positon	49
1.2.2.3.3. Les radioéléments.....	50
1.2.2.4. Echographie.....	52
1.2.2.4.1. Principe.....	52
1.2.2.4.2. Les produits de contraste en échographie	53
1.2.2.5. Imagerie photoacoustique	54
1.2.2.5.1. Principe.....	54
1.2.2.5.2 Les produits de contraste pour l'imagerie photoacoustique	55
1.2.2.6. Imagerie de fluorescence.....	57
1.2.2.6.1. Principe.....	57
1.2.2.6.2. Les sondes fluorescentes et luminescentes	58
1.2.2.6.2.1. Les traceurs fluorescents organiques	58

1.2.2.6.2.2. Les traceurs fluorescents inorganique.....	59
1.2.3. La combinaison des différentes imageries.....	62
1.3. L'imagerie simultanée IRM/TEP.....	65
1.3.1. Le projet IMAPPI.....	65
1.3.1.1. L'imageur intégré IRM/TEP.....	66
1.3.1.2. Le développement de sondes (IRM/TEP).....	67
1.4. Le développement de sonde pour l'imagerie multimodale IRM/TEP.....	67
1.4.1. Principe général.....	67
1.4.2. Agents d'imagerie IRM/TEP.....	68
1.4.2.1. Agents moléculaire d'imagerie.....	68
1.4.2.1.1. Généralités.....	68
1.4.2.1.2. Agent de contraste IRM.....	71
1.4.2.1.2.1. Les agents de contraste paramagnétiques (positifs).....	72
1.4.2.1.2.2. Les agents de contraste super-paramagnétiques.....	74
1.4.2.1.2. Radiotracteur TEP/TEMP.....	76
1.4.2.1.3.1. Les atomes radioactifs.....	76
1.4.2.1.3.1.1. Technétium-99.....	76
1.4.2.1.3.1.2. Indium-111.....	77
1.4.2.1.3.1.3. Gallium-68.....	77
1.4.2.1.3.1.4. Cuivre-64.....	79
1.4.2.1.3.1.5. Zirconium-89.....	79
1.4.2.1.3.1.6. Le fluor-18.....	80
1.4.2.1.3.1.7. L'iode.....	80
1.4.2.1.3.2. Greffage de chélatés de radioéléments.....	81
1.4.2.2. Agent moléculaire d'imagerie bimodale (IRM/TEP).....	83
1.4.2.3. Nanoparticules multifonctionnelles pour l'imagerie multimodale.....	90
1.4.2.3.1. Généralités sur les nanoparticules.....	90

1.4.2.3.2. Nanoparticules pour l'IRM/TEP	93
1.5. Présentation de la thèse	97
Références bibliographiques	100

Nanosondes multimodales pour l'imagerie simultanée IRM/TEP

1.1 Introduction

Le développement de l'imagerie médicale remonte à la découverte des rayons X en 1895 par Wilhelm Roentgen [1]. Les progrès scientifiques du début du XX^{ème} siècle ont contribué à la découverte de la radioactivité. Cette découverte a permis l'émergence de l'imagerie nucléaire (IN). La panoplie des techniques d'imagerie s'est agrandie avec la découverte de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en 1973 et plus récemment avec l'application de l'imagerie optique à l'imagerie préclinique et à l'assistance à la chirurgie [2].

L'ensemble de ces différentes modalités d'imagerie a permis l'exploration du corps humain afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'organisme en vue d'apporter des informations utiles pour le diagnostic et le traitement de certaines pathologies comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Ces outils diagnostiques ont permis aussi l'obtention d'images en 2D ou en 3D de très grande qualité. Certaines d'entre elles sont dites anatomiques puisqu'elles permettent la visualisation des organes avec une excellente résolution tandis que d'autres sont dites fonctionnelles car elles permettent d'étudier le fonctionnement des organes [3] [4]. Les techniques dites anatomiques sont handicapées par une faible sensibilité alors que les techniques dites fonctionnelles sont pénalisées par une mauvaise résolution. C'est pourquoi dans certains cas, l'utilisation d'un agent de contraste est important pour distinguer les tissus anormaux et les tissus normaux. Au lieu d'un agent de contraste, certaines techniques d'imagerie telles que l'imagerie nucléaire utilise des traceurs radioactifs émetteurs de rayonnements ionisants [5]. Ces rayonnements sont détectés à l'aide de caméras tournant autour du patient pour permettre la localisation de la zone d'émission du rayonnement.

Par ailleurs, les inconvénients de chacune de ces modalités impliquent leur association afin de combiner les avantages de chacune des modalités d'imagerie permettant ainsi d'apporter une complémentarité au diagnostic. Un tel système bimodal nécessite le

développement de sondes à base de molécules ou de nanoparticules détectables par les deux techniques d'imagerie [6] [7] [8]

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes modalités d'imagerie médicale, leurs avantages et leurs inconvénients. Nous verrons aussi les principaux agents d'imagerie utilisés pour l'amélioration du diagnostic. Nous décrirons aussi les différentes stratégies de combinaison des sondes bimodales et enfin nous présenterons les potentialités des sondes moléculaires et nanosondes pour l'imagerie bimodale et en particulierité pour l'imagerie (IRM/TEP).

1.2. Imagerie médicale

1.2.1. Historique

Depuis l'apparition en 1895 de la première application d'imagerie médicale, en l'occurrence la radiographie, l'imagerie médicale est indubitablement en plein essor [1]. Les progrès scientifiques du XXe siècle ont contribué à la découverte d'autres technologies de pointe. Parmi ces techniques, on compte la scintigraphie, le scanner, l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). De telles techniques offrent un nouvel espoir pour le diagnostic et le traitement des pathologies tels que le cancer. Ils permettent également de mieux comprendre le fonctionnement de certains organes comme le cerveau.

1.2.2. Les différentes modalités d'imagerie

1.2.2.1. L'imagerie X

1.2.2.1.1. La Radiographie

En 1895, alors qu'il étudiait les propriétés associées à des faisceaux d'électrons accélérés dans un tube sous vide, Roentgen a constaté qu'un rayonnement inconnu provenant du tube était capable d'impressionner une plaque photographique : c'est la découverte des rayons X [1]. Un mois plus tard, Roentgen réalisa la première image radiographique d'une structure vivante : c'est le début de la radiographie. En effet, la radiographie est une technique d'imagerie médicale qui utilise des rayons X pour fournir des images en 2D.

Principe

Des rayons X traversent le corps humain, placé entre la source à rayon X et le détecteur. Selon la densité des tissus, les rayonnements X sont plus ou moins absorbés. Le contraste généré par les différences d'absorption variera du blanc (forte absorption) au noir (pas d'absorption) en passant par un dégradé de gris. Les os denses donc très absorbants apparaîtront en clair alors que les organes moins denses seront plus sombres sur la radiographie. L'atténuation différentielle du faisceau suivant la nature et l'épaisseur de matière traversée résulte en une sensibilisation différentielle du détecteur. Il se forme une image bidimensionnelle de l'atténuation des faisceaux dans la région explorée.

La radiographie est très utilisée en orthopédie pour visualiser les os [9]. Elle est utilisée également pour visualiser les tumeurs au niveau des poumons ou des seins. Toutefois cette technique présente un inconvénient majeur. L'image obtenue n'est pas de bonne qualité. Cependant la radiographie a bénéficié des progrès technologiques qui ont conduit à l'avènement de la tomodensitométrie X. Cette dernière se distingue par la production d'images tridimensionnelles.

1.2.2.1.2. LA tomodensitométrie X (Scanner X ou CT)

La tomodensitométrie X est une technique d'imagerie médicale qui repose sur l'atténuation différentielle du faisceau de rayons X après avoir traversé le patient [10].

Principe

Un patient est placé sur une table qui se déplace dans le sens longitudinal à l'intérieur d'un court anneau. Un tube émetteur de rayons X, d'énergie 150 keV tourne autour du patient. Celui-ci génère un faisceau d'une épaisseur de 1 à 10 millimètres. Des détecteurs placés derrière le patient et en face du tube à rayon X mesurent l'intensité résiduelle du faisceau qui a traversé le corps du patient (Figure 1) [11]. Les variations d'absorption des tissus traversés par le rayonnement X donnent une image en 3D des tissus biologiques.

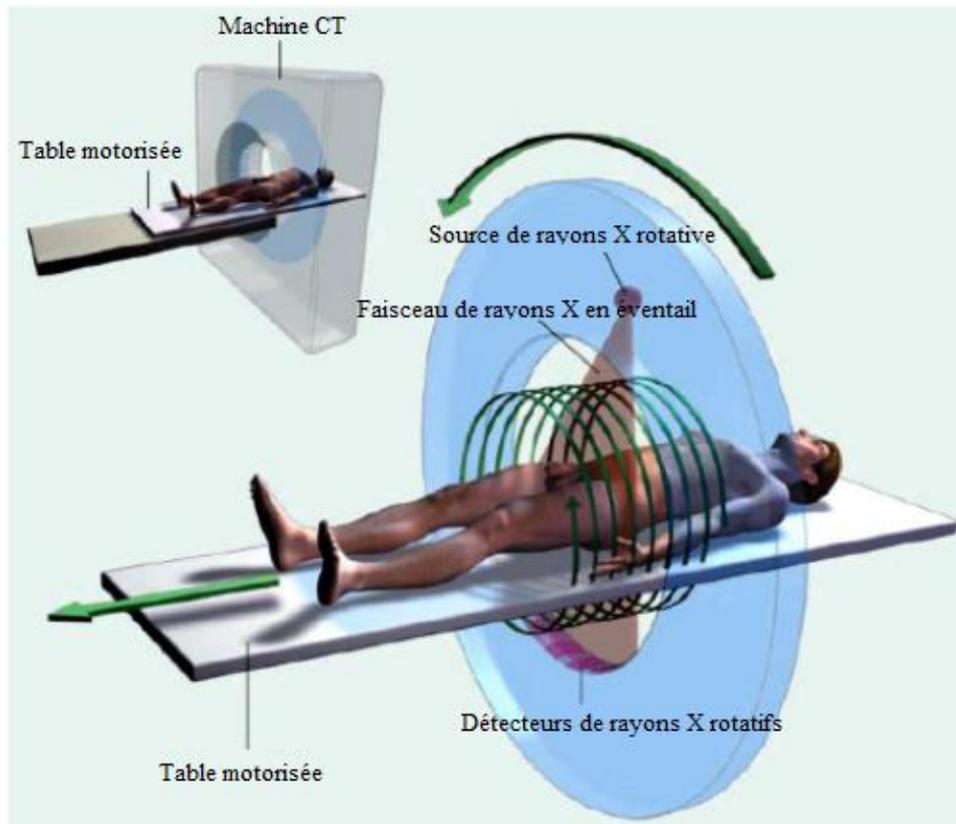


Figure 1: Principe du scanner X [11]

La tomodensitométrie X permet de visualiser les organes du corps humain en 3D, sous forme de coupes, avec une excellente résolution spatiale ($\sim 50 \mu\text{m}$). Elle permet également de visualiser les zones difficilement accessibles aux ultrasons (échographie). Malheureusement, cette technique est handicapée par une faible sensibilité. Elle nécessite pour cela l'utilisation d'un agent de contraste iodé pour augmenter le contraste des tissus mous [12].

Cette technique présente également un autre inconvénient majeur. Elle utilise de rayonnements ionisants qui peuvent se révéler dangereux sur le long terme. A moyen terme, l'exposition aux rayons X limite le nombre d'examens réalisables chez un patient.

1.2.2.1.3. Les agents de contraste pour l'imagerie X

Des éléments ayant des nombres atomiques élevés tels que l'iode, le brome, le baryum, le bismuth et le plomb se sont rapidement avérés utiles pour améliorer le contraste. Ils sont les premiers agents de contraste solubles étudiés dans l'eau. Plus tard, l'iode a été choisi comme l'agent de contraste principal pour l'imagerie X en raison de son numéro atomique élevé ($Z=53$), sa polyvalence chimique et son inertie relative [13]. Les agents de

contraste doivent être pharmacologiquement invisibles, c'est-à-dire qu'ils ne doivent présenter aucune activité pharmacologique dans l'organisme. Leur seul rôle est d'absorber les rayons X. A l'état libre, les ions d'iodure s'avèrent toxiques pour l'organisme [14]. Ils peuvent affecter les reins et la thyroïde. Par contre, ils sont beaucoup mieux tolérés lorsqu'ils sont organiquement liés à des composées hydrophiles.

Les agents de contraste iodés pour l'imagerie X se scindent en deux groupes de produits de contraste iodés : les produits de contraste de haute osmolarité et les produits de contraste de basse osmolarité [15]. Les produits de contraste de haute osmolarité sont des monomères ioniques constitués d'un anion comportant un cycle benzénique associé à un cation (sodium ou méglumine). En milieu aqueux, ces monomères se dissocient en deux parties, d'une part l'anion avec le cycle benzénique et d'autre part le cation. Cette dissociation entraîne donc une augmentation de l'osmolarité qui peut induire en conséquence des réactions sévères [16]. Contrairement aux produits de contraste de haute osmolarité, les produits de contraste de basse osmolarité ont une osmolarité identique ou deux fois supérieure à celle du sang. Il s'agit de monomères non ioniques, ne nécessitant pas la présence du cation sodium, ou de dimères ioniques (2 cycles benzéniques reliés ensemble, chacun portant 3 atomes d'iode). Ils entraînent moins d'effets indésirables liés à l'osmolarité par rapport aux produits de contraste de haute osmolarité. Dans les tableaux 1 et 2, nous avons regroupé les produits de contraste de basse et de haute osmolarité cliniquement utilisés en imagerie X.

Tableau 1: Produits de contraste de basse osmolarité [15]

Nom de spécialité	Quantité d'iode en mg/ml	DCI	Laboratoire
IOMERON	150, 200, 250, 300, 350, 400	ioméprol	BRACCO
IOPAMIRON	200, 300, 370	iopamidol	
OMNIPAQUE	240, 300, 350	iohexol	GE HEALTHCARE
VISIPAQUE	270, 320	iodixanol	
HEXABRIX	200, 320	acide ioxaglique (sel de méglumine et sel de sodium)	GUERBET
OPTIJECT*	240, 300, 350	ioversol	
OPTIRAY	300, 350		
XENETIX	250, 300, 350	iobitridol	
ULTRAVIST	300, 370	iopromide	BAYER

Tableau 2: Produits de contraste de haute osmolarité [15]

Nom de spécialité	Quantité d'iode en mg/ml	DCI	Voie d'administration	Laboratoire
GASTROGRAFINE	370	Amidotriazoate de sodium	Per os ou rectale	BAYER
RADIOSELECTAN URINAIRE ET VASCULAIRE 76 %	370	Acide diatrizoïque (sel de méglumine et sel de sodium)	Injectable	
RADIOSELECTAN URINAIRE 30 %	146			
TELEBRIX 12 SODIUM	120	Acide ioxitalamique	Intra-vésicale	GUERBET
TELEBRIX HYSTERO	250		Voie utérine	
TELEBRIX GASTRO	300		Per os ou rectale	
TELEBRIX 30 MEGLUMINE	300		Injectable	
TELEBRIX 35	350			

Les produits de contraste iodés sont injectés le plus souvent par voie veineuse ou artérielle. Une fois injectés, ils sont alors transportés par le sang jusqu'à l'organe à visualiser. Ils sont aussitôt éliminés de l'organisme par excrétion rénale [17].

1.2.2.2. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale incontournable dans la visualisation des tissus mous et des organes en raison d'une excellente résolution. Elle a été découverte par Lauterbur et Mansfield qui à la suite de leurs travaux sur l'IRM ont obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2003 [18]. Les premiers développements en imagerie par résonance magnétique datent des années 1973 [19]. Aujourd'hui, après 46 ans d'évolution, l'IRM est devenue une technique majeure de l'imagerie médicale moderne largement utilisée en clinique par les médecins dans le diagnostic et le traitement des maladies pathogènes.

Contrairement à la tomodensitométrie X, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est relativement non invasive et sans effets secondaires [20]. Elle permet de fournir des images numériques tridimensionnelles et en coupe de grande précision anatomique des tissus biologiques en s'appuyant sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN) étudié en 1946 par Bloch et Purcell, prix Nobel de physique en 1952 [21]. L'IRM consiste à imager de façon non invasive l'intérieur de l'organisme via les propriétés magnétiques des protons de l'eau majoritairement présents dans les tissus du corps humain (environ 80% du poids du corps) [22].

1.2.2.2.1. Principe de l'IRM

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène permettant d'analyser la structure moléculaire. Le physicien américain Félix BLOCH, en 1946, a exploité la propriété que possèdent les noyaux atomiques, qui se comportent comme des dipôles magnétiques lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique. En l'absence de champ magnétique la résultante des moments magnétiques M des noyaux du sujet étudié est nulle. Dès lors qu'il est soumis à un champ magnétique élevé par exemple 0,5 à 2 Tesla, les moments magnétiques s'alignent suivant deux directions : parallèle ou antiparallèle au champ magnétique appliqué. Les protons du sujet soumis au champ magnétique B_0 tournent sur eux-mêmes, mais également autour du champ B_0 en décrivant un cône dit cône de précession. Si l'on applique une onde radiofréquence B_1 perpendiculaire à B_0 pour exciter les protons, il n'y a plus de déphasage entre les protons, qui vont se mettre à tourner autour de B_1 : les deux systèmes sont alors en résonance. A l'arrêt de l'excitation de la radiofréquence les protons sont de nouveau soumis au champ B_0 et reviennent à leur état fondamental en restituant de l'énergie, c'est la relaxation des spins des protons (Figure 2) [23].

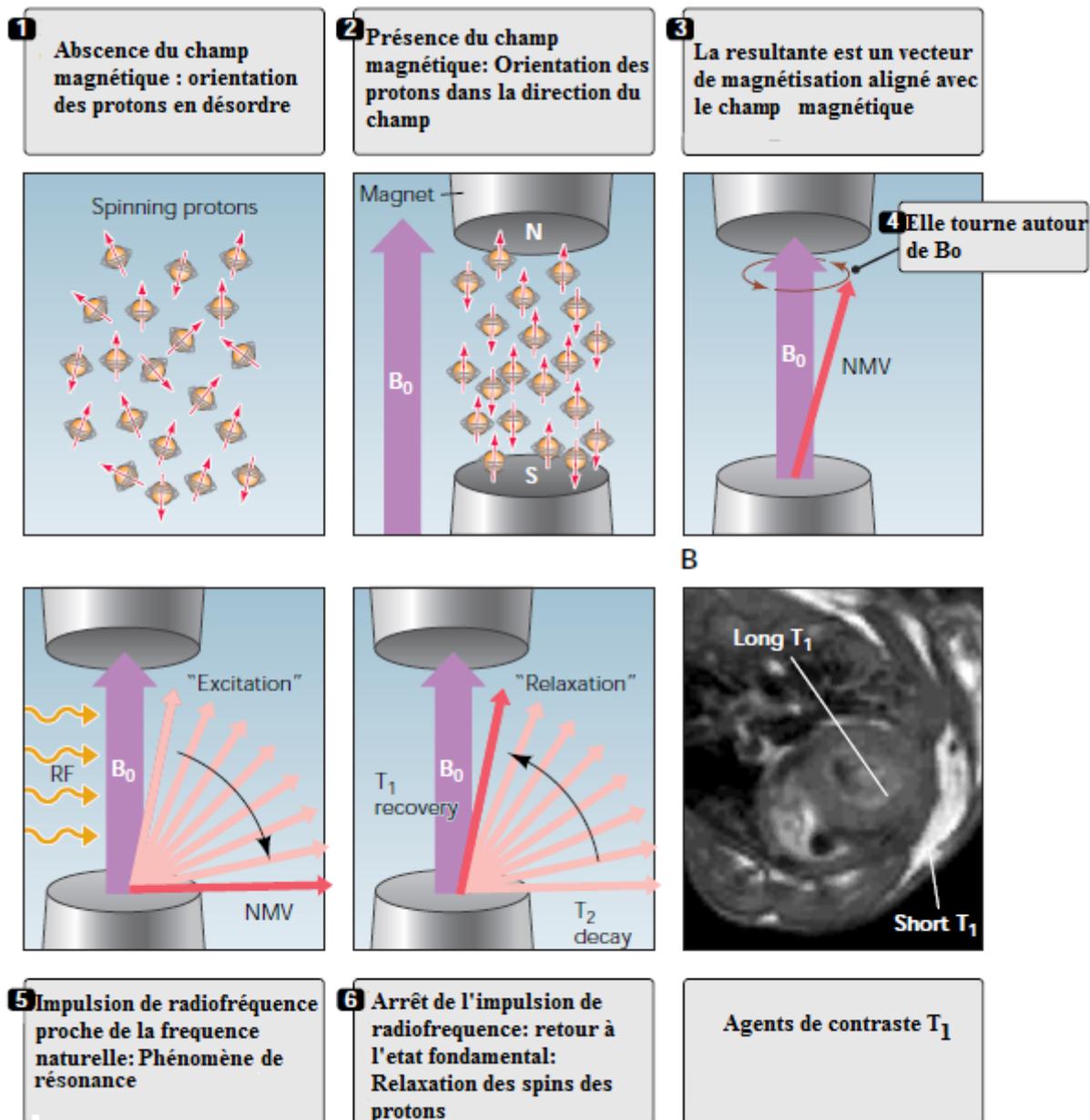


Figure 2: Principe de l'IRM [23].

Il existe deux types de relaxation : la relaxation longitudinale T_1 ou encore relaxation "spin-réseau" et la relaxation transversale T_2 ou encore temps de relaxation "spin-spin". Elle dépend en effet de la mobilité des atomes d'hydrogène ou de celle des molécules dans lesquelles ils sont présents. Le temps T_1 sera d'autant plus court que ces atomes d'hydrogène seront liés à de grosses molécules. Le temps de relaxation T_2 est toujours inférieur au temps de relaxation T_1 . Ils dépendent de la mobilité des noyaux d'hydrogène présent dans les tissus.

En résumé, les temps de relaxation T_1 et T_2 sont des constantes de temps propres à chaque tissu. Ils augmentent avec l'hydratation des tissus et diminuent lorsque cette hydratation diminue. C'est à partir de ce différentiel que l'on peut obtenir deux images de contraste différent des tissus. Ces images sont appelées images pondérées T_1 et T_2 .

En IRM, l'intensité du signal est souvent insuffisante pour permettre d'observer une différence convenable entre les parties saines ou affectées de l'organisme. Une façon d'influencer le signal en IRM est l'amélioration du contraste des images, soit en augmentant le temps de l'examen pour permettre de prendre plus d'acquisitions, ce qui empêche l'utilisation de cette technique d'imagerie pour étudier la biodistribution sur l'ensemble du corps, soit en injectant un agent de contraste qui réagit au champ magnétique.

1.2.2.2.2. Les produits de contraste utilisés en IRM clinique

Depuis le développement de l'imagerie par résonance magnétique, le nombre des agents de contraste utilisés cliniquement en imagerie IRM a augmenté considérablement. Ce sont essentiellement des agents de contrastes de type T_1 , c'est-à-dire des complexes à base de gadolinium. Ils sont injectés par voie intraveineuse et à une dose faible uniquement lorsqu'une imagerie sans agent contraste n'est pas adaptée. L'utilisation d'agent de contraste de type T_1 permet d'améliorer le contraste en IRM mais également de réduire la durée d'examen.

Parmi les produits de contraste à base de gadolinium utilisés en clinique, on distingue deux groupes d'agents de contraste : ceux dont le site de complexation possède une linéaire et ceux de type macrocyclique.

Le ligand linéaire DTPA a été le premier chélateur utilisé pour complexer l'ion gadolinium (III) avec une stabilité thermodynamique et cinétique suffisante pour les applications *in vivo* [24]. Le complexe Gd-DTPA a été le premier agent de contraste testé en clinique chez l'homme. Il a été ensuite commercialisé en 1991 [24]. Les complexes Gd-BOPTA, Gd-EOB-DTPA, Gd-DTPA-BMA et Gd-DTPA-BMEA sont aussi des dérivés du complexe Gd-DTPA utilisée en tant qu'agents de contraste en IRM pour la détection de tumeurs cérébrales et pour l'imagerie du foie (Tableau 3) et (Figure 3) [25]. Récemment des cas de fibrose systémique néphrogénique ont été détectés chez des patients atteints d'insuffisance rénale à la suite de l'administration de MAGNEVIST (Gd-

DTPA) [26]. Le lien de cause à effet n'est pas établi avec certitude mais la présence de l'ion gadolinium a été mise en évidence dans des biopsies cutanées de patients atteints d'une fibrose systémique néphrogénique. Dans une autre étude, des dépôts contenant l'ion gadolinium ont été découverts dans le cerveau d'un patient à la suite de l'administration de MAGNEVIST (Gd-DTPA) [27]. Suite à ces observations, il a été recommandé d'utiliser des produits de contraste de type macrocyclique car ils forment des complexes de gadolinium, plus stables. Ils sont caractérisés par des constantes d'affinité très élevées qui garantissent un relargage plus faible de l'ion gadolinium en milieu *in vivo*.

Tableau 3: Les produits de contraste utilisés cliniquement en IRM [25]

Nom commerciale	Laboratoire	Abreviation	Biodistribution	r_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Dotarem	Guerbet	Gd-DOTA	extracellulaire	4.2
ProHance	Bracco	Gd-HP-DO3A	extracellulaire	4.4
Gadovist	Schering	Gd-BT-DO3A	extracellulaire	5.3
Magnevist	Schering	Gd-DTPA	extracellulaire	4.3
Omniscan	Amersham	Gd-DTPA-BMA	extracellulaire	4.6
OptiMARK	Mallinckrodt	Gd-DTPA-BMEA	extracellulaire / hépatobiliaire	5.2
MultiHance	Bracco	Gd-BOPTA	extracellulaire / hépatobiliaire	6.7
Primovist	Schering	Gd-EOB-DTPA	hépatobiliaire	7.3
Vasovist	EPIX/Schering	MS-325	intravasculaire	19

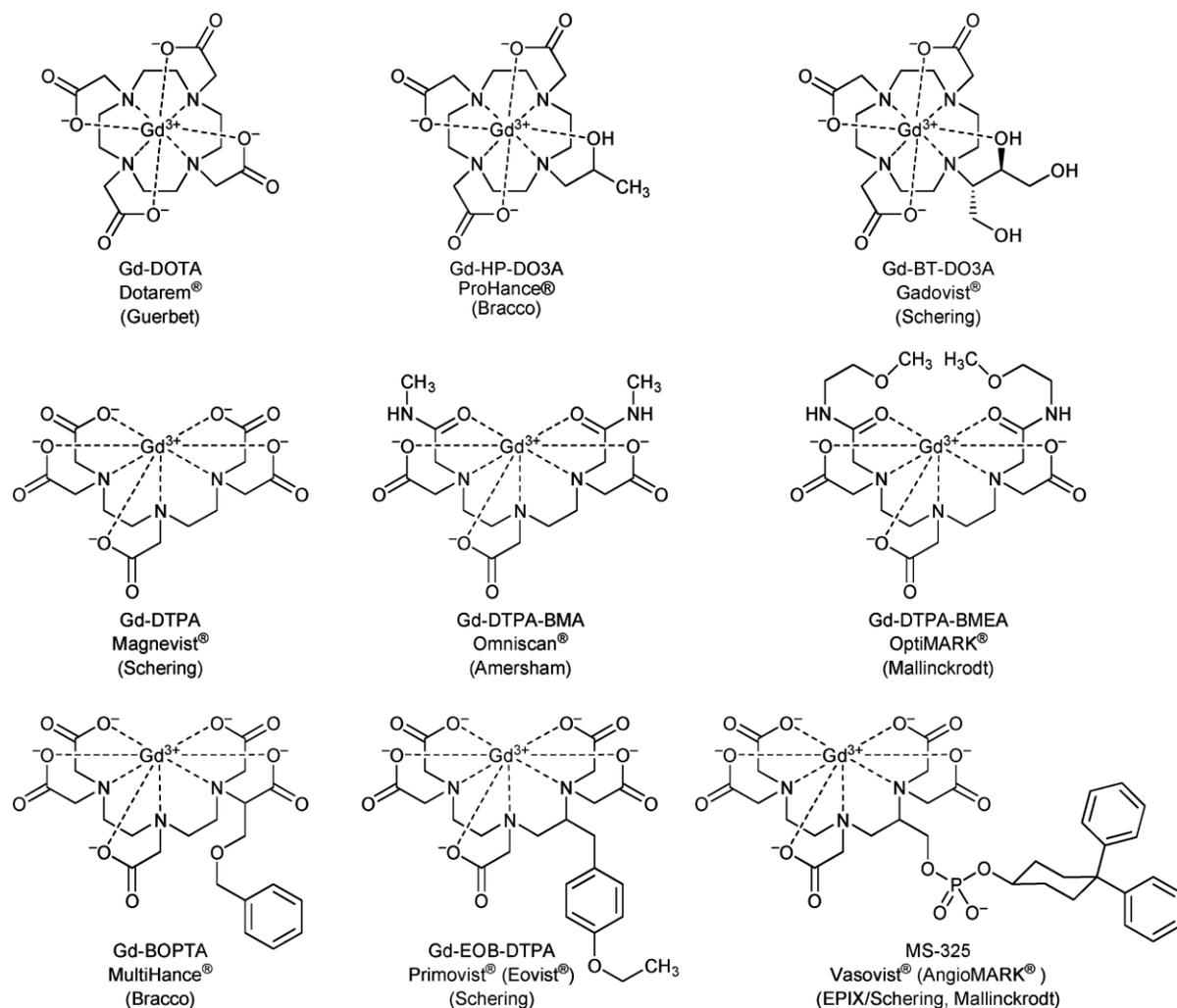


Figure 3: Schéma des complexes de gadolinium utilisés en IRM [25]

1.2.2.3. Imagerie nucléaire (TEMP/TEP)

L'imagerie nucléaire recouvre un ensemble de techniques d'imagerie fonctionnelle qui permettent d'étudier le fonctionnement des organes en administrant au patient, le plus souvent par voie intraveineuse, parfois par ingestion ou inhalation, une molécule qui comprend un noyau radioactif [28]. Cette substance radioactive spécifique appelée radiopharmaceutique possède une affinité particulière pour les organes ou les cellules que l'on souhaite étudier. L'imagerie nucléaire est une modalité d'imagerie que l'on peut qualifier de « biologique » ou de « moléculaire ». Elle permet de visualiser *in vivo*, sous forme d'images, de multiples processus biochimiques et biologiques caractéristiques du vivant à l'échelle cellulaire et moléculaire. Elle regroupe l'ensemble des techniques d'imagerie moléculaire utilisant comme « traceurs » des molécules radiomarquées [29]. On peut scinder l'imagerie nucléaire en deux types de techniques:

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP) (dite aussi SPECT) est une technique d'imagerie nucléaire reposant sur l'émission d'un photon gamma produit lors de la désintégration d'un radioélément fixé à une molécule d'intérêt, tandis que la tomographie par émission de positons (TEP) est basée sur l'émission simultanée de deux photons gamma de 511 KeV dans deux directions diamétralement opposées [30].

1.2.2.3.1. Principe de la tomographie par émission monophotonique

La tomographie monophotonique est une technique d'imagerie nucléaire utilisée pour étudier diverses pathologies. Elle est dite fonctionnelle parce qu'elle permet d'analyser le fonctionnement des organes du corps humain. Elle nécessite l'administration par la voie intraveineuse, par la voie intratumorale ou par inhalation des radiotraceurs émettant un seul photon gamma (Figure 4) [31] [32].

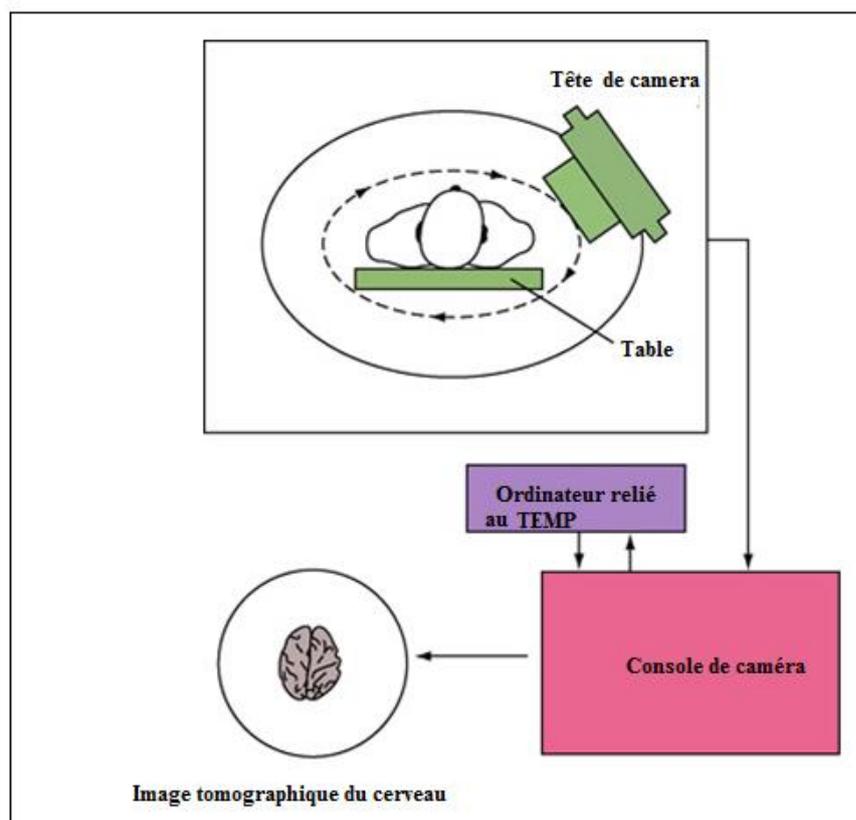


Figure 4: Principe de fonctionnement de la tomographie par émission monophotonique (TEMP) [32].

Un radiotraceur est une substance pharmaceutique utilisée en imagerie médicale. Il se présente sous deux formes : Un radio-isotope seul ou une molécule marquée avec un

isotope radioactif. La molécule (traceur) est choisie pour son affinité pour les organes ou les cellules tandis que le marqueur radioactif permet de localiser le traceur à l'aide d'une caméra tournant autour du patient. Il existe une large gamme de marqueurs utilisés en scintigraphie : l'iode¹²³ (durée de vie 13 heures) [33], l'indium¹¹¹ (durée de vie 67 heures) [34], le technétium⁹⁹ (durée de vie 6 heures) [35] ou le thallium²⁰¹ (durée de vie 73 heures) [36].

La TEMP ou SPECT permet de réaliser des images fonctionnelles avec une excellente sensibilité. Toutefois, elle demeure moins sensible par rapport à la TEP. L'un des principaux inconvénients de la tomographie par émission monophotonique provient de son caractère ionisant mais également de sa faible résolution spatiale. La tendance actuelle consiste à coupler la TEMP à un scanner X pour combiner la grande sensibilité à la l'excellente résolution afin de localiser plus finement les zones d'intérêt (par exemple, les tumeurs).

1.2.2.3.2. Principe de la tomographie par émission de positon

Les premiers appareils de tomographie par émission de positon ont été développés dans les années 1970-1980. A la même période, a été synthétisée la première molécule radiomarquée au fluor-18 (¹⁸F) [37]. La tomographie par émission de positon est une modalité d'imagerie médicale permettant la visualisation en 3D dans un organe, d'une molécule marquée par un radio-isotope. C'est une technique invasive dotée d'une grande sensibilité de l'ordre de 10^{-12} pM [38]. Par comparaison à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la TEP permet d'étudier le fonctionnement et le métabolisme des organes. Elle est dite fonctionnelle. Son principe repose sur l'administration d'un traceur radioactif constitué de deux composantes, un vecteur moléculaire et un isotope radioactif émetteur de positon pour visualiser les organes accumulant de façon excessive le traceur. Caractérisées par un excès de charges positives dans leurs noyaux, ces émetteurs de positons se désintègrent vers un état stable, par une transformation d'un proton en un neutron. Cette transformation s'accompagne de l'émission d'un positon de même masse que l'électron mais de charge électrique opposée. Le positon émis, parcourt un trajet de quelques millimètres dans les tissus humains, tout en perdant son énergie cinétique principalement par des interactions de Coulomb avec des électrons. Quand le positon atteint son niveau d'énergie thermique, il interagit avec un électron du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en

deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions opposées comme on peut le voir dans la figure ci-dessous (Figure 5) [39].

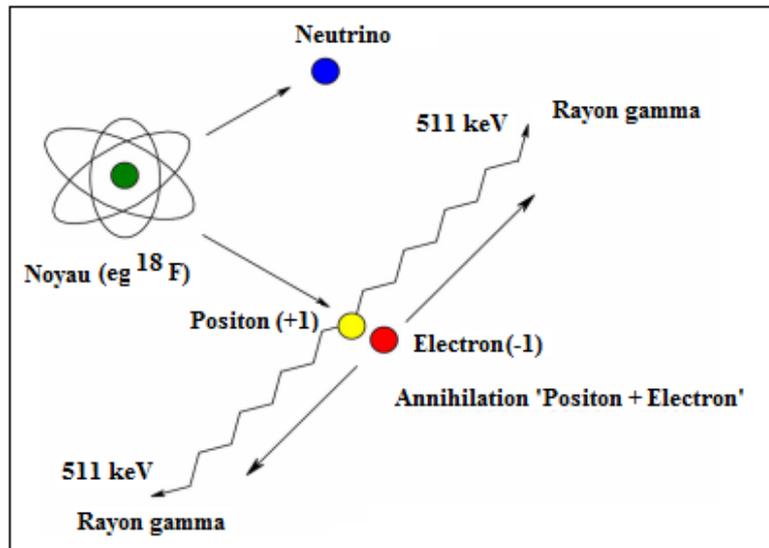


Figure 5: Emission de positon et annihilation [39].

1.2.2.3.3. Les radioéléments

Les radioéléments sont des atomes radioactifs qui ont la propriété d'émettre des rayonnements lors de la désintégration de son noyau. Parmi les radio-isotopes les plus couramment utilisés en imagerie TEMP et TEP, on retrouve des molécules enrichies avec le Fluor-18, Carbone-11, Iode-124, Bromure-76 mais également des radio-métaux véhiculés généralement sous forme de chélates, le cuivre-64, l'indium-111, le technétium-99m, le gallium-68 et le zirconium-89. Nous avons regroupé dans le tableau 4.

Tableau 4: Les principales caractéristiques des émetteurs de positons utilisés en TEP [40]

Radionucléide	T1/2	Désintégration (%)	Energie β (KeV)		Photon principal KeV (%)	Production
			max	min		
⁶⁸ Ga	67,7 min	$\beta+$ (89)	1899	829	511 (178,3)	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga générateur
		EC (11)				
¹⁸ F	109,7 min	$\beta+$ (96,7)	634	245	511 (193,5)	¹⁸ O (p,n) ¹⁸ F
		EC (0,1)				
⁶⁴ Cu	12,7 h	$\beta+$ (17)	653	278	511 (34,8)	⁶⁴ Ni (p,n) ⁶⁴ Cu
		EC (44)				
⁷⁶ Br	16,2 h	$\beta+$ (55)	3941	1180	511 (109); 559 (74)	⁷⁶ Se (p,n) ⁷⁶ Br
		EC (45)			657 (15,9); 1854	⁷⁶ Se (p,n) ⁷⁶ Br
⁸⁶ Y	14,7 h	$\beta+$ (33)	3141	664	511 (63,9); 1077 (82,5)	⁷⁶ Sr (p,n) ⁸⁶ Y
		EC (66)			(82,5)	
⁸⁹ Zr	3,3 d	$\beta+$ (23)	901	397	909 (100)	
		EC (77)				⁸⁹ Y (p,n) ⁸⁹ Zr
¹²⁴ I	4,18 d	$\beta+$ (23)	2138	820	511 (46); 603 (62,9)	¹²⁴ Te (p,n) ¹²⁴ I
		EC (77)			723 (10,3)	¹²⁴ Te (p,n) ¹²⁴ I

Les radio-isotopes utilisés en médecine nucléaire sont principalement choisis selon leurs caractéristiques nucléaires : énergie des rayonnements, durée de vie, dose injectée, mode de production.

L'énergie des rayons émis : en imagerie TEP, l'énergie émis (511 keV) par les deux photons gamma produits par une réaction d'annihilation pour chaque photon peut induire des effets néfastes à la santé des patients. Toutefois, en raison de sa très grande sensibilité (TEP), il est recommandé d'injecter de très faible concentration (de l'ordre de la picomole). Pour l'imagerie SPECT, l'énergie des rayons gamma émis doit être comprise entre 100 et 300 keV afin d'éviter toute risque d'exposition mettant en danger la vie des patients lors de l'examen.

Durée de vie : elle correspond à la durée au bout de laquelle l'activité spécifique du radioélément a diminué de moitié. La durée de vie doit être suffisamment longue (durée de vie 6 heures) pour réaliser des images de qualité optimale. C'est le cas par exemple du technétium-99m qui est le radionucléide le plus utilisé pour les examens cliniques en TEMP. Le technétium-99m possède un temps de demi-vie suffisamment pour réaliser des images de grande qualité. Le zirconium-89 possède également une durée de vie encore plus longue (durée de vie de 78,41 heures) pour permettre de réaliser des images sur plusieurs jours mais son coût de production reste relativement élevé. Néanmoins, les tests

réalisés avec les molécules marquées par le zirconium-89 sont encore au stade de l'étude préclinique.

Dose injectée : La concentration du radiotracteur doit être suffisamment faible (de l'ordre de la picomole) de manière à ne pas perturber le processus biochimique de l'organe étudié.

Mode de production: pour les radio-isotopes à courte durée de vie, la production dans un cyclotron ou par un générateur d'isotope doit avoir lieu à proximité du site d'utilisation de manière à limiter la perte d'activité résultant de la décroissance radioactive lors de l'acheminement.

1.2.2.4. Echographie

1.2.2.4.1. Principe

L'imagerie par ultrasons couramment appelée échographie est une technique d'imagerie médicale qui utilise des ultrasons [40]. Elle a été développée dans les années 50 par des chercheurs britanniques pour l'exploration des tumeurs cérébrales. Actuellement, elle est utilisée principalement en obstétrique [41].

Le principe de fonctionnement de l'échographie repose sur l'émission et la réception d'échos générés par la réflexion des ultrasons par les organes du corps humain. Elle consiste à appliquer une sonde à la fois émettrice et réceptrice au contact de la peau. Cette sonde émet par la suite des ondes ultrasonores de fréquences comprises entre 2 MHz et 10 MHz. Une partie de ces ondes va traverser les organes tandis qu'une autre partie sera réfléchiée en direction du récepteur. L'image de l'écho est obtenue selon l'intensité de l'écho de retour (Figure 6) [42]. Plus le temps de retour de l'échographie est court et moins l'organe à explorer est profond.

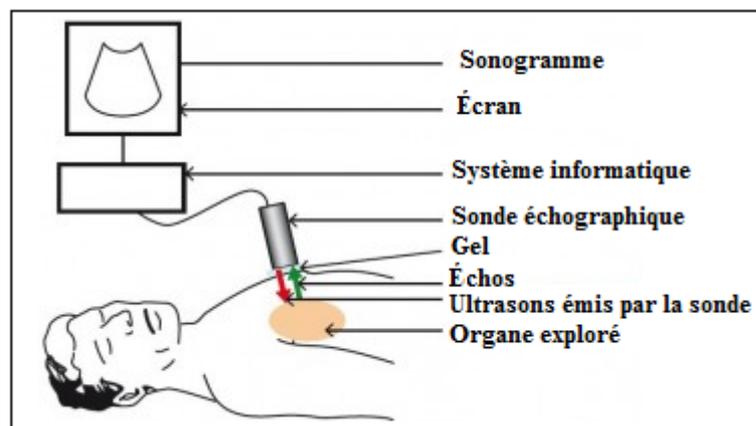


Figure 6: Principe de fonctionnement de l'échographie [43].

L'échographie permet de visualiser les organes de l'abdomen, du cou (thyroïde, ganglions), les organes génitaux, reins, vessie. Elle est également utilisée pour dater et imager le développement du fœtus [43]. L'échographie est mobile, peu coûteuse et sans danger. Elle permet de donner en temps réel des images avec une bonne résolution spatiale.

1.2.2.4.2. Les produits de contraste en échographie

Le développement et la commercialisation des agents de contraste en imagerie par ultrasons sont relativement récents par rapport à ceux des techniques d'imagerie médicale (rayons X, IRM). Ce sont des microbulles de gaz encapsulées dans une fine couche des phospholipides. Le plus souvent, ces microbulles de gaz sont injectées par voie intraveineuse et permettent d'améliorer le contraste entre le sang et le foie avec une fraction de millilitre de la dispersion aqueuse, ce qui se traduit par des quantités inférieures au milligramme du produit de contraste et des microlitres de gaz. L'efficacité des agents de contraste repose sur la rétrodiffusion des ultrasons par des microbulles [44]. Ils offrent les avantages suivants: (a) une très faible dose injectable par voie intraveineuse ; (b) non toxiques; (c) capables de traverser le poumon ; circulations cardiaques et capillaire en raison de leur taille comprise entre 1 et 10 μm ; et enfin (d) stables pour la récirculation. Ils sont fabriqués à partir de matériaux biodégradables naturels ou synthétiques et d'une petite quantité d'un gaz inerte de faible solubilité (perfluorocarbones, azote ou hexafluorure de soufre) [45]. Ils sont relativement inoffensifs pour le patient à la différence des agents de contraste pour rayons X [46]. Une variété d'agents de contraste ultrasonore ont été développés et ont été commercialisés (Tableau 5) [45].

Ces agents ont pour vocation d'améliorer la visualisation de la vascularisation de la tumeur et de délimiter l'ischémie cérébrale.

Tableau 5: Agents de contraste en échographique [45]

Air (azote)	Perfluorocarbhone	Hexafluorure de soufre
Albunex (Mallinckrodt) ^a	BR14 (Bracco)	SonoVue (Bracco) ^e
Echovist (Shering) ^b	Definity (Imagerie médicale Bristol-Myers Squibb)	
Levovist (Shering) ^b	Echogen (Sonus pharmaceutique) ^d	
Myomap (Quadrant) ^a	Imagent-Imavist (Alliance)	
Quantison (Quadrant) ^a	Optison (GE Healthcare)	
Sonavist (Shering) ^c	Sonazoid (GE Healthcare)	

Echovist, Levovist, Optison et SonoVue sont actuellement approuvés et Optison et SonoVue sont commercialisés dans les pays européens. Definity, Imagent et Optison sont approuvés aux Etats-unis pour la cardiologie. Dans les agents remplis de perfluorocarbones, le gaz de remplissage est le perfluorobutane (BR14, Optison et Sonazoid), l'octafluoropropane (Definity) ou le perfluorohexane (Imagent). Levovist, Sonavist, Imagent et Sonazoid présentent une phase tardive pour les hépatocytes et les spléno-spécifiques. Tous les agents présentent une coque phospholipidique sauf pour ^a= coquille d'albumine ; ^b=coquille de galactose; ^c= coque en cyanoacrylate. ^d= agent de déphasage. Emulsion liquide-dans-liquide perflenapent contenant du dodécafluoropentane liquide dans la phase dispersée qui se décale en une phase gazeuse à la température corporelle formant des microbulles de 3-8 µm de diamètre ; ^e= phase spléno-spécifique tardive.

1.2.2.5. Imagerie photoacoustique

1.2.2.5.1. Principe

L'imagerie photoacoustique est une modalité d'imagerie biomédicale combinant l'imagerie optique et les ultrasons [47]. Elle est non invasive. Son principe repose sur l'effet photoacoustique découvert en 1880 par Alexander Graham Bell. Des impulsions laser non-ionisantes sont injectées à l'intérieur de tissus biologiques. Ces impulsions brèves diffusent jusqu'à l'absorption de photons par les tissus. L'absorption provoque une expansion thermoélastique qui produit l'émission d'ultrasons. Ces ondes ultrasonores générées sont alors détectées par un transducteur ultrasonore, puis analysées dans le but de générer des images en 2D ou 3D. Etant donné que la diffusion ultrasonore est faible dans les tissus, la résolution spatiale de l'imagerie photoacoustique varie de 5-300 µm selon la profondeur. L'imagerie photoacoustique est dotée de la sensibilité de techniques optiques. Elle permet de combiner la bonne résolution de l'imagerie ultrasonore à l'excellente sensibilité de l'imagerie optique [48]. Son principal inconvénient réside dans son faible pouvoir de pénétration pour explorer des organes profonds.

1.2.2.5.2 Les produits de contraste pour l'imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique (PAI) est une technique émergente de l'imagerie biomédicale. Elle utilise des signaux ultrasonores comme supports d'information. L'avantage de l'imagerie photoacoustique (PAI) réside dans sa capacité à fournir des informations fonctionnelles de haute résolution [49]. Cependant, l'imagerie photoacoustique (PAI) souffre d'une profondeur de détection limitée et d'un manque d'agent de contraste pour pallier les problèmes liés à la pénétration en profondeur [50]. L'utilisation d'agents de contraste est nécessaire pour améliorer considérablement le contraste des images et pour se rapprocher de la limite de profondeur d'imagerie.

Les agents de contraste pour l'imagerie photoacoustique (PAI) sont choisis pour leur qualité d'absorption de la lumière avec une fenêtre optique [600-900 nm]. Ils peuvent être aussi des agents de contraste pour l'imagerie de fluorescence. Il existe une grande variété d'agents de contraste pour l'imagerie photoacoustique, essentiellement des molécules organiques biocompatibles et ayant une forte capacité d'absorption optique. On parle alors des colorants organiques (Tableau 6) [51]. Parmi ces encres organiques utilisées comme agents de contraste pour l'imagerie photoacoustique, il y a le vert d'indocyanine Green (ICG), le bleu de méthylène, le bleu d'Evans, l'Alexa Fluor ou encore la pyrrolopyrrole cyanine (PPCy-C8).

Ces molécules organiques possèdent une absorption spécifique et donc un fort signal photoacoustique propre pour chacune des molécules. De plus, elles sont facilement éliminées par le système urinaire en raison de leur petite taille [52].

Tableau 6: Agents de contraste photoacoustique [52]

Agent de contraste photoacoustique	Type	Pic d'absorption (nm)	Taille (nm)	Modification	Application	Réf
Vert d'indocyanine	Colorant proche infrarouge	810	<2	Nanotube de carbone, PEG, PEBBLEs	PAT, dans les fantômes de tissus et <i>in vivo</i>	[7,16-19]
Bleue de méthylène	Colorant proche infrarouge	650-700	<2		PAT, dans les fantômes de tissus	[15]
Alexa Fluor 750	Colorant proche infrarouge	750	<2		Multispectrale PAI, <i>in vivo</i>	[8,9]
IRDye 800 CW	Colorant proche infrarouge	750-800	<2	NPR-1	PAS, <i>in vivo</i>	[13]
IRDye 800 - c(KRGDf)	Colorant proche infrarouge	750-790	<2		PAS, <i>in vivo</i>	[20]
Bleu d'evans		550	<2		PAT, <i>in vivo</i>	[10]
PPCy-C8	Colorant proche infrarouge	754-789	<2	Perfluorocarbone	Bimodal PAI-FI <i>in vivo</i>	[21]
Cypate-C18	Colorant proche infrarouge	754-790	<2	Perfluorocarbone	Bimodal PAI-FI <i>in vivo</i>	[21]
Caspase 9	Colorant proche infrarouge	640	<2		PAI, <i>in vivo</i>	[11]
MMP sense™ 680	Colorant proche infrarouge	620,68	<2		PAI, dans les fantômes de tissus	[14]
BHQ3	Quencher	672	<2		PAI, <i>in vitro</i>	[12]
QXL680	Quencher	680	<2		PAI, <i>in vitro</i>	[12]

Contrairement à l'ensemble des techniques d'imagerie médicale présenté dans cette partie, l'imagerie optique de fluorescence est une modalité particulière de ce groupe puisqu'elle n'est pas une technique d'imagerie médicale. Pourtant, cette technique est utilisée aujourd'hui en clinique et, plus particulièrement, par les chirurgiens pour distinguer les régions invisibles à l'œil nu grâce à l'utilisation des marqueurs fluorescents. A la suite de ce bref rappel, nous présenterons la technique d'imagerie optique basée sur la fluorescence ainsi que les différents marqueurs fluorescents existants.

1.2.2.6. Imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une technique d'imagerie basée sur la détection d'une source fluorescente suite à une excitation lumineuse à une longueur d'onde donnée. Elle permet d'observer les tissus biologiques de l'organisme à l'aide d'un marqueur fluorescent [52]. C'est une technique très utilisée par les biologistes pour suivre l'évolution en temps réel d'une cellule ou d'un agent pathogène. Elle est généralement non invasive [52].

1.2.2.6.1. Principe

Le principe de la fluorescence est basé sur le passage d'un électron d'un état fondamental à un état excité suite à l'énergie fournie par un photon incident : c'est l'absorption. Par la suite, l'électron instable restitue l'énergie sous différentes formes (radiation, conversion interne, etc.) avant de retourner à son état fondamental. Cette étape s'accompagne par l'émission d'énergie sous forme d'un photon lumineux : c'est la fluorescence. Ainsi, le photon émis est moins énergétique que le photon incident et sa longueur d'onde est plus grande que celle du photon incident (Figure 7).

$$E = hc / \lambda \text{ avec } c = 299\,792\,458 \text{ m/s}$$
$$h = 6,626\,17 \times 10^{-34} \text{ J.s}$$

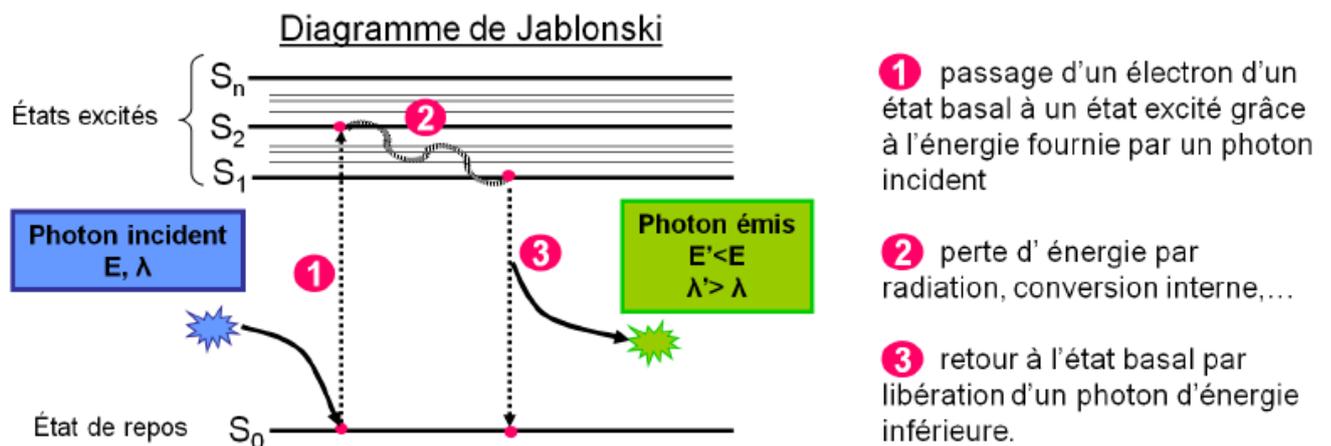


Figure 7: Principe de la fluorescence

La principale limitation de l'imagerie de fluorescence provient de la fluorescence naturelle des composants biologiques qui vient perturber le signal émis par les molécules

fluorescentes. La tendance actuelle consiste à utiliser de la lumière proche infrarouge pour s'affranchir de la perturbation de la fluorescence naturelle [53]. En effet, sous lumière proche infrarouge, la fluorescence naturelle des composants biologiques est faible. Ce qui permet d'améliorer la détection des cibles biologiques. En outre, elle présente une grande pénétration dans ce domaine de longueur d'onde.

1.2.2.6.2. Les sondes fluorescentes et luminescentes

L'utilisation des marqueurs fluorescents ou des complexes luminescents permet d'améliorer le contraste parfois faible entre les cibles biologiques et les tissus environnants [53]. Ces sondes fluorescentes sont susceptibles d'apporter éventuellement des informations utiles des régions explorées. Ils peuvent également être employés pour marquer des cibles d'intérêt telles que les cellules cancéreuses. Cependant on distingue deux grandes variétés de traceurs :

- ✓ Les fluorophores organiques
- ✓ Les fluorophores inorganiques

Les fluorophores organiques sont des molécules organiques fluorescentes tandis que les fluorophores inorganiques sont souvent des complexes de lanthanides luminescents.

1.2.2.6.2.1. Les traceurs fluorescents organiques

Le développement de la microscopie de fluorescence a conduit à l'utilisation des fluorophores organiques en biologie. En effet, les fluorophores organiques ou les colorants organiques sont des molécules qui émettent de la lumière après excitation. Ils sont souvent composés de plusieurs noyaux aromatiques et présentent plusieurs liaisons π fortement délocalisées. Les fluorophores possèdent des bandes d'absorption fines et d'émission très larges et qui se chevauchent en raison du faible décalage de Stokes ce qui peut engendrer des contaminations dues à la source d'excitation (confusion entre le signal dû à l'émission et celui de l'excitation).

Les fluorophores organiques possèdent une grande stabilité chimique associée à des propriétés spectrales remarquable. De plus, elles sont stables à pH physiologique et sont donc très intéressants pour les applications *in vivo* en raison leur brillance élevée [54]. Ils peuvent être synthétisés de façon à émettre différentes longueurs d'onde d'émission. Par exemple, la cyanine 5.5 émet à 680 nm pour une excitation à 630 nm [55] ; la Rhodamine 6G émet à 552 nm pour une excitation à 354 nm [56] ; la fluorescéine émet à 518 nm

pour une excitation 494 nm [57]; etc. Les cyanine5 et 7 sont les plus couramment utilisées pour les applications *in vivo* (Figure 8) [58].

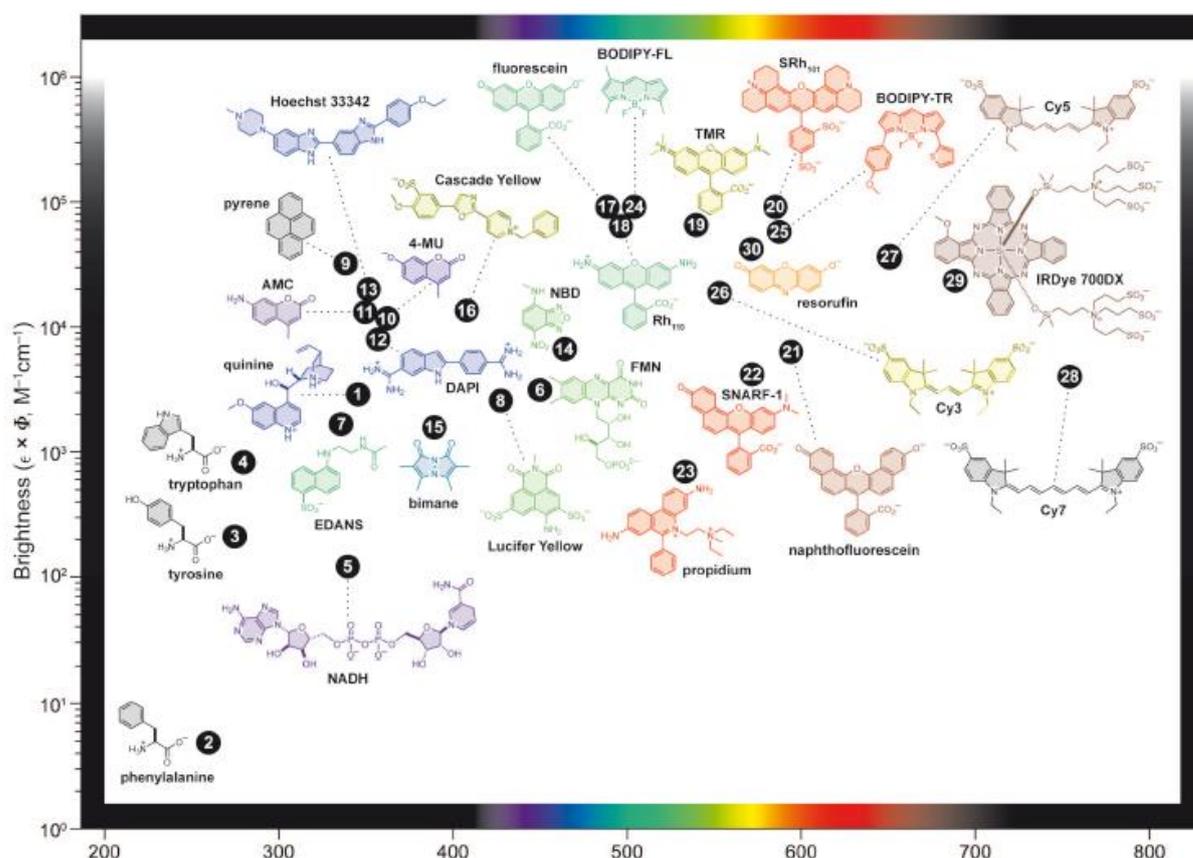


Figure 8: Les différents fluorophores organiques utilisés en imagerie de fluorescence [59].

Néanmoins, la principale limitation de ces sondes fluorescentes est le photoblanchiment [59]. Le photoblanchiment est la perte de fluorescence au cours de l'exposition à la lumière excitatrice. Elle se traduit par une diminution rapide de la luminescence du fait de la photodégradation des fluorophores en présence d'oxygène. Ce qui pénalise leur utilisation à long terme en imagerie *in vivo* en tant que marqueur fluorescent. Il est donc préférable d'utiliser d'autres fluorophores qui présentent une meilleure photostabilité.

1.2.2.6.2.2. Les traceurs fluorescents inorganique

Les lanthanides appartiennent à la famille des terres rares. Ils sont au nombre de 15 éléments, représentés en couleur jaune dans le tableau périodique de la figure 9 [60]. Ce sont les éléments du bloc f et sont situés à la sixième ligne du tableau périodique en allant du lanthane ($Z = 57$), de configuration $[Xe] 4f^0 5d^1 6s^2$ au lutécium ($Z = 71$) de configuration $[Xe] 4f^{14} 6s^2$. Ainsi, la perte d'un électron 4f et des deux électrons 6s

conduit à la formation de l'ion lanthanide de degré d'oxydation (III). Ces ions lanthanides trivalents notés de façon générique Ln(III) ou (Ln³⁺) sont très connus pour leur photostabilité remarquable mais également pour leurs propriétés de physico-chimiques intéressantes pour les applications médicales.

H																	He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Uun	Uuu	Uub							
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

Figure 9: Tableau périodique des éléments (en couleur jaune, les lanthanides) [61].

Les ions lanthanides sont caractérisés par des bandes d'émission relativement fines, allant du visible au proche infrarouge (Figure 10) [61]. Certains de ces ions émettent dans le visible tandis que d'autres émettent dans le proche infrarouge (Figure 10) [61]. Il est donc possible de choisir l'ion lanthanide selon la longueur d'onde d'absorption et d'émission souhaitée. De plus, les lanthanides présentent un grand décalage de Stokes, c'est-à-dire une grande différence de longueur d'onde entre celle d'absorption et celle d'émission. Ce qui permet de distinguer le signal dû à l'émission de celui de l'excitation. Ces caractéristiques remarquables font des ions lanthanides comme sondes d'imagerie prometteuse pour une application médicale.

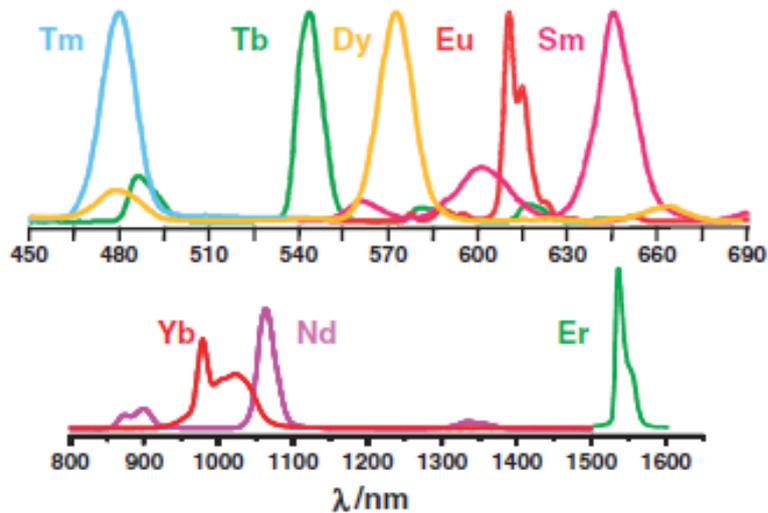


Figure 10: Spectre d'émission des ions lanthanides [62].

De plus, ils sont phosphorescents et leur temps de vie de luminescence est significativement plus long (de l'ordre de la milliseconde pour Eu (III) et Tb (III)) comparé au temps de vie des fluorophores organiques (de l'ordre de la nanoseconde). Ainsi, l'utilisation des ions lanthanide en imagerie présente l'avantage de s'affranchir des phénomènes d'autofluorescence du milieu biologique en utilisant la méthode de luminescence en temps résolu (Figure 11).

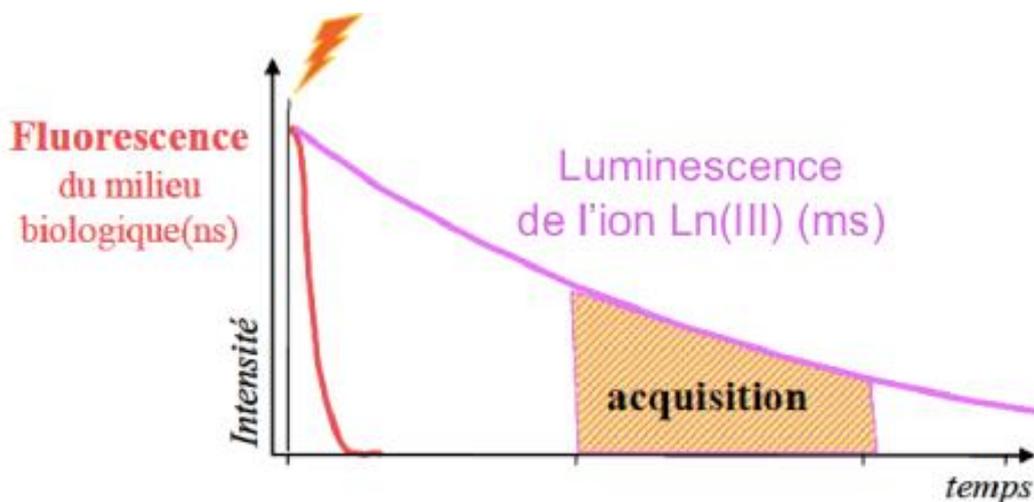


Figure 11: Principe de la luminescence en temps résolu.

Malgré leur potentiel remarquable pour une application en imagerie, les ions lanthanide présentent des inconvénients tels qu'une toxicité élevée, une excitation de certains ions comme l'euprium dans le domaine du proche UV et une faible intensité d'émission.

Afin de bénéficier de ces avantages, il est nécessaire de les incorporer dans des complexes métalliques afin d'éviter tout risque de relargage dans l'organisme. Le choix du complexe est très important. Il doit posséder une antenne organique permettant l'amplification de l'intensité de fluorescence. Actuellement, les marqueurs luminescents sont utilisés dans les applications *in vitro et in vivo*. On peut distinguer deux types de marqueurs luminescents utilisés pour l'imagerie par fluorescence en temps résolu : les complexes de lanthanide à base d'ions (Eu(III) ou Tb(III)) émettant principalement dans le visible et ceux à base d'ion du Yb(III) émettant principalement dans l'infrarouge.

Pour pallier les inconvénients des ions lanthanides, des nouveaux systèmes ont été développés : D'abord, l'effet antenne par absorption d'un photon. Elle présente l'avantage d'amplifier l'intensité du signal mais ne permet pas un grand déplacement de la longueur d'onde. Les nanoparticules à conversion ascendante d'énergie (UCNPs) ont également été proposées comme une alternative en raison de leurs caractéristiques uniques liées au phénomène d'upconversion : Emission visible obtenue sous excitation dans le proche infrarouge (NIR), une meilleure pénétration dans les tissus biologiques et un faible taux d'autofluorescence.

1.2.3. La combinaison des différentes imageries

Les modalités d'imagerie CT et IRM permettent la visualisation des tissus mous de l'organisme avec une très bonne résolution mais une faible sensibilité, tandis que les techniques d'imagerie nucléaire révèlent le fonctionnement de tissus avec une excellente sensibilité mais une résolution de mauvaise qualité (Tableau 7) [62].

Tableau 7: Comparaison des différentes modalités d'imagerie [63].

Modalité	Sensibilité	Profondeur de pénétration	Resolution spatiale	Avantages	Inconvénients
Ultrasons	Modérée	Faible	1 mm	Largement disponible; peu coûteux; pas de rayonnement ionisant; imagerie en temps réel.	Sondes moléculaires limitées; petit champ de vision; dépendant de l'opérateur
Imagerie IRM	Modérée	Sans limite	< 1-3 mm ³	Aucun rayonnement ionisant; haute résolution spatiale.	Sensibilité aux artefacts de mouvement; sondes moléculaires limitées; non compatible pour les patients ayant des implants métalliques ou une insuffisance rénale; longues durées d'imagerie.
Imagerie SPECT	Haute	Sans limite	~5-8 mm ³	Haute sensibilité; plusieurs radiotraceurs disponibles pour l'imagerie moléculaire;	Exposition aux rayonnements ionisants; atténuation des photons à basse énergie
Imagerie PET	Haute	Sans limite	~ 3-5 mm ³	Haute sensibilité; méthodes établies pour la correction d'atténuation; quantification précise et précise	Exposition aux rayonnements ionisants; besoin d'un cyclotron ou d'un générateur sur site; radiochimie avancée
Imagerie CT	Limitée	Faible	< 1-3 mm ³	Une résolution spatiale élevée peut être combinée avec d'autres modalités (PET / SPECT).	Exposition aux rayonnements ionisants; sensibilité du patient aux agents de contraste iodés
La tomographie en cohérence optique	Haute	Faible	10-20 µm	Imagerie intravasculaire à haute résolution; imagerie de la plaque supérieure.	Cathétérisme requis; faible profondeur de pénétration

Le couplage la CT et l'IRM avec l'imagerie nucléaire est possible pour permettre un diagnostic plus fiable des pathologies telles que le cancer et une visualisation plus fine des volumes de tissu affecté. Elle se traduit par une complémentarité parfaite combinant l'excellente résolution spatiale (IRM, CT) et la haute sensibilité (TEP, TEMP, Optique). Cette nouvelle approche consistant à combiner les avantages de chacune des modalités d'imagerie médicale conduit à l'obtention d'images des tissus mous avec une excellente résolution spatiale et une bonne sensibilité. Différentes combinaisons d'imagerie ont été développées pour effectuer un examen médical complet. Les combinaisons bimodales du type IRM/Optique, TEMP/CT, TEP/CT et IRM/TEP comptent parmi les plus intéressantes [6]. La mise en œuvre de ces combinaisons peut nécessiter l'administration aux patients de sondes bimodales détectables par les deux techniques d'imagerie.

L'imagerie par résonance magnétique couplée à l'imagerie optique (IRM/Optique) est un système bimodal très utilisé en recherche préclinique. Elle offre la possibilité d'associer l'excellente résolution des images obtenue par l'IRM à la haute sensibilité des sondes optiques. Pour cela, elle nécessite des agents d'imagerie bimodale permettant la réalisation simultanée des images (IRM et optique). Les premiers agents d'imagerie bimodale (IRM/Optique) ont été développés par le groupe de Weissleder, en 2002. Dans cette étude, le groupe de Weissleder a choisi de travailler avec des nanoparticules d'oxyde de fer CLIO comme étant une sonde IRM. Celle-ci a été fonctionnalisée par des fonctions amines pour permettre l'accrochage par une liaison peptidique, d'une sonde fluorescente (l'indocyanate Cy5.5) absorbant dans le proche infrarouge [63].

Le dispositif (TEMP/CT) a également permis de combiner l'excellente résolution spatiale du CT à l'excellente sensibilité de la tomographie par émission monophotonique (TEMP). Malheureusement, la double irradiation provenant de l'utilisation du radiotracer (TEMP) et des rayons X du scanner CT constitue un frein au développement d'imageur intégré TEMP/CT au profit de la combinaison (IRM/TEP) [64]. Cette dernière est bien supérieure à la combinaison (TEP/CT), en termes de différence de contraste et de résolution. La combinaison (IRM/TEP) associe l'excellente résolution spatiale de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) à la haute sensibilité de la tomographie par émission de positrons (TEP). D'autre part, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a l'avantage d'être non

invasive alors que la tomographie par émission de positon (TEP) est minimalement invasive. La faible dose du radiotracer est largement suffisante pour explorer le fonctionnement des organes [65].

L'IRM et la TEP sont deux techniques d'imagerie complémentaires. L'association de ces deux techniques dans un seul appareil est un défi de taille en raison des interférences entre les deux appareils qu'ont tenté de relever les partenaires académiques et industriels du projet IMAPPI.

1.3. L'imagerie simultanée IRM/TEP

1.3.1. Le projet IMAPPI

L'objectif du projet IMAPPI (Integrated Magnetic resonance And Positron emission tomography in Preclinical Imaging) est le développement d'un prototype d'appareil d'imagerie médicale intégrant deux techniques d'imagerie dans un seul dispositif [66]. Il associe les technologies de résonance magnétique (IRM) et de la tomographie par émission de positons (TEP). Ce projet qui s'est vu octroyer un financement de 7,3 millions d'euros, s'inscrit dans le cadre d'un programme d'investissement d'avenir lancé en 2011 par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour équiper l'ensemble du territoire français d'équipements scientifiques d'excellence. Ce projet coordonné par les professeurs François Brunotte et Alexandre Cochet comporte trois phases pour permettre le développement du prototype intégrant complètement l'IRM et la TEP.

Elle comporte le développement de l'appareillage intégrant IRM/TEP installé au Centre George François Leclerc de Dijon. En parallèle, les équipes de recherche de Dijon (ICMUB) et (ICB) et notre équipe (NCM) de l'institut UTINAM ont œuvré au développement de sondes moléculaires et particulières détectables par les deux techniques d'imagerie réunies en un seul système intégré. La validation du prototype IRM/TEP a également nécessité le développement de modèles animaux permettant la réalisation des tests précliniques. Actuellement, le dispositif est disponible pour réaliser les tests d'imagerie pour les applications *in vivo* sur petit animal (souris, rats).

1.3.1.1. L'imageur intégré IRM/TEP

Avant le développement de prototypes intégrés (IRM/TEP), le suivi des sondes combinant IRM et TEP était réalisé par IRM et par TEP mais de manière séparée. Les images IRM étaient acquises sur un groupe d'animaux après administration de la sonde alors que les images TEP étaient acquises avec un autre imageur sur un autre groupe d'animaux après administration de la même dose de nanosonde. En d'autres termes, le suivi d'une sonde donnée était réalisé avec des imageurs différents et des animaux différents. Cette façon d'étudier le suivi des sondes dédiées IRM/TEP a rendu le croisement des données contestables. Afin de s'affranchir de ces limitations, il a semblé indispensable de développer un système intégrant une imagerie simultanée IRM/TEP. Un tel système permettra la réalisation simultanée des examens par les deux techniques sans déplacement du patient. Il permettra également de réduire les délais entre les acquisitions.

L'association de ces deux techniques dans un seul appareil constitue cependant un défi technologique en raison notamment des interférences entre les deux appareils. En effet, les champs magnétiques de l'imagerie par résonance magnétique IRM perturbent les photomultiplicateurs de la tomographie par émission de positron TEP et inversement l'électronique de la TEP perturbe les acquisitions de l'IRM.

La compréhension liée aux problèmes d'interférences a permis finalement le développement d'un imageur intégrant les deux appareils sur une seule machine. En effet, un photomultiplicateur de la TEP insensible aux champs magnétiques de l'IRM a été développé pour permettre d'atténuer les interférences entre les deux machines. Un tel système a permis de construire un imageur censé permettre une imagerie simultanée avec une seule injection, un seul animal et un seul appareil combinant IRM/TEP (Figure 12) [67].



Figure 12 : Imageur IRM/TEP intégré [67].

1.3.1.2. Le développement de sondes (IRM/TEP)

L'imagerie hybride IRM/TEP se distingue par une excellente résolution de contraste des tissus mous combiné à la haute sensibilité de l'imagerie TEP. La conception de ce prototype hybride constitue une percée technologique pour les études précliniques et pour le diagnostic précoce de diverses pathologies.

La combinaison des deux techniques d'imagerie implique le développement de sondes pour l'imagerie bimodale IRM/TEP afin d'exploiter les avantages de chacune des techniques.

1.4. Le développement de sonde pour l'imagerie multimodale IRM/TEP

1.4.1. Principe général

L'imagerie multimodale a le potentiel de dépasser les limites d'une modalité d'imagerie, en combinant au moins deux modalités d'imagerie. Ces modalités incluent l'IRM, le scanner X, la TEMP, la TEP et l'imagerie optique. Elles fournissent des informations anatomiques et fonctionnelles complémentaires sur un même sujet.

Elle nécessite le développement de sondes multimodales qui permettraient de tirer parti de l'excellente résolution et de la haute sensibilité qui découleraient de la

combinaison de plusieurs modalités d'imagerie. Ces nouvelles sondes sont conçues pour établir un meilleur diagnostic avec l'objectif d'une prise en charge plus précoce de diverses pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives. Associées à des agents thérapeutiques, ces sondes multimodales permettraient d'étudier avec une plus grande fiabilité, leur biodistribution et la pharmacocinétique. En outre, elles pourraient être utiles pour guider la thérapie par imagerie.

1.4.2. Agents d'imagerie IRM/TEP

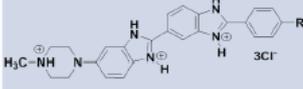
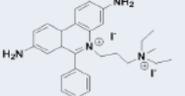
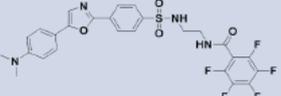
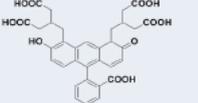
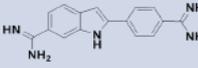
L'émergence récente de l'imagerie bimodale et plus précisément de la combinaison IRM/TEP a suscité un vif engouement au sein de la communauté scientifique. Pour profiter des avantages prometteurs de la combinaison IRM/TEP, des agents d'imagerie à double modalité d'imagerie ont été développés en exploitant le potentiel et la richesse de la chimie moléculaire et/ou des nanosciences et nanotechnologies. Les stratégies mises en œuvre pour développer des sondes pour l'imagerie multimodale reposent essentiellement sur la synthèse moléculaire de plateformes portant plusieurs fonctionnalités (une pour chaque type d'imagerie et un site réactif pour le greffage de ces sondes sur différents objets) et sur la synthèse de nanoparticules dont le caractère multifonctionnel qui les caractérise est parfaitement adapté pour la conception de sondes pour l'imagerie multimodale. En outre, l'élaboration de ces nanosondes peut bénéficier du développement des sondes moléculaires qui peuvent entrer dans la conception de ces nanosondes.

1.4.2.1. Agents moléculaire d'imagerie

1.4.2.1.1. Généralités

Dans l'optique d'obtenir des informations fiables et précises, de nombreuses sondes moléculaires ont vu le jour pour différentes modalités d'imagerie dont l'imagerie optique. Les sondes fluorescentes ont été parmi les premières à être utilisées en tant que marqueur d'ADN (Tableau 8). Elles permettent, entre autres, d'imager les compartiments cellulaires.

Tableau 8: Les sondes fluorescentes pour le marquage d'ADN

Sonde fluorescente	Nom	Cible
	Hoechst 33258	Noyau et ADN $\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 470 \text{ nm}$
	Iodure de propidium	Noyau et cellules mortes $\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 660 \text{ nm}$
	ER-tracker™ blue-white DPX	Réticulum endoplasmique $\lambda_{\text{excitation}} = 374, 504, 587 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 430, 511, 615 \text{ nm}$
	Calcéine	Marqueur de cellules vivantes $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$
	Dapi	Marqueur du noyau $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$
	8-di-anepps	Marqueur des membranes de la cellule et des lipides $\lambda_{\text{excitation}} = 498 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 713 \text{ nm}$

Bien que l'utilisation des sondes moléculaires pour l'imagerie de fluorescence soit très répandue, d'autres techniques d'imagerie faisant appel à d'autres sondes moléculaires ont été mises au point. Parmi elles, on peut citer l'imagerie nucléaire. La tomographie par émission de positon dont l'usage est de plus en plus répandue en clinique (diagnostic, suivi de traitement) et en recherche (études précliniques dans le cadre du développement d'agents d'imagerie et/ou thérapeutiques et de la compréhension à l'échelle moléculaire de phénomènes biologiques) repose sur des molécules préalablement marquées par des radionucléides émetteurs de positons. Par exemple, le glucose marqué au fluor-18 (^{18}F -fluorodésoxyglucose ou ^{18}F -FDG) est un traceur très utilisée en clinique, (Tableau 9) [67] [68].

Tableau 9: Principaux radiotraceurs utilisés en imagerie TEP [68]

Radiotracteur	Processus	Localisation
^{18}F -FDG	Métabolisme du glucose	Lymphomes, voies digestives, tête et cou, gynécologiques, poumon...
^{11}C -Choline ^{18}F -Choline	Synthèse des membranes cellulaires	Cerveau, prostate, poumon
^{68}Ga -DOTATATE ^{68}Ga -DOTATOC	Récepteur de la somatostatine	Tumeurs neuro endocrines
^{18}F -FES	Récepteurs aux oestrogènes	Sein
^{18}F -FLT	Prolifération (Synthèse d'ADN)	Poumon, sein, colon, cerveau, oesophage
^{11}C -Méthionine	Métabolisme des protéines (Acides aminés)	Poumon, sein, colon, système nerveux central
^{18}F -MISO ^{18}F -AZA	Hypoxie	Tête et cou, poumon, tissus mous, cerveau

D'autres radiotraceurs utilisés en TEMP ont été aussi commercialisés pour détecter les maladies artérielles par perfusion myocardique ou pour la localisation des tumeurs neuroblastiques (Figure 13) [69].

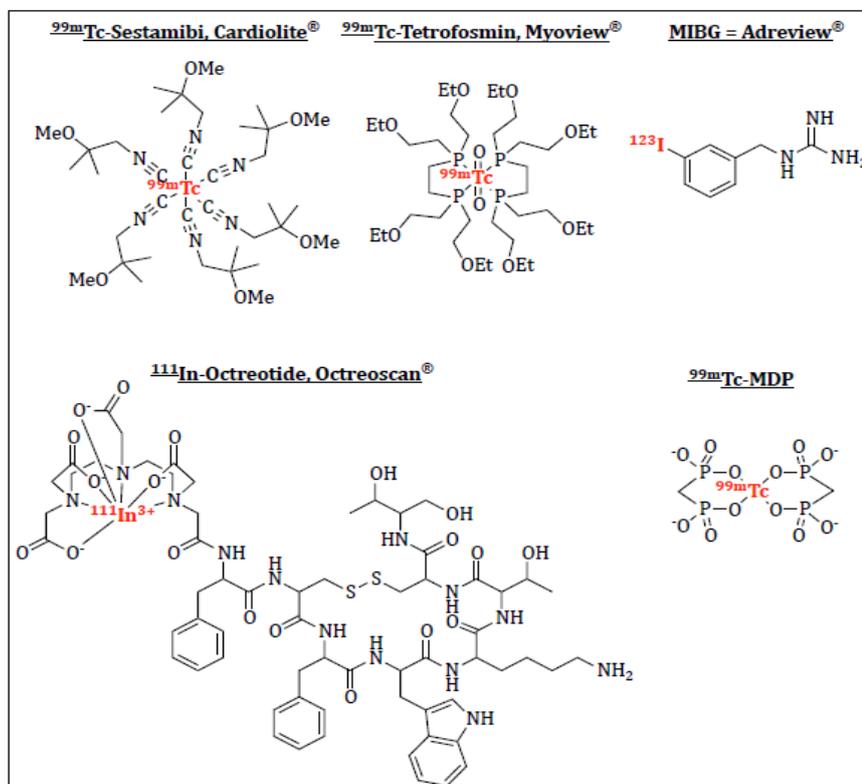


Figure 13: Les différents radiotraceurs utilisés en TEMP [70].

En raison de la faible sensibilité, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) nécessite l'administration d'agents de contraste pour améliorer la visualisation des tissus mous de l'organisme. Les agents de contraste utilisés en clinique sont des chélates de gadolinium. Ils sont injectés le plus souvent par voie intraveineuse ou orale.

1.4.2.1.2. Agent de contraste IRM

Un agent de contraste IRM est une substance chimique injectable dont le rôle est d'améliorer le contraste et donc la lecture des images acquises par imagerie de résonance magnétique (IRM). Son mode d'action consiste à raccourcir le temps de relaxation T_i ($i=1$ ou 2), c'est-à-dire le temps pendant lequel les spins des protons regagnent leur état initial après excitation par l'onde de radiofréquence. Cela a pour conséquence une amélioration du contraste du signal par IRM. Il est important de rappeler que ce n'est pas l'agent de contraste qui est visualisé en IRM mais son influence sur la relaxation des protons de l'eau située autour de l'agent de contraste. La capacité des agents de contraste à accélérer ainsi les vitesses de relaxation $1/T_1$ et $1/T_2$ des protons de l'eau est mesurée par une grandeur appelée la relaxivité d'unité $s^{-1}.mM^{-1}$. On définit la relaxivité (r) d'un agent de contraste comme la vitesse de relaxation, normalisée par la concentration de l'agent de contraste (Figure 14) [70].

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_i^0} + r_i[CA] \text{ avec } i=1,2$$

Figure 14: Equation de la relaxivité de l'agent de contraste en IRM [71].

Ce paramètre indique l'efficacité de l'agent de contraste à rehausser le contraste. Plus la relaxivité est élevée, meilleur est le contraste. Elle varie linéairement avec la concentration en agent de contraste. Elle dépend également de la température et du champ magnétique. Pour améliorer le contraste, il est possible de jouer sur le temps de relaxation longitudinale (T_1) ou sur le temps de relaxation transversale (T_2). Comme le mode d'action, conduisant au raccourcissement de T_1 et de T_2 , sont différents, on distingue deux types d'agents de contraste:

- ✓ Les agents de contraste paramagnétiques qui sont essentiellement constitués de complexes de gadolinium(III).
- ✓ Les agents de contraste superparamagnétique dont les particules d'oxyde de fer (SPIO, USPIO) sont les principaux représentants.

1.4.2.1.2.1. Les agents de contraste paramagnétiques (positifs)

Au même titre que les protons, les électrons possèdent un moment magnétique μ que l'on appelle spin électronique. Le mouvement des électrons autour du noyau crée un moment magnétique non nul lorsqu'une partie de ces électrons est non appariée. On dit que les ions possédant une telle configuration électronique sont paramagnétiques. Au repos, les moments magnétiques de ces ions sont orientés aléatoirement. Dès lors qu'un champ magnétique extérieur B_0 est appliqué, les moments magnétiques s'orientent dans la direction du champ magnétique B_0 . On parle alors d'aimantation. Les ions paramagnétiques les plus cités dans la littérature en raison de leurs temps de relaxation longs (de l'ordre de nanoseconde) sont les ions gadolinium (III), fer (III), manganèse (II) et chrome (III) (tableau 10) [71]. Des lors que ces agents de contraste sont introduits dans l'organisme humain. Leurs moments magnétiques électroniques influencent les moments nucléaires des protons des molécules d'eau, ce qui induit un raccourcissement des temps de relaxation T_1 et ou T_2 des protons (Figure 15) [72].

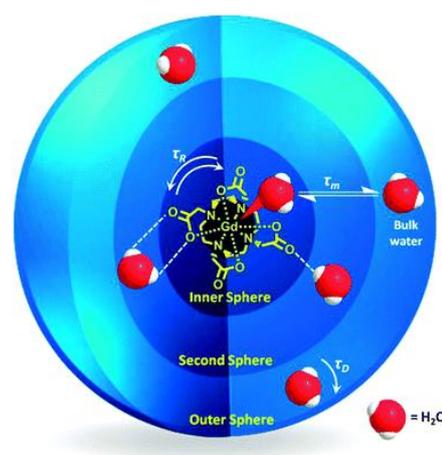


Figure 15: Interaction dipolaire entre le moment magnétique électroniques du chélate Gd-DOTA et le moment nucléaire des protons des molécules d'eau [73].

Si l'effet de l'agent de contraste raccourcit le temps de relaxation T_1 des protons, on observe un hyper signal en pondération T_1 . C'est l'effet paramagnétique T_1 . Cet

effet se traduit par l'éclaircissement de l'image : on parle alors de contraste positif.

Les premiers agents de contraste paramagnétiques ont été utilisés dans le corps humain en novembre 1983 avec la publication du premier rapport préliminaire de son utilisation chez les patients atteints de tumeurs cérébrales. Il s'agissait de l'ion gadolinium complexé avec un chélateur linéaire de type polyaminocarboxylate (DTPA l'acide diéthylènetriaminepentaacétique) [73]. En raison de son effet T_1 prédominant (rehaussement de contraste en pondération T_1), l'ion gadolinium est l'agent de contraste le plus sollicité en imagerie IRM. De la famille des lanthanides (terre rare), l'ion (Gd^{3+}) possède sept électrons non appariés dans sa couche externe. Ce qui lui confère un moment magnétique très élevée et donc une influence forte sur la relaxation longitudinale T_1 des protons. Son efficacité dépend du nombre des molécules d'eau venant interagir avec lui. Il dépend du temps de résidence de ces molécules d'eaux dans la sphère interne du complexe de gadolinium.

En raison de sa toxicité élevée à l'état libre, l'ion gadolinium est administré dans l'organisme sous forme de chélates de gadolinium, formant ainsi des complexes non toxiques, inertes et stables *in vivo*. La décomplexation et donc l'innocuité de l'ion Gd^{3+} sont assurées par son affinité avec les ligands. Plus la constante d'affinité K sera élevée et plus la probabilité du relargage de l'ion gadolinium dans l'organisme sera minime. On peut noter, par exemple, que la constante de stabilité de (DOTAGA-Gd), ($\log K = 25,6$), est plus élevée que celle du DTPA-Gd, ($\log K = 22,5$) [74] [75]. L'agent de contraste DOTAGA-Gd sera donc plus sûr que DTPA-Gd car le relargage de Gd^{3+} sera beaucoup plus limité dans le cas du complexe DOTAGA-Gd.

Tableau 10: Les agents de contraste positifs et négatifs pour l'IRM [72].

Contrast agent	Structure	Classification	Target	Producer
Magnevist [®]	Gd-DTPA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Schering AG, Germany
Omniscan [®]	Gd-DTPA-BMA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Amersham-Nycomed, Norway
ProHance [®]	Gd-DO3A-HP	T ₁ -agent	Extracellular agent	Bracco Imaging, Italy
Dotarem [®]	Gd-DTOA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Guerbet SA, France
OptiMARK [®]	Gd-DTPA-BMEA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Mallinckrodt, Inc, USA
Gadovist [®]	Gd-DO3A-Butriol	T ₁ -agent	Extracellular agent	Schering AG, Germany
Multihance [®]	Gd-BOPTA, Gadobenate	T ₁ -agent	Liver specific agent	Bracco Imaging, Italy
Eovist [®]	Gd-EOB-DTPA, Gadoxetate	T ₁ -agent	Liver specific agent	Schering AG, Germany
Teslascan [®]	Mn-DPDP, mangafodipir	T ₁ -agent	Liver specific agent	Amersham Imaging, Great Britain
Feridex [®]	Iron oxide particles, Ferumoxide	T ₂ -agent	Liver specific agent	Berlex, USA
Endorem [®]	Iron oxide particles	T ₂ -agent	Liver specific agent	Guerbet, France
Resovist [®]	Iron oxide nanoparticles coated with carboxydextran, diameter: 60 nm	T ₂ -agent	Liver specific agent	Schering AG, Germany

1.4.2.1.2.2. Les agents de contraste superparamagnétiques

A la différence des agents de contraste T₁ positif, les agents de contraste T₂ négatif raccourcissent le temps de relaxation transversale avec production d'un signal faible en pondération T₂. C'est l'effet superparamagnétique qui se traduit par l'assombrissement de l'image : On parle alors de contraste négatif [76].

Récemment, le développement d'agents de contraste T₂ pour l'imagerie par résonance magnétique a considérablement progressé avec l'apparition d'une large gamme d'agent de contraste moléculaire superparamagnétique tels que les complexes des ions dysprosium (Dy³⁺) et holmium (Ho³⁺). Mais ces travaux sont assez récents et n'ont pas suscité un engouement considérable contrairement aux nanoparticules d'oxyde de fer qui sont utilisées actuellement comme agent de contraste T₂ en imagerie par résonance magnétique (IRM) (Tableau 10) [77]. En raison de la faible taille nanométrique, ces nanoparticules présentent des propriétés magnétiques intéressantes c'est-à-dire la propriété de s'aimanter très fortement sous l'effet d'un champ magnétique extérieur. Ils sont désignés par le terme "superparamagnétique" (Figure 16) [78].

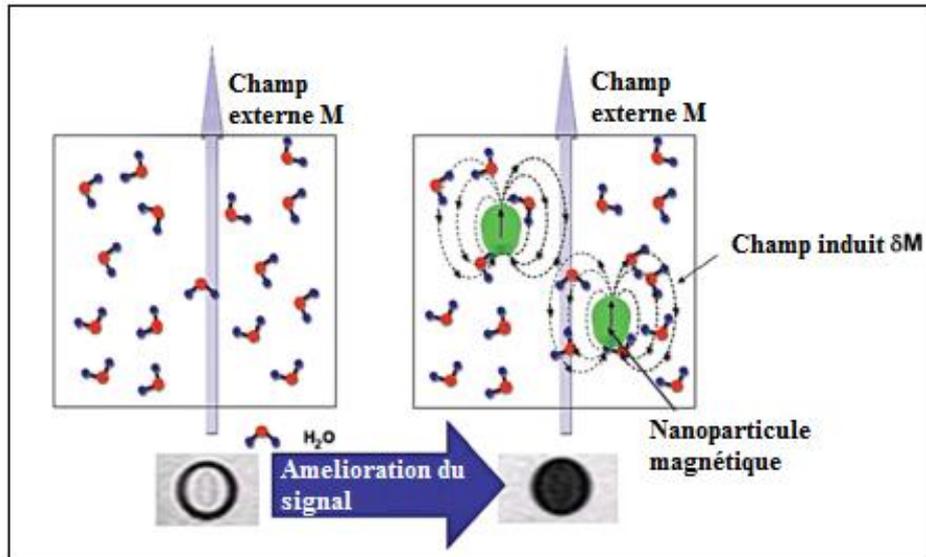


Figure 16: Influence de nanoparticules d'oxyde de fer sur le contraste en IRM [78].

Ces nanoparticules sont constituées d'un noyau d'oxyde de fer (principalement la magnétite Fe_3O_4 , la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) revêtu d'une couche hydrophile de macromolécules organiques, biologiques et/ou de polymères organiques et/ou inorganiques. Ces nanoparticules sont caractérisées par un moment magnétique élevé en présence d'un champ magnétique extérieur. Elles sont classées en deux groupes principaux en fonction de leur taille [78] :

- ❖ SPIO (superparamagnetic iron oxides) : ces nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique supérieur à 50 nm. Les SPIO ont en commun leur absorption spécifique par le système réticulo-endothélial (SRE) au niveau du foie, de la rate, des ganglions et de la moelle osseuse. Ils sont utilisés pour l'imagerie. Les formulations injectables des SPIO sont commercialisées sous le nom d'ENDOREM[®] en Europe ou Feridex[®] en USA et Resovist[®].
- ❖ USPIO (Ultrasmall superparamagnetic iron oxides) : les nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique plus petit que 50 nm. Du fait de leur petite taille, ces nanoparticules ont une demi-vie sanguine plus longue (24 h chez l'homme). Pour cette raison, les USPIO sont adaptées pour l'étude des vaisseaux. Cette faculté d'être confiner à l'espace vasculaire où ils sont injectés font d'eux des candidats potentiels dans le diagnostic précoce des pathologies ischémiques (perfusion myocardique, accidents vasculaires cérébraux), dans le diagnostic des anomalies vasculaires (angiographie) et dans le diagnostic ou le suivi thérapeutique des anomalies de perméabilité de l'endothélium vasculaire (diabète, lésions tumorale.).

1.4.2.1.2. Radiotraceur TEP/TEMP

1.4.2.1.3.1. Les atomes radioactifs

Depuis la découverte de la radioactivité artificielle en 1934, l'utilisation des radio-isotopes en médecine nucléaire a suscité un engouement croissant. Grâce à la large panoplie d'isotopes radioactifs, l'imagerie nucléaire peut s'adapter aux différentes situations exigées pour le dépistage de pathologies telles que le cancer. La localisation des radioéléments et donc du traceur auquel ils sont associés est déterminée grâce aux caméras TEP/TEMP qui détectent les rayonnements émis directement (TEMP) ou indirectement (TEP) par les atomes radioactifs du radiotraceur. Ces modalités d'imagerie sont caractérisées par une excellente sensibilité et une profondeur quasi-illimitée de pénétration qui s'avère très utile pour le diagnostic. De plus, elles permettent une imagerie fonctionnelle et métabolique. Dans le domaine de la thérapie, les rayons émis par les radio-isotopes permettent de détruire les cellules cancéreuses en augmentant les doses de rayonnement.

1.4.2.1.3.1.1. Technétium-99

La tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT) est la technique la plus utilisée actuellement en imagerie nucléaire. Elle est basée sur l'émission de rayonnement gamma par un radionucléide. Le technétium-99m, un émetteur gamma est le radionucléide le plus utilisé pour la TEMP. Il présente des propriétés nucléaires adaptées pour la TEMP tel qu'un rayonnement γ de 140 keV qui est idéal pour les caméras actuelles. Il possède également une demi-vie suffisamment longue pour suivre *in vivo* l'accumulation du radiotraceur à base de ^{99m}Tc dans le tissu cible [79]. Actuellement la majorité des hôpitaux qui sont équipés de scintigraphie utilise le technétium-99m comme agents d'imagerie pour la TEMP en raison de son faible coût de production à partir d'un générateur ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$).

Le technétium-99m forme un complexe stable avec le DTPA. Il est le produit radiopharmaceutique le plus utilisé pour la scintigraphie rénale. Il est également très utilisé en imagerie pédiatrique. Hildo J.K. Ananias *et al.* ont montré que le peptide radiomarqué au technétium-99m (^{99m}Tc -HABBN) présentait des atouts

pour détecter le cancer de la prostate [80]. Monteiro *et al.* ont montré également que le peptide radiomarqué au technétium-99m ($^{99m}\text{Tc-PTX}$) avait un temps de circulation sanguine relativement long et une accumulation importante dans les tissus tumoraux (4T1) de souris atteints de cancer de seins [81]. Les auteurs ont montré que le $^{99m}\text{Tc-PTX}$ pouvait servir de sonde d'imagerie pour le cancer du sein.

1.4.2.1.3.1.2. Indium-111

L'indium-111 est le deuxième radionucléide le plus couramment utilisé en TEMP. Il est produit dans un cyclotron et se désintègre en émettant deux photons gamma d'énergie respective 173 et 247 keV. Cette double émission de photons par capture électronique et sa demi-vie de 2,8 jours font de l'indium-111 un agent d'imagerie TEMP particulièrement intéressant pour les applications *in vivo* [82].

L'indium est un cation métallique trivalent. Il se coordonne essentiellement avec des donneurs tels que l'azote ou l'oxygène. Il forme un complexe stable avec le dérivé du DTPA [$^{111}\text{In-DTPA}$] ou le DOTA pour le marquage de peptides ou de protéines. Le DTPA marqué à l'indium-111 est le produit radiopharmaceutique le plus utilisé en imagerie cérébrale et rénale [83]. En outre, l'oxine marquée à l'indium est utilisée pour les études *in vitro* afin de radiomarquer les globules blancs et globules rouges [84]. Ce chélate d'indium est utilisé pour détecter les infections présentes dans le sang.

Actuellement, les produits radiopharmaceutiques marqués avec ^{111}In sont des peptides et des protéines. Ils sont utilisés pour la détection de cancers et le ciblage des antigènes et des récepteurs surexprimés dans certaines cellules cancéreuses.

1.4.2.1.3.1.3. Gallium-68

Le Gallium-68 est un radionucléide émetteur de positon β^+ . Il est caractérisé par une demi-vie très courte (1,13h). Il est produit par un générateur d'isotope ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$) installé dans le site d'utilisation afin de limiter la perte d'activité résultant de la décroissance radioactive pendant son transport.

Le Gallium-68 est principalement utilisé dans le marquage de peptides pour l'imagerie nucléaire [85]. Les peptides marqués au gallium-68 sont utilisés pour la détection mais également pour le ciblage des récepteurs surexprimés de certaines tumeurs [86]. Les produits radiopharmaceutiques (^{68}Ga -DOTATOC, ^{68}Ga -DOTATATE, ^{68}Ga -DOTANOC) sont actuellement employés en imagerie et notamment pour la reconnaissance des récepteurs surexprimés des tumeurs. Un exemple très répandu est l'utilisation de complexes de gallium-68 pour le ciblage des récepteurs de la somatostatine [87]. Le PSMA marqué au gallium ^{68}Ga permet aussi de détecter le cancer de la prostate [88].

Des agents à base ^{68}Ga obtenus par complexation avec des chélateurs NODAGA, NOTA sont également adaptés pour les applications *in vivo*. Contrairement aux DOTA, DOTAGA, les agents chélatants NOTA et le NODAGA offrent une grande stabilité thermodynamique et cinétique avec le gallium-68 (Figure 17).

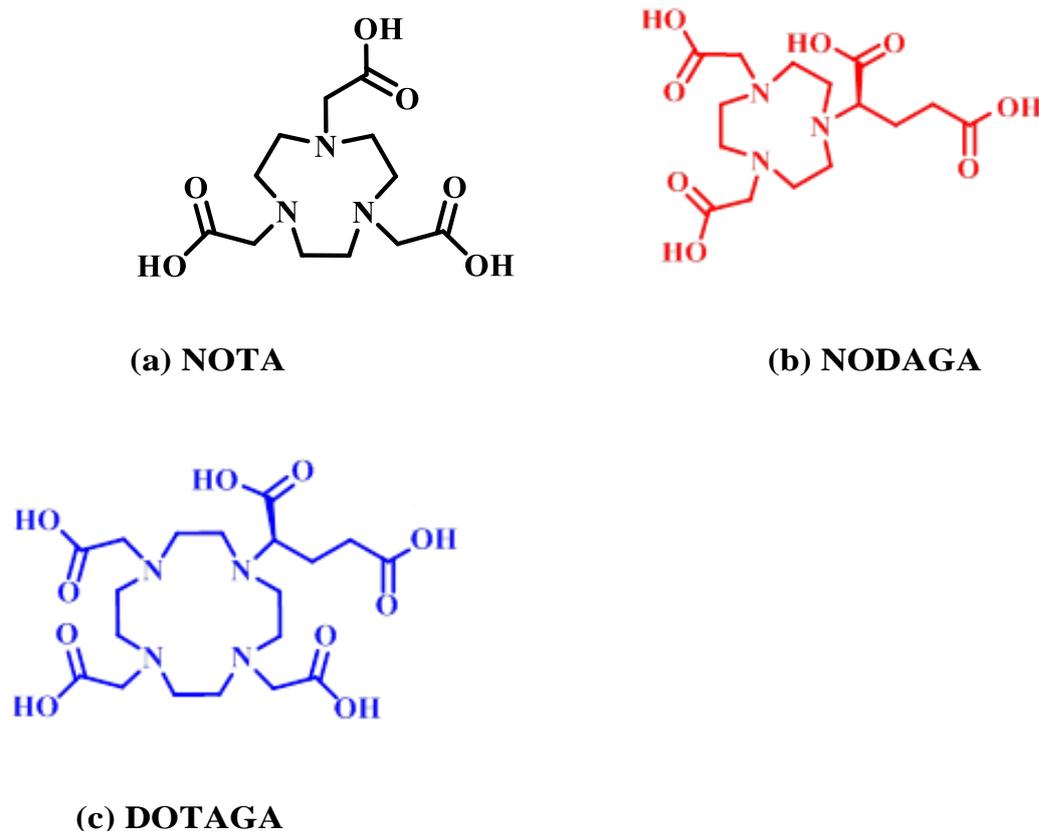


Figure 17: Formules topologiques des différents chélateurs (a) (NOTA), (b) NODAGA, (c) DOTAGA

1.4.2.1.3.1.4. Cuivre-64

L'isotope radioactif ^{64}Cu (émetteur β^+) est l'un des radionucléides utilisé en imagerie TEP [89]. Sa demi-vie (12,7 h) et ses caractéristiques de désintégration permettent de réaliser des images TEP de qualité comparable à celles obtenues avec le fluor-18. Il est donc une alternative intéressante au fluor-18 qui est handicapé par sa demi-vie très courte (1,83 h) [90]. L'isotope radioactif ^{64}Cu est produit dans un cyclotron à partir d'irradiation de nickel-64 (réactions $^{64}\text{Ni}(\text{p},\text{n})$). En raison de sa faible énergie (653 keV), le cuivre-64 présente un grand intérêt en tant qu'émetteur de positon pour l'imagerie TEP [89]. Il peut également se lier avec des biomolécules (peptides ou protéines) pour devenir des produits radiopharmaceutiques pour un ciblage thérapeutique. Les conditions particulières de radiomarquage du cuivre et son temps de circulation sont importantes pour assurer un ciblage et une accumulation optimale. Ainsi, il est possible d'effectuer des acquisitions d'image entre 12h et 18h après l'injection. Le cuivre-64 présente une affinité pour les ligands macrocycliques. Les chélateurs macrocycliques de type tétraza et triaza sont les plus utilisés pour le cuivre-64, en particulier, le dérivé NOTA [91]. Des études réalisées en milieu *in vivo* et *in vitro* ont montré que les dérivés NOTA ou NODAGA complexaient mieux le cuivre-64 que les dérivés DOTA ou DOTAGA. Les ligands bis(thiosemicarbazone) tétradentés acycliques forment également des complexes stables avec le cuivre-64 et sont donc intéressants pour certaines applications telles la perfusion myocardique, l'imagerie cérébrale et la visualisation de l'hypoxie.

1.4.2.1.3.1.5. Zirconium-89

Le zirconium fait partie de la panoplie des radioéléments utilisés pour l'imagerie par tomographie par émission de positon (TEP). Il possède des propriétés nucléaires particulièrement intéressantes en raison de sa faible énergie de positon (395,5 keV). Ce qui induit l'obtention des images à haute résolution. Il possède également une demi-vie d'environ 72 heures bénéfique pour réaliser des images sur plusieurs jours après l'injection par voie intraveineuse. Le zirconium possède un degré d'oxydation (+4). Il peut être classé en tant qu'acide dur. Il a tendance à former des complexes à hexa ou octa coordonnés. *In vivo*, le zirconium libre est susceptible de s'accumuler dans les os [92]. Un moyen d'atténuer le risque de

toxicité est de le complexer avec un chélateur approprié afin d'exploiter ses caractéristiques avantageuses en milieu *in vivo*. Le dérivé de la DFO a été le premier chélateur linéaire utilisé pour complexer le zirconium-89 [93]. En raison de la simplicité du radiomarquage, le dérivé DFO devient le chélateur de choix pour l'imagerie TEP. Le développement plus récent de chélateurs de zirconium tels que DOTA, HOPO s'avère intéressant en raison de la stabilité accrue du complexe métallique en milieu *in vivo* (Figure 18) [94] [95].

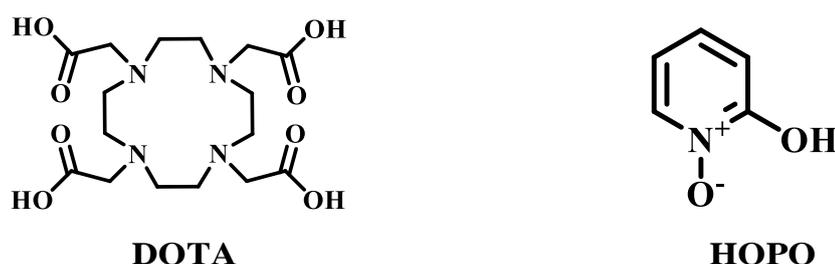


Figure 18 : Formule topologique des chélateurs DOTA et HOPO

1.4.2.1.3.1.6. Le fluor-18

Le ¹⁸F-FDG est un radioisotope couramment utilisé en médecine nucléaire en raison de ses propriétés nucléaires intéressantes [68]. Il possède une activité importante et une durée de vie courte mais suffisamment longue (112 min) pour permettre la préparation du composé radiopharmaceutique à injecter. Actuellement, la plupart des radiotraceurs utilisées en oncologie sont des dérivés modifiés par du fluor-18 en appliquant la fluoration par voie électrophile ou par voie nucléophile.

1.4.2.1.3.1.7. L'iode

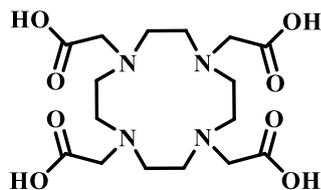
L'iode est couramment utilisé en imagerie médicale en tant qu'un agent de contraste pour l'imagerie CT. Les isotopes radioactifs de l'iode sont également très utilisés en médecine nucléaire en raison de ses propriétés nucléaires intéressantes. Par exemple l'iode-124 est utilisé en tant que radioélément émetteur β^+ et gamma pour l'imagerie nucléaire [96] tandis que l'iode-125 est utilisé en tant qu'implant radioactif efficace pour le traitement de cancer de la prostate [97].

Différentes méthodes de marquage existent pour incorporer les isotopes de l'iode dans les molécules d'intérêt. Il existe la méthode indirecte et la méthode directe. La méthode indirecte consiste à introduire l'isotope de l'iode par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique tandis que la méthode directe permet de fixer directement l'iode radioactif sur la molécule par liaison covalente.

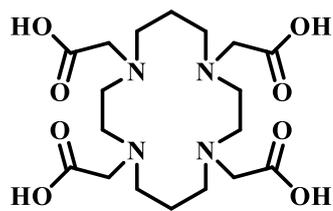
1.4.2.1.3.2. Greffage de chélatés de radioéléments

L'utilisation croissante de la TEP a conduit à développer des radiotraceurs à base de gallium (^{68}Ga) [98], de cuivre (^{64}Cu) [99] et de zirconium (^{89}Zr) [100]. Ces radioéléments sont des candidats intéressants en raison de leur demi-vie suffisamment longue. Cependant, leur biodistribution est inadaptée lors qu'ils sont administrés à l'état libre dans l'organisme. En outre certains d'entre eux sont toxiques sous leur forme ionique. Afin de profiter de leurs propriétés nucléaires intéressantes par un meilleur contrôle de leur biodistribution tout en limitant leur toxicité, les radioéléments sont incorporés dans des chélateurs organiques avec lesquels ils forment des complexes stables.

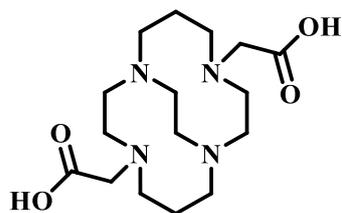
Le choix du ligand est important car il permet d'influer sur les propriétés physico-chimiques (solubilité, stabilité, inertie) et pharmacocinétiques du radioélément. Des études disponibles dans la littérature ont montré que les chélateurs macrocycliques sont plus inertes cinétiquement par rapport aux chélateurs acycliques. De plus, les chélateurs macrocycliques en raison de leur cavité macrocycliques (forme, taille, nombre de site de liaison) peuvent contenir parfaitement les ions métalliques dans leur cavité. De plus, la stabilité thermodynamique des complexes [ligand-radioélément] est plus grande pour les macrocycles que pour les chélateurs acycliques [101]. Les tétraamines cycliques DOTA ($10^{22,7}$ avec l'ion Cu^{2+}), TETA ($10^{21,6}$ avec l'ion Cu^{2+}), CB-TE2A ($10^{27,1}$ avec l'ion Cu^{2+}), DO3A ($10^{25,7}$ avec l'ion Cu^{2+}), sont effectivement connues pour complexer les éléments métalliques avec une très grande stabilité par rapport à leurs homologues linéaires (DTPA) ($K_{\text{ML}}10^{21,4}$ avec l'ion Cu^{2+}), (Figure 19).



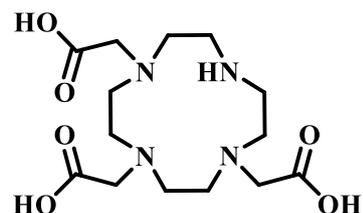
(a) **DOTA**



(b) **TETA**



(c) **CB-TE2A**



(d) **DO3A**

Figure 19: Formules topologiques des différents chélateurs (a) (DOTA), (b) TETA, (c) CB-TE2A (d) DO3A

Le dérivé DOTA est l'un des chélateurs qui a été le plus largement utilisé pour radiomarquer certains isotopes tels que l'indium-111, le lutécium-177, le gallium-68, le cuivre-64. Bien qu'il puisse complexer une grande variété de radioéléments, **le complexe [DOTA-Cu] est admis moins stable que le complexe [NOTA-Cu]** [103]. Le dérivé NOTA possède une cavité macrocyclique plus petite que celle du dérivé DOTA. Pour cette raison, le NOTA forme plus rapidement des complexes avec des petits ions tels que le Cu (II), le gallium (III). Récemment, S.C. Ghosh *et al.* ont comparé l'efficacité des dérivés DOTA, NODAGA et NOTA en tant qu'agents chélateurs pour le marquage du peptide (mAb 7) au cuivre-64 [102]. Le résultat de l'étude a montré que le dérivé NODAGA présentait une stabilité élevée *in vivo* par rapport au dérivé DOTA. De plus, les auteurs ont montré également que le dérivé NODAGA présentait une faible absorption dans les organes sains contrairement au dérivé DOTA qui affichait une accumulation considérable après 48 heures. Dans une autre étude similaire, Rylova *et al.* ont comparé la biodistribution *in vivo* des complexes (^{64}Cu -DOTA-TATE) et (^{64}Cu -NODAGA-JR11) une heure, 4 heures et 24 heures après injection des radiopeptides [103]. Les résultats de l'étude ont montré que le complexe ^{64}Cu -NODAGA-JR11 présentait

une clairance sanguine, une absorption tumorale rapides et un temps de rétention assez longue dans la tumeur alors que la pharmacocinétique du complexe ^{64}Cu -DOTA-TATE était moins favorable. De plus la clairance sanguine de ^{64}Cu -DOTA-TATE était très lente comparé au conjugué ^{64}Cu -NODAGA-JR11.

Ces résultats suggèrent que la stabilité *in vivo* est largement meilleure avec le dérivé NODAGA.

La desferrioxamine B (DFO) est un sidérophore bactérien connue pour être le seul chélateur qui donne un complexe stable avec le zirconium-89. D'autres chélateurs tels que l'EDTA et le DTPA sont connus également pour complexer l'ion zirconium. Néanmoins, leurs constantes de stabilité restent moins importantes que celui du dérivé DFO. Récemment une étude réalisée par Pandya *et al.* a montré que le DOTA complexait mieux l'ion zirconium que la DFO [96]. Toutefois, la cinétique de coordination de l'ion zirconium (Zr^{4+}) est plus lente. La durée de radiomarquage de la DFO est de 15 min à la température ambiante alors qu'elle est assez longue pour les macrocycles tels que le DOTA, (30 à 90 minutes) malgré le chauffage à sous chauffage à 60 - 95°C.

Tous ces exemples montrent la diversité des stratégies pour développer des nanosondes pour l'imagerie médicale. De plus, l'association de ces stratégies est possible pour développer des nano-objets pour l'imagerie multimodale.

1.4.2.2. Agent moléculaire d'imagerie bimodale (IRM/TEP)

La combinaison de l'imagerie par résonance magnétique et de l'imagerie nucléaire est une stratégie peu décrite dans la littérature, mais elle suscite un intérêt croissant pour les applications médicales. En effet, elle permet d'allier l'excellente résolution spatiale et temporelle de l'IRM à la très grande sensibilité de la TEP. La synthèse des agents d'imagerie bimodale détectable simultanément en IRM/TEP est un défi considérable pour les chimistes puisqu'il faut développer une sonde moléculaire portant plusieurs fonctionnalités. Une fonctionnalité pour chaque type d'imagerie et un site réactif pour immobiliser cette sonde bimodale sur un vecteur. Les sondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP nécessitent la présence d'un chélateur pour l'immobilisation des ions gadolinium (IRM) et d'un chélateur pour

l'immobilisation des ions émetteurs de positon ou d'un site réactif pour la fonctionnalisation par le fluor-18.

Frullano *et al.* ont développé une sonde moléculaire sensible au pH pour imagerie IRM/TEP. Cette sonde GdDOTA-4AMP-F est constituée d'un macrocycle du dérivé DOTA et d'un cycle 1,2,3-triazole portant sur l'azote, un groupe fluorométhyle (CH₂-F). Pour une partie des atomes de fluor, il s'agit de l'isotope radio-actif ¹⁸F qui est un émetteur de positon. La présence du macrocycle dérivé du DOTA qui forme des complexes stables avec l'ion paramagnétique Gd³⁺ et du radioisotope ¹⁸F confère à cette molécule à la fois un comportement d'agent de contraste pour l'IRM et de radiotracer pour la TEP (Figure 20)[104].

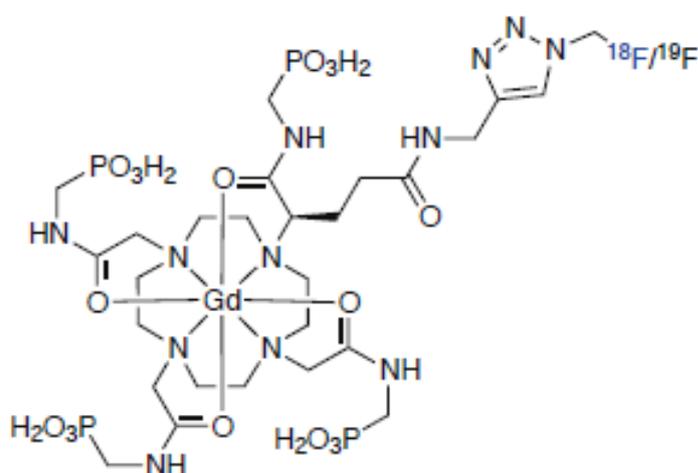


Figure 20: Sonde moléculaire sensible au pH pour l'imagerie simultanée IRM/TEP [104]

Frullano *et al.* ont ensuite comparé la relaxivité longitudinale ($r_{1\sim 1}$) du complexe GdDOTA-4AMP-F en fonction du pH, et dans deux milieux différents : une solution aqueuse saline et du plasma de lapin. Les auteurs ont constaté que les deux profils étaient similaires, ce qui pourrait indiquer que la sonde peut mesurer le pH du milieu physiologique (Figure 21) [104].

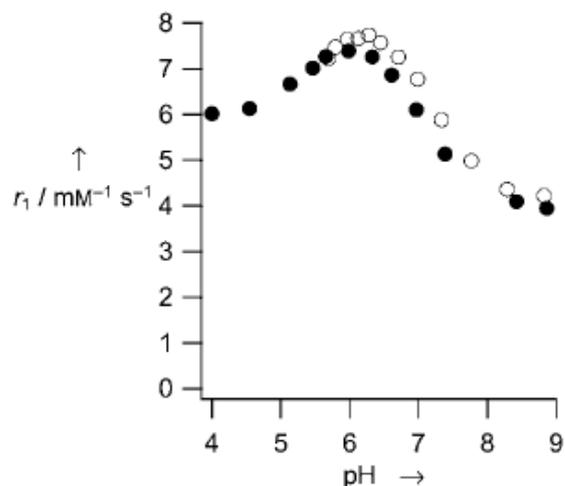


Figure 21: la relaxivité du complexe GdDOTA-4AMP-F en fonction du pH [104].

Les travaux de Suchy *et al.* ont montré qu'il était également possible d'élaborer des sondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP par complexation à la fois des ions gadolinium (IRM) et des ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ (TEP) grâce à la présence dans la même molécule de deux macrocycles DO3A identiques (Figure 22) [105].

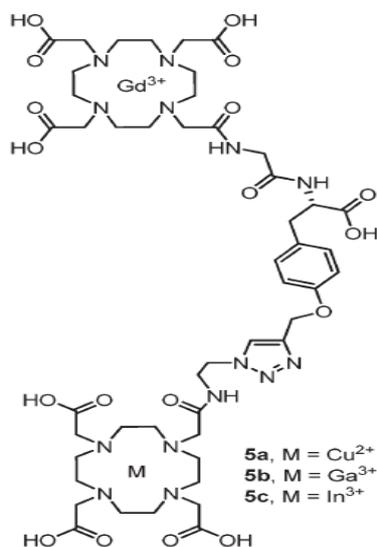


Figure 22: Plateforme (IRM/TEP) composée de deux macrocycles DO3A [105].

La présence de deux cycles identiques pour complexer des ions différents peut poser des difficultés lors du marquage par les ions gadolinium et émetteurs β^+ . Afin de s'en affranchir, il a été proposé de synthétiser des plateformes avec deux chélateurs différents, Vologdin *et al.* ont développé une plateforme moléculaire comprenant le macrocycle DO3A (acide 2,2',2''-(1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique) et le cycle AAZTA (acide 6-amino-6-méthylperhydro-1,4-

diazepinetétraacétique). Le DO3A est connu pour complexer les ions gadolinium pour l'IRM, tandis que le chélate AAZTA a été choisi pour l'immobilisation des ions gallium (III) pour la TEP. Les deux chélateurs sont liés par un espaceur, un bras arylsulfonamide (Figure 23) [106].

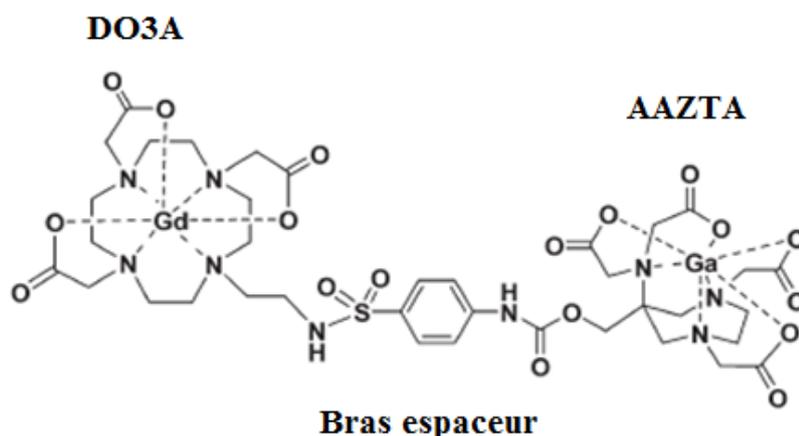


Figure 23: Plateforme pour l'imagerie simultanée IRM/TEP composée de deux macrocycles différents, DO3A et AAZTA [106].

La présence du bras arylsulfonamide est très intéressante car il est sensible au changement de pH (Figure 23) [106]. Les auteurs ont constaté que la relaxivité évoluait lorsque la valeur du pH changeait ($r_1 \sim 3,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour $\text{pH} > 8$ et; $r_1 = 10,1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour $\text{pH} < 5$).

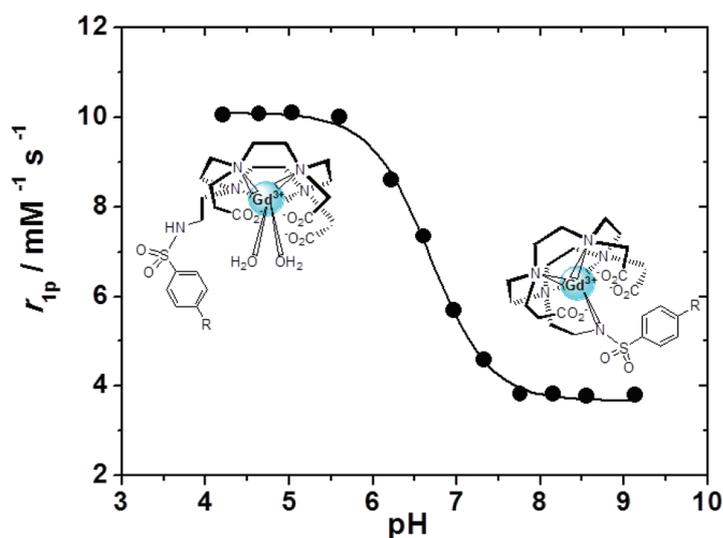


Figure 24: Mesure de la relaxivité en fonction du pH [106].

La plateforme (Gd-DO3A-AAZTA-Ga) est donc très intéressante en tant que sonde bimodale IRM/TEP car elle pourrait mettre en évidence des changements de pH au sein des tissus qui sont souvent révélateurs d'un phénomène inflammatoire.

Comme la TEP est beaucoup plus sensible que l'IRM, les démarches visant à concevoir des sondes bimodales IRM/TEP plus riches en gadolinium qu'en émetteurs de positon sont pertinentes. Un exemple a été décrit par Notni *et al.* Il s'agit de la synthèse d'agents d'imagerie bimodale (IRM/TEP). Cette molécule est composée d'un triazamacrocycle TRAP fonctionnalisé par trois bras phosphonate (TRAP : triazocyclononanetriphosphate) liés à trois dérivé DOTA (acide 1,4,7,10-tétrazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique). La présence du dérivé du DOTA permet de complexer durablement l'ion gadolinium Gd^{3+} pour l'IRM tandis que pour la TEP, le triazamacrocycle permet d'immobiliser le radio-isotope $^{68}Ga^{3+}$, émetteur β^+ (Figure 25) [107].

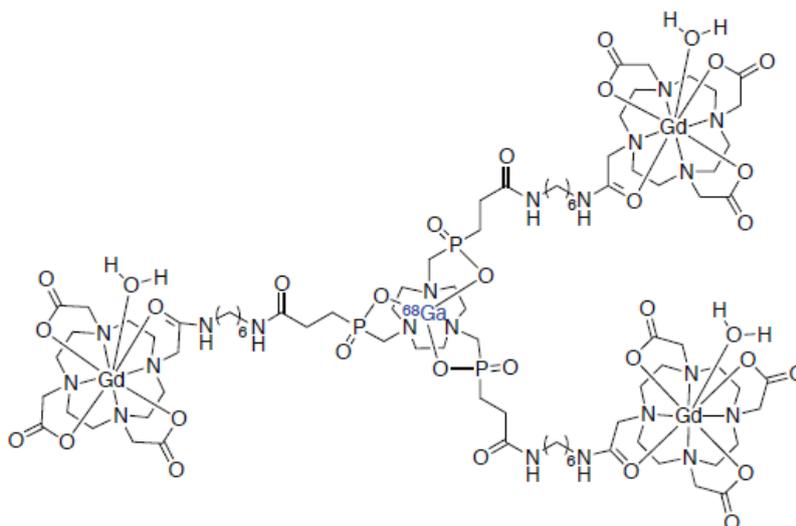


Figure 25: Sonde moléculaire (IRM/TEP) à base de polyazamacrocyales : TRAP et DOTA [107].

Notni *et al.* ont ensuite réalisé une étude *in vivo* sur un rat Wistar sain. Les images acquises simultanément par l'IRM et de la TEP après injection de la sonde moléculaire montrent une superposition du signal de l'IRM et de la radioactivité de la TEP (Figure 26) [107].

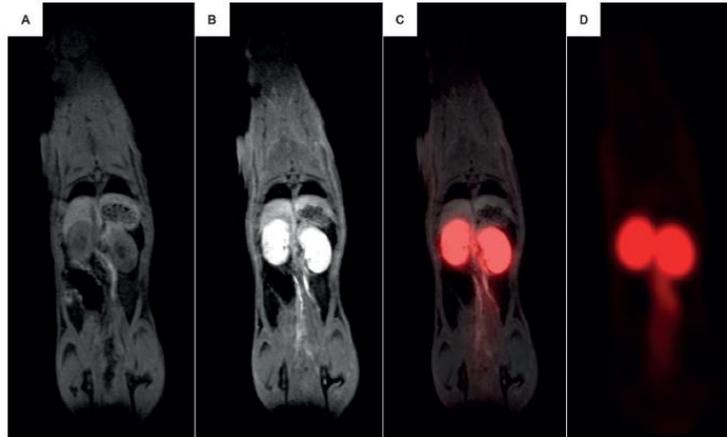


Figure 26: TEP/IRM d'un rat Wistar (plan coronal traversant les reins) : A) avant et B –D) 25 min et 5 min après l'injection d'un mélange de la sonde moléculaire non radioactif à base de polyazamacrocycles (20 μmol) et d'un radioélément (27 MBq, 0,8 nmol): pondéré en T1 (A, B), images de fusion (C) et PET (D) [107].

Dans une autre étude, Kumar *et al.* ont travaillé avec une autre plateforme composée de deux types différents de macrocycles. Un noyau dérivé du NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique) placé au centre (rouge) conjugué à six dérivé DOTA (bleu) (Figure 27) [108]. Le dérivé NOTA permet d'immobiliser le radioisotope de $^{68}\text{Ga}^{3+}$, émetteur β^+ , tandis que le dérivé DOTA permet de former un complexe stable avec l'ion gadolinium (III). La plateforme contient également un site de greffage intégré, trois groupements amine (vert) permettant d'accrocher un peptide (RGD) pour cibler les intégrines ($\alpha_v\beta_3$) des récepteurs surexprimés des cellules cancéreuses de type U87 MG.

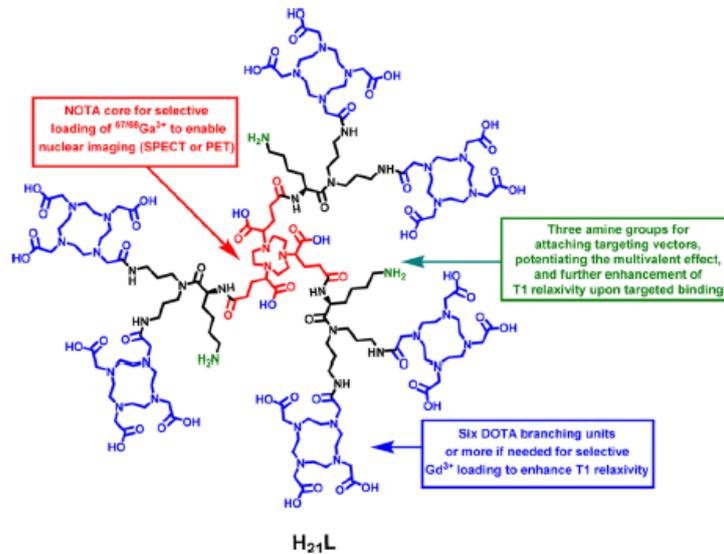


Figure 27: Plateforme (IRM/TEP) à base d'un complexe bimétallique NOTA(⁶⁸Ga)-[DOTA(Gd)]₆ [108].

Kumar *et al.* ont ensuite réalisé une étude de stabilité du complexe bimétallique en milieu *in vitro* et *in vivo* dans du sérum de rat et de l'urine de souris. Le principal résultat de l'étude a montré qu'il n'y a pas de libération des ions (Gd^{3+} et $^{68}Ga^{3+}$) : le complexe bimétallique est resté stable dans le milieu sérum. Par la suite, les auteurs ont étudié la biodistribution *in vivo* sur des souris porteuses d'une tumeur de type U87 MG. Les images ont été enregistrées 1h après l'injection du complexe bimétallique NOTA(⁶⁸Ga)-[DOTA(Gd)]₆. La comparaison des images acquises par IRM pondérée T₁ avant et 1h après l'injection intraveineuse (IV) révèle un fort blanchiment de la zone tumorale (repérée sur la figure 28 par une flèche). Ce blanchiment est caractéristique du rehaussement du contraste positif en IRM et donc de l'accumulation de la sonde moléculaire dans la zone tumorale. La radioactivité observée dans la tumeur grâce à la TEP confirme la présence de la sonde bimodale dans la tumeur. Cette accumulation est favorisée par la présence du peptide RGD en raison de son affinité pour les intégrines ($\alpha_v\beta_3$) surexprimées par la tumeur U87 MG. La superposition des images IRM et TEP après une injection unique de l'agent bimodal sur le même animal met en exergue le potentiel prometteur de la sonde en tant qu'agent d'imagerie simultanée IRM/TEP.

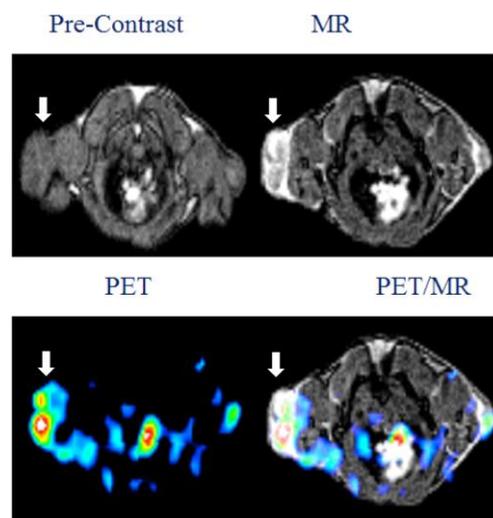


Figure 28: Images IRM, TEP et fusion des images TEP/IRM de la tumeur U87MG (xénogreffe) chez des souris SCID 1 heure après l'injection de la sonde NOTA(^{68}Ga)-[DOTA(Gd)]₆ fonctionnalisée par le peptide RGD [108].

Récemment, le groupe de Franck Denat a proposé une autre alternative consistant à l'élaboration d'une plateforme monomoléculaire polyvalente pour l'imagerie multimodale. La stratégie mise en œuvre pour développer ce système monomoléculaire (MOMIAs), contenant à la fois une fonction (BODIPY) détectable par imagerie optique et un chélateur NODAGA ou DOTAGA pour complexer un radionucléide détectable par imagerie nucléaire (TEMP ou TEP) représente un défi en synthèse organique. Pour élargir l'application, on pourrait par exemple substituer la fonction (BODIPY) par un chélateur NODAGA pour l'immobilisation des radio-métaux tels que le (^{68}Ga ou ^{64}Cu) pour la TEP tout en gardant le chélateur DOTAGA pour l'immobilisation de l'ion gadolinium pour l'IRM. Un bras espaceur pourrait être utilisé également pour connecter les deux macrocycles afin d'obtenir une sonde moléculaire pour imagerie bimodale IRM/TEP.

1.4.2.3. Nanoparticules multifonctionnelles pour l'imagerie multimodale

1.4.2.3.1. Généralités sur les nanoparticules

Les recherches entreprises dans le domaine des nanosciences et nanotechnologies ont conduit au développement d'agents thérapeutiques, de sondes d'imagerie (diagnostique), ou de nanostructures combinant les deux à la fois (théranostiques)

pour lutter contre le cancer [109]. Sur le plan règlementaire (circulaire européenne n°2011/696/UE) les nanoparticules sont des objets dont au moins une de leurs dimensions est comprise entre 1 et 100 nanomètres [110] (Figure 29). Elles sont constituées par des atomes dont la majorité se trouve en surface. Ceci augmente la réactivité par l'augmentation du nombre d'atomes en surface avec la diminution de la taille des particules, conférant ainsi aux nanoparticules, des propriétés originales différentes de celles des matériaux massifs [111]. Ces propriétés optiques, électroniques et chimiques ont permis l'apparition de nouveaux outils d'imagerie et de thérapie. En plus, de ces propriétés intrinsèques, les nanoparticules ont la capacité de combiner plusieurs fonctions différentes pour différentes applications médicales (imagerie, radiothérapie,) ou différents groupes de ciblage des cellules tumorales tels que les peptides et les protéines en un seul objet. De plus, on peut avoir plusieurs éléments à haut Z concentrés dans un seul objet pour la radiothérapie.

De ce fait, au cours de ces vingt dernières années, le nombre annuel de publications scientifiques est passé de quelques articles à 3500 articles en vingt ans (Figure 30) [112].

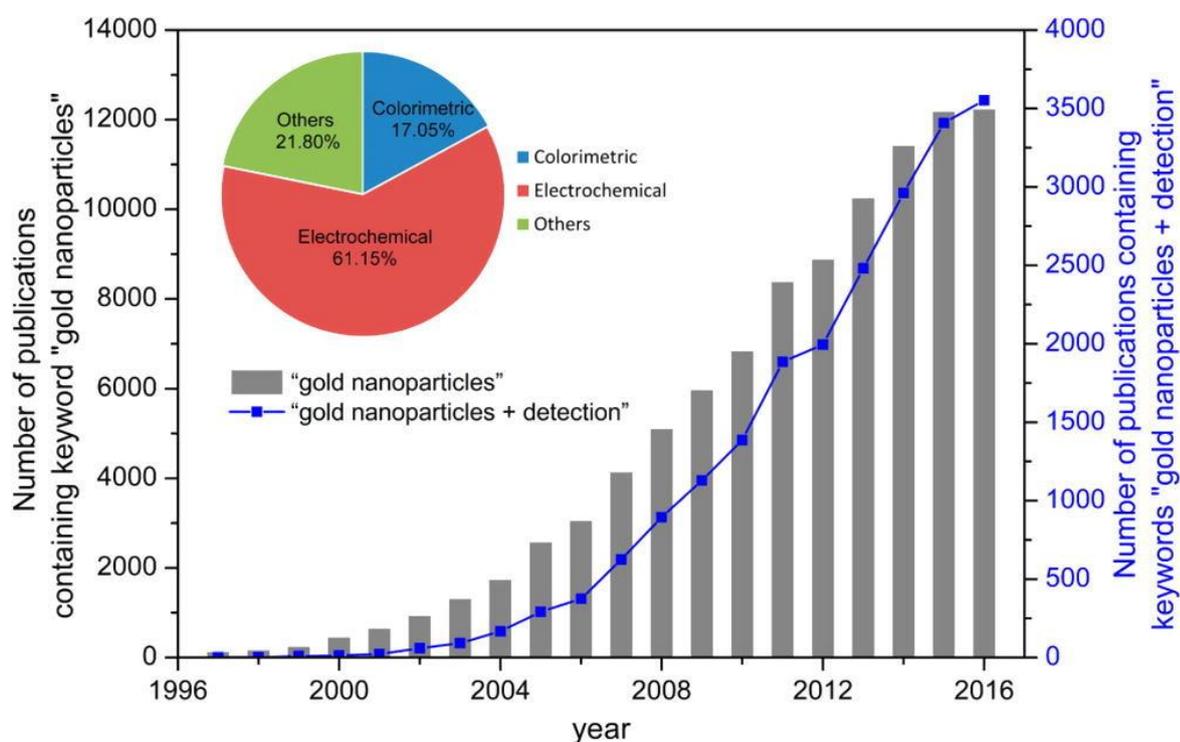


Figure 29: Nombre de publication sur les nanoparticules d'or et d'argent de 1997 à 2016 [112].

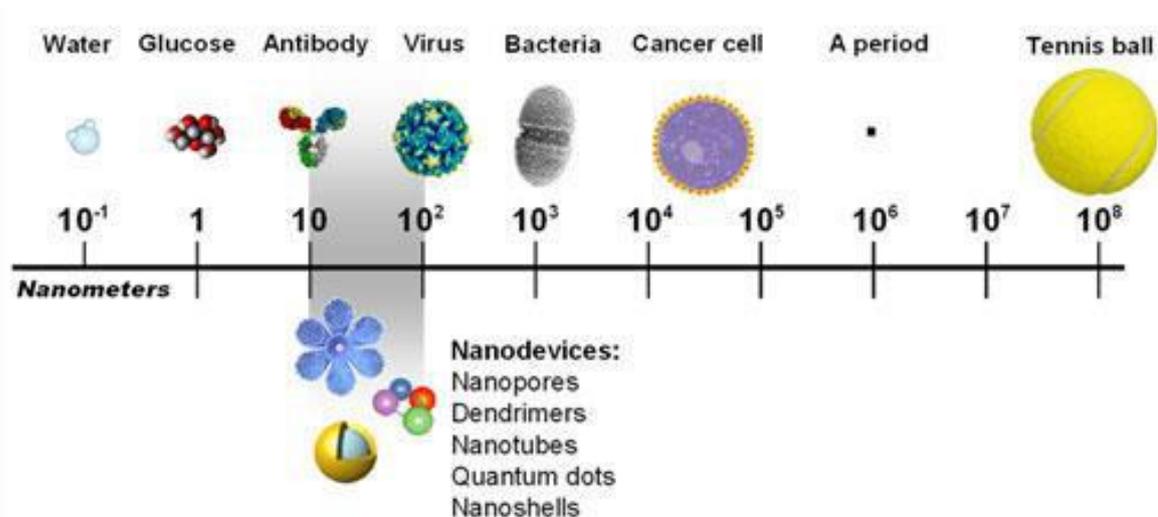


Figure 30: Comparaison de l'ordre de grandeur des nanoparticules et des constituants

Contrairement aux molécules qui diffusent dans l'ensemble de l'organisme, les nanoparticules en raison de leur taille peuvent s'accumuler à l'intérieur de la tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). En effet, lors de l'angiogenèse tumorale, la vascularisation sanguine est perturbée. Cette perturbation se manifeste entre autre par des fenestrations de l'ordre de (400~600 nm) entre les cellules endothéliales au lieu de 3-5 nm dans les vaisseaux irriguant les tissus sains [113]. Ce qui permet aux nanoparticules de diffuser entre les pores suffisamment larges et de s'accumuler dans la tumeur sans diffuser dans les organes sains. De plus, chaque nanoparticule contient un nombre important d'éléments actifs (exemple : atomes à haut Z pour la radiosensibilisation, d'ions Gd^{3+} pour l'IRM) plus élevé que les molécules ($10-10^6$ vs <10) [114] [115]. Un autre point intéressant dans la comparaison entre les nanoparticules et les sondes moléculaires est leur mode de production. La synthèse de nanoparticules se résume en une seule étape tandis que la synthèse des sondes moléculaires nécessite plusieurs étapes et des réactions en cascade avant d'obtenir le produit final. Un autre avantage avec les nanoparticules est la vectorisation des molécules thérapeutiques toxique (dans le cas de la chimiothérapie). Grâce à leur petite taille et leur biocompatibilité, les nanoparticules peuvent pénétrer dans l'organisme tout en servant de vecteur pour la molécule thérapeutique dans son acheminement jusqu'à la zone cible. Enfin, contrairement aux molécules qui offrent peu des sites disponibles, les nanoparticules peuvent porter un grand nombre de fonctions

différentes. Une grande partie des nanoparticules multifonctionnelles (nanoparticules d'or, d'argent, de silice, de fer, d'oxyde de gadolinium, de quantum dot) possédant des propriétés intéressantes à l'échelle nanométrique, ont été ainsi développées pour combiner différentes modalités d'imagerie (IRM/Optique, TEMP/CT, TEP/CT, TEMP/IRM). Parmi toutes les possibilités de combiner ces modalités d'imagerie, l'imagerie simultanée IRM/TEP est très attrayante. Elle allie l'excellente résolution anatomique de l'IRM à la très grande sensibilité de la TEP. Récemment, le groupe d'Olivier Tillement a développé des nanoparticules AGulx pour l'imagerie simultanée IRM/TEP [116]. Elles sont constituées d'un réseau de polysiloxane fonctionnalisé par deux chélateurs différents DOTAGA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1-glutarique -4,7,10-triacétique) et NODAGA (acide 1,4,7-triazacyclononane-1-glutarique -4,7-diacétique) capables de former des complexes stables respectivement avec les ions gadolinium (Gd^{3+}) pour l'IRM et les ions cuivre-64 ($^{64}Cu^{2+}$) pour la TEP. Ces nanoparticules (NP) ultra-petites (<5 nm) ont été suivies *in vivo* par imagerie simultanée IRM/TEP (voir la partie 1.4.2.3.2.).

1.4.2.3.2. Nanoparticules pour l'IRM/TEP

L'imagerie hybride IRM/TEP est une technologie innovante qui consiste à réaliser de manière simultanée l'acquisition de données par imagerie par résonance magnétique (IRM) et par tomographie par émission de positons (TEP), à l'aide d'une seule et même sonde. Elle allie la haute résolution de l'IRM à l'excellente sensibilité de la TEP dans le but de renforcer la fiabilité des diagnostics s'appuyant sur l'imagerie et des études de biodistribution d'agents thérapeutiques.

Pour exploiter les avantages prometteurs de la combinaison (IRM/TEP), il convient de développer des agents d'imagerie à base de nanoparticules multifonctionnelles détectables par les deux techniques d'imagerie. L'utilisation de ces nanoparticules multifonctionnelles présente un grand intérêt pour l'imagerie. Elles peuvent réunir différentes molécules ayant des fonctionnalités différentes à la surface des nanoparticules pour réaliser de l'imagerie *in vivo* et ou pour apporter une fonction thérapeutique. De plus leur taille et leur propriété physico-chimique peuvent être contrôlées pour influencer leur comportement en milieu physiologique *in vivo* [117]. A cet effet, différentes nanoplateformes multifonctionnelles ont été

développées par différentes équipes de recherches. Kim *et al.* ont développé un système bimodal en utilisant des nanoparticules d'oxyde de fer (agent de contraste T₂ pour l'IRM) fonctionnalisées par l'acide d'oléanolique présentant un effet inhibiteur sur la croissance tumorale dans le cas du cancer du colon et du chélateur NOTA-⁶⁸Ga pour imagerie TEP [118]. Dans cette étude, les auteurs ont travaillé sur des souris mâles porteuses de tumeur HT-29. Les images IRM/TEP ont été obtenues par fusion des images de l'IRM et la TEP comme illustré dans la figure 31, Kim *et al.* ont démontré que ces nanosondes (IONP-OA-NOTA-Ga) pourraient être intéressantes pour réaliser une imagerie IRM/TEP simultanée.

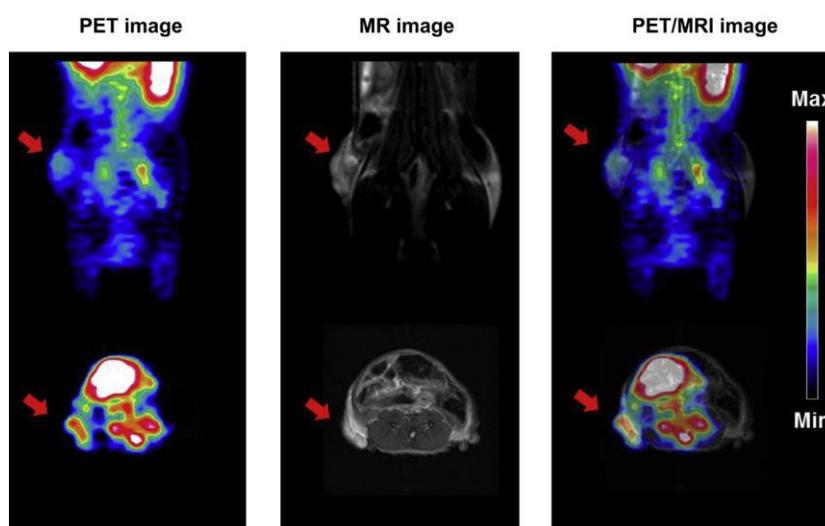


Figure 31: TEP, IRM et fusion IRM/TEP, après injection intraveineuse de nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par OA et NOTA-Ga à une souris porteuse de tumeur HT-29 [118].

Dans une autre étude *in vivo* réalisée à partir des nanoparticules AGulX recouvertes par deux types de ligands macrocycliques (DOTAGA et NODAGA) pour immobiliser respectivement les ions (Gd^{3+}) et (^{68}Ga), Truillet *et al.* ont étudié le potentiel de ces nanoparticules en tant que sonde d'imagerie bimodale IRM/TEP. Après synthèse, les nanoparticules AGulX qui sont caractérisées par un très faible diamètre hydrodynamique ($D_h = 2,5$ nm) ont été radiomarquées avec un rendement de plus de 97%. Par la suite, Truillet *et al.* ont étudié la biodistribution des nanoparticules d'AGulx par IRM/TEP grâce à la présence des ions Gd^{3+} (IRM) et $^{68}Ga^{3+}$ (TEP). Les images IRM/TEP obtenues par fusion des images de l'IRM et la TEP ont confirmé une élimination rapide des nanoparticules d'AGulX par voie

rénale (Figure 32) [116]. Encore une fois, les auteurs ont démontré la complémentarité des deux modalités d'imagerie et l'utilité de développer des nanosondes multimodales.

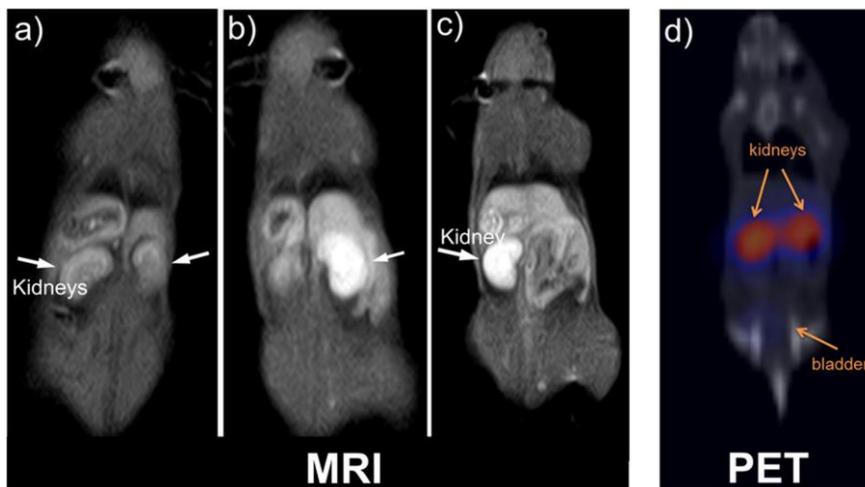


Figure 32: Les images IRM / TEP sur la même souris avec des nanoparticules d'AGuIX : (a – c) les images IRM d'une souris mâle après injection de 20 μmol d'une suspension de nanoparticules AGuIX solution, 60 min avant l'examen par IRM. (d) une image TEP / TDM avec 0,925 MBq de $^{68}\text{Ga-AGuIX}$ (volume injecté: 150 μl) et placé sur un tampon de polystyrène chaud pendant 30 min [116].

Récemment dans une étude similaire, Vu-Long *et al.* ont développé une voie d'accès alternative aux AGuIX (D_h inférieur à 5 nm) pour imagerie simultanée IRM/TEP. Les nanoparticules de polysiloxane portent deux types de chélateurs différents, DOTAGA pour complexer les ions (Gd^{3+}) et NODAGA pour immobiliser le cuivre-64 ($^{64}\text{Cu}^{2+}$) [119].

Après synthèse, les nanoparticules de polysiloxane fonctionnalisées par des chélateurs de gadolinium ont été caractérisées par différentes techniques de caractérisation (DLS, potentiel zêta, étude de stabilité, complexation à l'euprotium etc.) avant d'être radiomarquées au cuivre-64. Ensuite, Vu-Long *et al.* ont étudié la biodistribution de ces nanoparticules doublement marquées au gadolinium et au cuivre-64 par imagerie simultanée IRM/TEP après injection intraveineuse à des souris mâles porteuses d'une tumeur TS/A. Les images IRM, TEP et la fusion des images IRM/TEP ont montré une co-localisation de la radioactivité (TEP) et du signal de l'IRM dans la région des reins (Figure 33) [119]. Les images ont

confirmé également une élimination rapide des nanoparticules et une faible accumulation dans la tumeur (Figure 33).

Une fois de plus, les auteurs ont démontré la complémentarité des deux modalités d'imagerie et l'utilité de développer des nanosondes bimodales IRM/TEP.

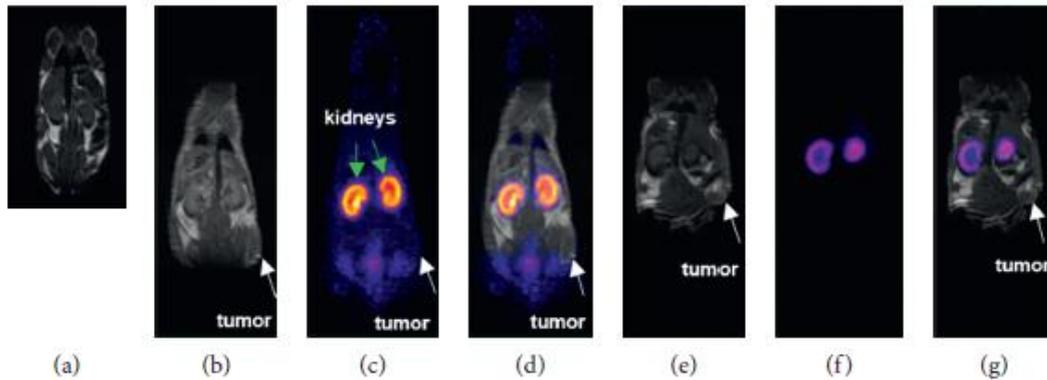


Figure 33: Images coronales IRM / TEP simultanées de souris porteuses de tumeurs TS/A (flèches blanches) après injection de SiGdNP@N-1(^{64}Cu) nanoparticule. (a) contrôle l'image IRM pondérée en T1 d'une souris en bonne santé; (b) IRM T1 d'une souris portant une tumeur TS/A; (c) l'image TEP et (d) fusion des images IRM/TEP d'une souris portant une tumeur TS/A, 1 h après l'injection; (e) IRM T1; (f) TEP et (g) fusion des images IRM/TEP de souris porteuse d'une tumeur TS/A, 24 heures après l'injection [119].

En parallèle, dans le cadre d'un essai préliminaire réalisé au cours de la thèse de Gautier LAURENT, notre laboratoire a montré que les nanoparticules d'or recouvertes par le chélateur macrocyclique TADOTAGA (Au@TADOTAGA) pouvaient être co-marquées à la fois par les ions gadolinium (Gd^{3+}) et par les ions cuivre-64 ($^{64}\text{Cu}^{2+}$). Malheureusement le relargage massif du radioisotope après injection intraveineuse a été constaté sur les images TEP (Figure 34). Ce relargage massif du cuivre-64 a indiqué que le chélateur TADOTAGA n'était pas adapté pour immobiliser le cuivre-64 à la surface des nanoparticules d'or dans l'organisme.

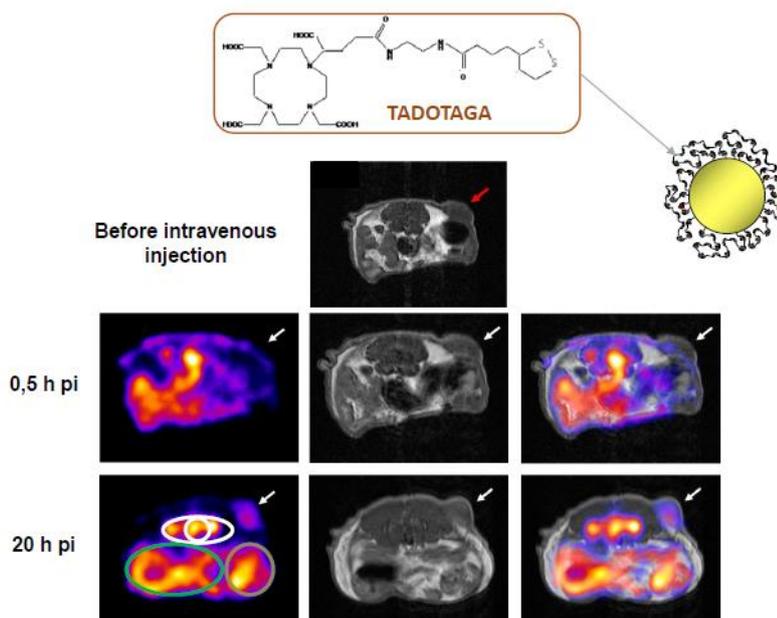


Figure 34: Etude de la biodistribution in vivo de nanoparticule d'or Au@TADOTAGA(Gd + ^{64}Cu) suivi par IRM/TEP : La première colonne correspond aux images TEP, la deuxième aux images IRM (T1) et la troisième à la fusion des images IRM/TEP.

1.5. Présentation de la thèse

Les travaux de ma thèse s'inscrivent dans la continuité de la thèse de Gautier LAURENT. D'après les conclusions tirées des travaux de Gautier LAURENT et des données de la littérature, nous avons conclu qu'il n'y avait pas de chélateur universel. Il fallait donc élaborer des stratégies pour immobiliser les ions gadolinium pour l'IRM et les ions cuivre, gallium ou zirconium pour la TEP par deux chélateurs différents sur une même nanoparticule d'or. Cette conclusion constitue le point de départ de mes travaux de thèse qui ont été consacrés au développement de nanoparticules fonctionnalisées par deux types de chélateurs différents. Pour cela, nous avons identifié deux stratégies principales pour synthétiser des nanoparticules recouvertes par deux types de chélateurs différents.

❖ La première stratégie consiste en la réduction du sel d'or en présence de deux molécules différentes, composées chacune d'un site d'ancrage (dérivé de l'acide thioctique qui comporte deux atomes de soufre pour assurer une immobilisation solide et durable) et d'un site de complexation. Le choix du site de complexation dépend de la nature des ions à immobiliser. Dans tous les cas, les nanoparticules seront fonctionnalisées par les ions gadolinium pour assurer un

suivi en IRM. Pour cette raison, la couche organique qui recouvre chacune des nanoparticules développées au cours de cette thèse contient le macrocycle DOTAGA. Pour le suivi simultané en TEP, nous avons concentré nos efforts sur l'immobilisation des ions cuivre-64 ($^{64}\text{Cu}^{2+}$) et des ions zirconium-89 ($^{89}\text{Zr}^{4+}$). Afin d'immobiliser les ions cuivre-64, le dérivé macrocyclique NODAGA a été choisi alors que la DFO, dont la capacité à former des complexes stables avec les ions zirconium-89 est rapportée dans la littérature, a été retenue pour radiomarquer les nanoparticules d'or avec cet émetteur de positon.

❖ La deuxième stratégie repose sur l'utilisation d'une plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-NODAGA] comportant un site d'ancrage et un bras espaceur terminé à chacune de ses deux extrémités par un chélateur différent. En l'occurrence, cette plateforme moléculaire porte un dérivé DOTAGA pour la complexation des ions gadolinium et un dérivé NODAGA pour l'immobilisation des ions cuivre-64. Au lieu de réaliser la réduction du sel d'or en présence d'un mélange de chélateur, nous proposerons au travers de cette stratégie de réduire le sel d'or en présence d'un seul type de molécules mais possédant deux sites de complexation.

Les chélateurs utilisés au cours de mes travaux de thèse sont pour la plupart originaux et ont été développés dans le cadre de la thèse de Vivek THAKARE de l'ICMUB (UB, Dijon). L'architecture des molécules a été discutée entre notre équipe et celle du Pr Franck DENAT (ICMUB) en tenant compte de nos besoins et des contraintes liées à la synthèse de ces différentes molécules (Figure 32). L'objectif principal de ces nanoplateformes est de pouvoir les suivre simultanément par imagerie IRM/TEP après injection intraveineuse sur le même animal.

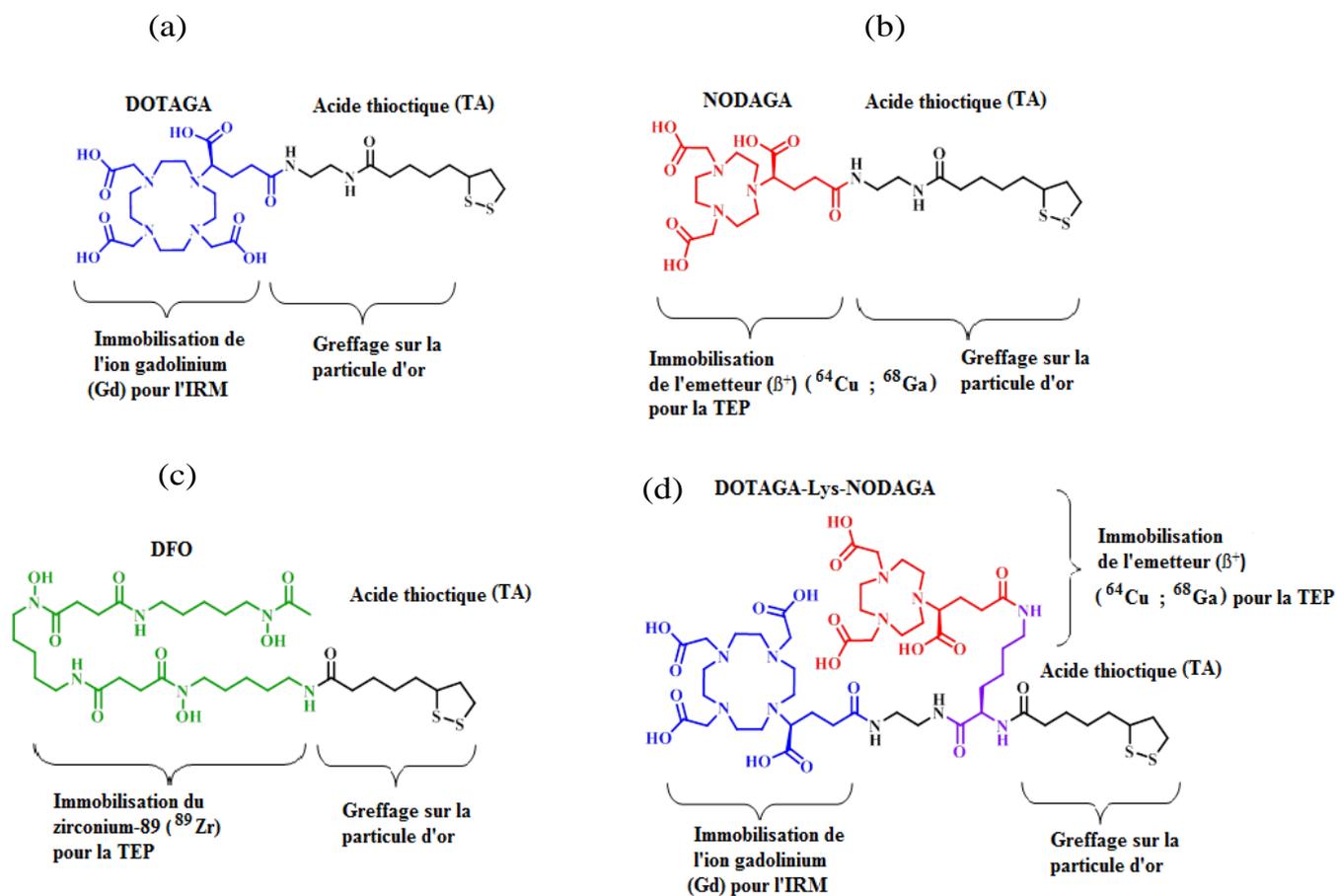


Figure 35: Formules topologiques des différents chélateurs (a) TADOTAGA, (b) (TANODAGA), (c) TADFO, (d) TA[DOTAGA-Lys-NODAGA].

Références bibliographiques

- [1] M. Tubiana, « [Wilhelm Conrad Röntgen and the discovery of X-rays] », *Bull. Acad. Natl. Med.*, vol. 180, n° 1, p. 97-108, janv. 1996.
- [2] S. F. Keevil, « Magnetic resonance imaging in medicine », *Phys. Educ.*, vol. 36, n° 6, p. 476-485, septembre 2001.
- [3] M. T. Truong *et al.*, « Brachial Plexus Contouring with CT and MR Imaging in Radiation Therapy Planning for Head and Neck Cancer », *RadioGraphics*, vol. 30, n° 4, p. 1095-1103, juill. 2010.
- [4] J. S. Eo, J. C. Paeng, et D. S. Lee, « Nuclear imaging for functional evaluation and theragnosis in liver malignancy and transplantation », *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, n° 18, p. 5375-5388, mai 2014.
- [5] E. Miele *et al.*, « Positron Emission Tomography (PET) radiotracers in oncology – utility of 18F-Fluoro-deoxy-glucose (FDG)-PET in the management of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) », *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 27, n° 1, p. 52, oct. 2008.
- [6] X. Li, X.-N. Zhang, X.-D. Li, et J. Chang, « Multimodality imaging in nanomedicine and nanotheranostics », *Cancer Biol. Med.*, vol. 13, n° 3, p. 339-348-348, sept. 2016.
- [7] S. Lee, J. Xie, et X. Chen, « Activatable Molecular Probes for Cancer Imaging », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 10, n° 11, p. 1135-1144, 2010.
- [8] S. Chapman *et al.*, « Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise », *Nano Today*, vol. 8, n° 5, p. 454-460, oct. 2013.
- [9] K. Garala et S. Patil, « Radiography, anatomy and imaging in pelvic fractures », *Orthop. Trauma*, vol. 32, n° 2, p. 71-79, avr. 2018.
- [10] L. Saba *et al.*, « Radiation dose and image quality of computed tomography of the supra-aortic arteries: A comparison between single-source and dual-source CT Scanners », *J. Neuroradiol.*, vol. 45, n° 2, p. 136-141, mars 2018.
- [11] D. J. Brenner et E. J. Hall, « Computed Tomography — An Increasing Source of Radiation Exposure », *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, n° 22, p. 2277-2284, nov. 2007.
- [12] T. C. Soesbe, M. A. Lewis, K. Nasr, L. Ananthakrishnan, et R. E. Lenkinski, « Separating High-Z Oral Contrast From Intravascular Iodine Contrast in an Animal Model Using Dual-Layer Spectral CT », *Acad. Radiol.*, oct. 2018.
- [13] J. J. Pasternak et E. E. Williamson, « Clinical Pharmacology, Uses, and Adverse Reactions of Iodinated Contrast Agents: A Primer for the Non-radiologist », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 87, n° 4, p. 390-402, avr. 2012.
- [14] H. R. Chung, « Iodine and thyroid function », *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 19, n° 1, p. 8-12, mars 2014.
- [15] HAS - Direction de l'Évaluation Médicale, Économique et de Santé Publique, « Produits de contraste iodés ». 2012.
- [16] W. Bottinor, P. Polkampally, et I. Jovin, « Adverse Reactions to Iodinated Contrast Media », *Int. J. Angiol. Off. Publ. Int. Coll. Angiol. Inc*, vol. 22, n° 3, p. 149-154, sept. 2013.
- [17] D. C. Lenhard *et al.*, « The osmolality of nonionic, iodinated contrast agents as an important factor for renal safety », *Invest. Radiol.*, vol. 47, n° 9, p. 503-510, sept. 2012.

- [18] « Nobel Prize for MRI Imaging Denied to Raymond V. Damadian a Decade Ago ». [En ligne]. Disponible sur: <http://chemeducator.org/bibs/0019001/19140073.html>. [Consulté le: 16-févr-2018].
- [19] Andre S. Merbach, Lothar Helm, Éva Tóth (2013). *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, 2nd Edition: Wiley, 512 pages.
- [20] H. T. Ta *et al.*, « Molecular imaging of activated platelets via antibody-targeted ultra-small iron oxide nanoparticles displaying unique dual MRI contrast », *Biomaterials*, vol. 134, p. 31-42, juill. 2017.
- [21] M. A. Shampo et R. A. Kyle, « Felix Bloch—Developer of Magnetic Resonance Imaging », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 70, n° 9, p. 889, sept. 1995.
- [22] C. Alric *et al.*, « The Design of Hybrid Nanoparticles for Image-Guided Radiotherapy », in *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine, and Bioelectronic Devices Volume 2*, vol. 1113, 0 vol., American Chemical Society, 2012, p. 95-143.
- [23] R. G. Pautler, « Mouse MRI: Concepts and Applications in Physiology », *Physiology*, vol. 19, n° 4, p. 168-175, août 2004.
- [24] K. C. P. Li, R. G. Quisling, F. E. Armitage, D. Richardson, et C. Mladinich, « In vivo MR evaluation of Gd-DTPA conjugated to dextran in normal rabbits », *Magn. Reson. Imaging*, vol. 10, n° 3, p. 439-444, janv. 1992.
- [25] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, et I. Lukes, « Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes », *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003, n° 23, p. 3027-3047, juin 2008.
- [26] S. Amet *et al.*, « Étude prospective sur la fibrose néphrogénique systémique après administration de produits de contraste chez les patients hémodialysés : résultats de l'étude Pro-Finest ».
- [27] L'AUTORITE DE L'ANSM, « Produits de contraste à base de gadolinium et rétention de gadolinium dans le cerveau et dans d'autres tissus : suspension des AMM de l'acide gadopentétique et du gadodiamide utilisés en intraveineux, restriction de l'AMM de l'acide gadobénique à l'imagerie du foie et modification de l'information des autres spécialités maintenues ». 2018.
- [28] S. Goel, C. G. England, F. Chen, et W. Cai, « Positron emission tomography and nanotechnology: A dynamic duo for cancer theranostics », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 113, p. 157-176, avr. 2017.
- [29] F. L. Besson, V. Lebon, et E. Durand, « What are we expecting from PET/MRI? », *Médecine Nucl.*, vol. 40, n° 1, p. 31-40, févr. 2016.
- [30] R. Huang, M. Wang, Y. Zhu, P. S. Conti, et K. Chen, « Development of PET probes for cancer imaging », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, n° 8, p. 795-819, 2015.
- [31] M. P. Taggart *et al.*, « Development of radiodetection systems towards miniaturised quality control of PET and SPECT radiopharmaceuticals », *Lab. Chip*, vol. 16, n° 9, p. 1605-1616, avr. 2016.
- [32] R. L. Cowan et R. Kessler, « SPECT Imaging », in *Encyclopedia of Psychopharmacology*, I. P. Stolerman, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 1266-1270.
- [33] A. Mhiri, I. Slim, et M. Slimène, « Dosimetry estimation of SPECT/CT for iodine 123-labeled metaiodobenzylguanidine in children », *Int. J. Cancer Ther. Oncol.*, vol. 3, n° 3, sept. 2015.

- [34] J. Llop *et al.*, « Visualisation of dual radiolabelled poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle degradation in vivo using energy-discriminant SPECT », *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, n° 30, p. 6293-6300, juill. 2015.
- [35] M. D. Martin Krupa, B. S. Rina Nguyen, D. O. Jonathan Revels, et M. D. Lester S. Johnson, « Technetium-99m pyrophosphate cardiac SPECT in endomyocardial biopsy negative cardiac amyloidosis », *Radiol. Case Rep.*, vol. 13, n° 5, p. 925-928, oct. 2018.
- [36] I. Jurić *et al.*, « The Significance of Thallium-201-Chloride SPECT Myocardial Perfusion Imaging in the Management of Patients With Stable Chronic Coronary Artery Disease », *Clin. Med. Insights Cardiol.*, vol. 12, juill. 2018.
- [37] M. C. Fogarasi, R. S. Zelkowitz, S. A. Messana, J. A. Arrighi, J. P. Seibyl, et S. Kummar, « Positron Emission Tomography for the Evaluation of Patients with Colorectal Cancer », *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 1, n° 2, p. 117-120, août 2001.
- [38] N. D. Volkow, B. Rosen, et L. Farde, « Imaging the living human brain: magnetic resonance imaging and positron emission tomography », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, n° 7, p. 2787-2788, avr. 1997.
- [39] S. L. Kitson, V. Cuccurullo, A. Ciarmiello, et D. S. and L. Mansi, « Clinical Applications of Positron Emission Tomography (PET) Imaging in Medicine: Oncology, Brain Diseases and Cardiology », *Current Radiopharmaceuticals*, 30-sept-2009.
- [40] B. Khanal *et al.*, « EchoFusion: Tracking and Reconstruction of Objects in 4D Freehand Ultrasound Imaging without External Trackers », *ArXiv180710583 Cs Stat*, juill. 2018.
- [41] A. A. Orazmuradov *et al.*, « Results of Fetal Ultrasound Imaging and Doppler Ultrasound Study in Pregnant Women with Extragenital Pathology », *Int. J. Biomed.*, vol. 8, n° 3, p. 206-212, sept. 2018.
- [42] « Échographie | Votre espace STL ». [En ligne]. Disponible sur: <http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/lexique/echographie/>. [Consulté le: 25-oct-2018].
- [43] J. Knez, A. Day, et D. Jurkovic, « Ultrasound imaging in the management of bleeding and pain in early pregnancy », *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 28, n° 5, p. 621-636, juill. 2014.
- [44] F. Calliada, R. Campani, O. Bottinelli, A. Bozzini, et M. G. Sommaruga, « Ultrasound contrast agents: Basic principles », *Eur. J. Radiol.*, vol. 27, p. S157-S160, mai 1998.
- [45] E. Quaia, « Microbubble ultrasound contrast agents: an update », *Eur. Radiol.*, vol. 17, n° 8, p. 1995-2008, août 2007.
- [46] J. Geleijns et J. Wondergem, « X-ray imaging and the skin: radiation biology, patient dosimetry and observed effects », *Radiat. Prot. Dosimetry*, vol. 114, n° 1-3, p. 121-125, 2005.
- [47] S. Mallidi, G. P. Luke, et S. Emelianov, « Photoacoustic imaging in cancer detection, diagnosis, and treatment guidance », *Trends Biotechnol.*, vol. 29, n° 5, p. 213-221, mai 2011.
- [48] E. M. Strohm, M. J. Moore, et M. C. Kolios, « High resolution ultrasound and photoacoustic imaging of single cells », *Photoacoustics*, vol. 4, n° 1, p. 36-42, janv. 2016.

- [49] M. Li, Y. Tang, et J. Yao, « Photoacoustic tomography of blood oxygenation: A mini review », *Photoacoustics*, vol. 10, p. 65-73, mai 2018.
- [50] J. Weber, P. C. Beard, et S. E. Bohndiek, « Contrast agents for molecular photoacoustic imaging », *Nat. Methods*, vol. 13, n° 8, p. 639-650, août 2016.
- [51] D. Wu, L. Huang, M. S. Jiang, et H. Jiang, « Contrast Agents for Photoacoustic and Thermoacoustic Imaging: A Review », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, n° 12, p. 23616-23639, déc. 2014.
- [52] N. N. Boustany, S. A. Boppart, et V. Backman, « Microscopic Imaging and Spectroscopy with Scattered Light », *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 12, n° 1, p. 285-314, juill. 2010.
- [53] L. G. Freidus, P. Pradeep, P. Kumar, Y. E. Choonara, et V. Pillay, « Alternative fluorophores designed for advanced molecular imaging », *Drug Discov. Today*, vol. 23, n° 1, p. 115-133, janv. 2018.
- [54] C.-L. Sun *et al.*, « Ultrabright organic fluorescent microparticles for in vivo tracing applications », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 45, p. 7226-7232, nov. 2016.
- [55] N. Chen *et al.*, « Cy5.5 conjugated MnO nanoparticles for magnetic resonance/near-infrared fluorescence dual-modal imaging of brain gliomas », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 457, p. 27-34, nov. 2015.
- [56] D. P. Bhopate, P. G. Mahajan, K. M. Garadkar, G. B. Kolekar, et S. R. Patil, « Pyrene nanoparticles as a novel FRET probe for detection of rhodamine 6G: spectroscopic ruler for textile effluent », *RSC Adv.*, vol. 4, n° 109, p. 63866-63874, nov. 2014.
- [57] S. F. Chin, A. Azman, S. C. Pang, et S. M. Ng, « Fluorescein-Labeled Starch Maleate Nanoparticles as Sensitive Fluorescent Sensing Probes for Metal Ions », *Journal of Nanomaterials*, 2014. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2014/108359/>. [Consulté le: 21-mai-2019].
- [58] L. D. Lavis et R. T. Raines, « Bright ideas for chemical biology », *ACS Chem. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. 142-155, mars 2008.
- [59] S.-P. Kwon *et al.*, « Thrombin-activatable fluorescent peptide incorporated gold nanoparticles for dual optical/computed tomography thrombus imaging », *Biomaterials*, vol. 150, p. 125-136, janv. 2018.
- [60] « tableau périodique lanthanides - Recherche Google ». [En ligne].
- [61] S. V. Eliseeva *et al.*, « Dimeric Complexes of Lanthanide(III) Hexafluoroacetylacetonates with 4-Cyanopyridine N-Oxide: Synthesis, Crystal Structure, Magnetic and Photoluminescent Properties », *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2006, n° 23, p. 4809-4820, 2006.
- [62] F.-M. Lu et Z. Yuan, « PET/SPECT molecular imaging in clinical neuroscience: recent advances in the investigation of CNS diseases », *Quant. Imaging Med. Surg.*, vol. 5, n° 3, p. 433-447, juin 2015.
- [63] L. Josephson, M. F. Kircher, U. Mahmood, Y. Tang, et R. Weissleder, « Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes », *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, n° 3, p. 554-560, juin 2002.
- [64] S. K. Pandey *et al.*, « Multimodality Agents for Tumor Imaging (PET, Fluorescence) and Photodynamic Therapy. A Possible "See and Treat" Approach », *J. Med. Chem.*, vol. 48, n° 20, p. 6286-6295, oct. 2005.

- [65] B. Bybel, R. C. Brunken, F. P. DiFilippo, D. R. Neumann, G. Wu, et M. D. Cerqueira, « SPECT/CT Imaging: Clinical Utility of an Emerging Technology », *RadioGraphics*, vol. 28, n° 4, p. 1097-1113, juill. 2008.
- [66] « IMAPPI - Installation du prototype préclinique de TEP-IRM intégrés », *CGFL*, 22-juin-2017. .
- [67] M. M. Alauddin, « Positron emission tomography (PET) imaging with 18F-based radiotracers », *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 2, n° 1, p. 55-76, déc. 2011.
- [68] Perrine Tylski, « Caractérisation des tumeurs et de leur évolution en TEP/TDM au 18F-FDG ». 2009.
- [69] Sybille Kennel, « Synthèse de traceurs bimodaux utilisables en imagerie médicale TEP/IRM ». 2015.
- [70] V. Jacques, S. Dumas, W.-C. Sun, J. S. Troughton, M. T. Greenfield, et P. Caravan, « High relaxivity MRI contrast agents part 2: Optimization of inner- and second-sphere relaxivity », *Invest. Radiol.*, vol. 45, n° 10, p. 613-624, oct. 2010.
- [71] G.-P. Yan, L. Robinson, et P. Hogg, « Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspectives », *Radiography*, vol. 13, p. e5-e19, déc. 2007.
- [72] G.-L. Davies, I. Kramberger, et J. J. Davis, « Environmentally responsive MRI contrast agents », *Chem. Commun.*, vol. 49, n° 84, p. 9704-9721, sept. 2013.
- [73] V. M. Runge, J. A. Clanton, C. M. Lukehart, C. L. Partain, et A. E. James, « Paramagnetic agents for contrast-enhanced NMR imaging: a review », *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 141, n° 6, p. 1209-1215, déc. 1983.
- [74] A. Mignot *et al.*, « A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications », *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 19, n° 19, p. 6122-6136, mai 2013.
- [75] C. Alric *et al.*, « Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 18, p. 5908-5915, mai 2008.
- [76] M. O. Ansari, M. F. Ahmad, G. G. H. A. Shadab, et H. R. Siddique, « Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer », *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 177-183, juin 2018.
- [77] H. Shokrollahi, « Contrast agents for MRI », *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, n° 8, p. 4485-4497, déc. 2013.
- [78] C. Burtea *et al.*, « In vitro biomedical applications of functionalized iron oxide nanoparticles, including those not related to magnetic properties », *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 6, n° 4, p. 236-250, août 2011.
- [79] P. D. Benny et A. L. Moore, « Recent Advances in the Probe Development of Technetium-99m Molecular Imaging Agents », août-2011.
- [80] H. J. K. Ananias *et al.*, « Application of 99mTechnetium-HYNIC(tricine/TPPTS)-Aca-Bombesin(7-14) SPECT/CT in prostate cancer patients: A first-in-man study », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, n° 7, p. 933-938, oct. 2013.
- [81] L. O. F. Monteiro *et al.*, « Technetium-99m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer in vivo », *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.*, vol. 89, p. 146-151, mai 2017.

- [82] S. Jones et O. Merkel, « Indium-Labeling of siRNA for Small Animal SPECT Imaging », *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1372, p. 79-88, 2016.
- [83] C. H. J. Muselaers, O. C. Boerman, E. Oosterwijk, J. F. Langenhuijsen, W. J. G. Oyen, et P. F. A. Mulders, « Indium-111-labeled Girentuximab ImmunoSPECT as a Diagnostic Tool in Clear Cell Renal Cell Carcinoma », *Eur. Urol.*, vol. 63, n° 6, p. 1101-1106, juin 2013.
- [84] J. De Agustin, S. Kalhan, et E. Grisoni, « Indium 111 oxine-labeled leukocytes for early diagnosis of ischemic enterocolitis », *J. Pediatr. Surg.*, vol. 26, n° 9, p. 1039-1042, sept. 1991.
- [85] V. Kumar et D. K. Boddeti, « (68)Ga-radiopharmaceuticals for PET imaging of infection and inflammation », *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer*, vol. 194, p. 189-219, 2013.
- [86] D. El-Maouche *et al.*, « 68Ga-DOTATATE for Tumor Localization in Tumor-Induced Osteomalacia », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, n° 10, p. 3575-3581, 2016.
- [87] V. Ambrosini, C. Nanni, et S. Fanti, « The use of gallium-68 labeled somatostatin receptors in PET/CT imaging », *PET Clin.*, vol. 9, n° 3, p. 323-329, juill. 2014.
- [88] A. Sasikumar, « Specificity of 68Ga-PSMA PET/CT for Prostate Cancer - Myths and Reality », *Indian J. Nucl. Med. IJNM Off. J. Soc. Nucl. Med. India*, vol. 32, n° 1, p. 11-12, 2017.
- [89] A. I. Jensen *et al.*, « PET imaging with copper-64 as a tool for real-time in vivo investigations of the necessity for cross-linking of polymeric micelles in nanomedicine », *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 60, n° 8, p. 366-374, juin 2017.
- [90] A. Niccoli Asabella, G. L. Cascini, C. Altini, D. Paparella, A. Notaristefano, et G. Rubini, « The Copper Radioisotopes: A Systematic Review with Special Interest to 64Cu », *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [91] V. Kubíček *et al.*, « NOTA Complexes with Copper(II) and Divalent Metal Ions: Kinetic and Thermodynamic Studies », *Inorg. Chem.*, vol. 57, n° 6, p. 3061-3072, mars 2018.
- [92] G. W. Severin *et al.*, « The impact of weakly bound ⁸⁹Zr on preclinical studies: non-specific accumulation in solid tumors and aspergillus infection », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 42, n° 4, p. 360-368, avr. 2015.
- [93] B. M. Zeglis et J. S. Lewis, « The Bioconjugation and Radiosynthesis of ⁸⁹Zr-DFO-labeled Antibodies », *J. Vis. Exp. JoVE*, n° 96, févr. 2015.
- [94] D. N. Pandya *et al.*, « Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development », *Chem. Sci.*, vol. 8, n° 3, p. 2309-2314, mars 2017.
- [95] M. A. Deri *et al.*, « Alternative Chelator for ⁸⁹Zr Radiopharmaceuticals: Radiolabeling and Evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) », *J. Med. Chem.*, vol. 57, n° 11, p. 4849-4860, juin 2014.
- [96] S. Mahajan et C. R. Divgi, « The role of iodine-124 positron emission tomography in molecular imaging », *Clin. Transl. Imaging*, vol. 4, n° 4, p. 297-306, août 2016.

- [97] S. Zuber *et al.*, « Iodine-125 seed brachytherapy for early stage prostate cancer: a single-institution review », *Radiat. Oncol. Lond. Engl.*, vol. 10, févr. 2015.
- [98] L. Martiniova, L. D. Palatis, E. Etchebehere, et G. Ravizzini, « Gallium-68 in Medical Imaging », *Curr. Radiopharm.*, vol. 9, n° 3, p. 187-207, 2016.
- [99] L. Jiang *et al.*, « Pilot Study of ⁶⁴Cu(I) for PET Imaging of Melanoma », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 2574, mai 2017.
- [100] S. F. Alanazi, K. S. Alzimami, M. M. Ghannam, I. J. Aljammaz, F. Alrumayan, et S. A. Sassi, « Quantitative imaging characteristics of zirconium-89 on Gemini Time-Of-Flight PET/CT », *Nucl. Med. Commun.*, vol. 37, n° 12, p. 1238-1245, déc. 2016.
- [101] J. Lux, A. G. White, M. Chan, C. J. Anderson, et A. Almutairi, « Nanogels from metal-chelating crosslinkers as versatile platforms applied to copper-64 PET imaging of tumors and metastases », *Theranostics*, vol. 5, n° 3, p. 277-288, 2015.
- [102] S. C. Ghosh *et al.*, « Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for (⁶⁴)Cu-labeled immunoconjugates », *Nucl. Med. Biol.*, vol. 42, n° 2, p. 177-183, févr. 2015.
- [103] S. N. Rylova *et al.*, « The somatostatin receptor 2 antagonist ⁶⁴Cu-NODAGA-JR11 outperforms ⁶⁴Cu-DOTA-TATE in a mouse xenograft model », *PLoS ONE*, vol. 13, n° 4, avr. 2018.
- [104] L. Frullano, C. Catana, T. Benner, A. D. Sherry, et P. Caravan, « Bimodal MR-PET agent for quantitative pH imaging », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 49, n° 13, p. 2382-2384, mars 2010.
- [105] M. Suchý et R. H. E. Hudson, « Synthetic Strategies Toward N-Functionalized Cyclens », *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2008, n° 29, p. 4847-4865, 2008.
- [106] N. Vologdin, G. A. Rolla, M. Botta, et L. Tei, « Orthogonal synthesis of a heterodimeric ligand for the development of the Gd(III)-Ga(III) ditopic complex as a potential pH-sensitive MRI/PET probe », *Org. Biomol. Chem.*, vol. 11, n° 10, p. 1683-1690, févr. 2013.
- [107] J. Notni, P. Hermann, I. Dregely, et H.-J. Wester, « Convenient synthesis of (⁶⁸)Ga-labeled gadolinium(III) complexes: towards bimodal responsive probes for functional imaging with PET/MRI », *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 19, n° 38, p. 12602-12606, sept. 2013.
- [108] A. Kumar *et al.*, « Molecular platform for design and synthesis of targeted dual-modality imaging probes », *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, n° 3, p. 549-558, mars 2015.
- [109] B. Bahrami *et al.*, « Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy », *Immunol. Lett.*, vol. 190, p. 64-83, oct. 2017.
- [110] G. Laurent, « Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie. », thesis, Besançon, 2014.
- [111] G. Chuto et P. Chaumet-Riffaud, « Les nanoparticules », *Médecine Nucl.*, vol. 34, n° 6, p. 370-376, juin 2010.
- [112] L. Qin *et al.*, « “Gold rush” in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing », *Coord. Chem. Rev.*, vol. 359, p. 1-31, mars 2018.

- [113] J. W. Nichols et Y. H. Bae, « EPR: Evidence and fallacy », *J. Controlled Release*, vol. 190, p. 451-464, sept. 2014.
- [114] D. A. Scheinberg, C. H. Villa, F. E. Escorcia, et M. R. McDevitt, « Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, n° 5, p. 266-276, mai 2010.
- [115] S. Kunjachan, J. Ehling, G. Storm, F. Kiessling, et T. Lammers, « Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects », *Chem. Rev.*, vol. 115, n° 19, p. 10907-10937, oct. 2015.
- [116] C. Truillet *et al.*, « Ultrasmall particles for Gd-MRI and 68Ga-PET dual imaging », *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 10, n° 4, p. 309-319, juill. 2015.
- [117] S. Parvanian, S. M. Mostafavi, et M. Aghashiri, « Multifunctional nanoparticle developments in cancer diagnosis and treatment », *Sens. Bio-Sens. Res.*, vol. 13, p. 81-87, avr. 2017.
- [118] S. Kim *et al.*, « Hybrid PET/MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle », *Biomaterials*, vol. 34, n° 33, p. 8114-8121, nov. 2013.
- [119] V.-L. Tran *et al.*, « Functionalization of Gadolinium Chelates Silica Nanoparticle through Silane Chemistry for Simultaneous MRI/64Cu PET Imaging », *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2018.

Chapitre 2

Synthèse, caractérisation et étude de la biodistribution des nanosondes multifonctionnelles

Table des matières

Chapitre 2 : Synthèse, caractérisation et étude de la biodistribution des nanosondes multifonctionnelles

2.1 Introduction	1134
2.2 Synthèses et caractérisation des nanosondes IRM/TEP.....	116
2.2.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs	116
2.2.1.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TADFO, Au@(TADOTAGA) _x (TADFO) _y	117
2.2.1.1.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y , (x/y=2).....	117
2.2.1.1.2. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{10y} (TADFO) _y	118
2.2.1.1.3. Purification	119
2.2.1.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TANODAGA, Au@(TADOTAGA) _x (TANODAGA) _y	119
2.2.1.2.1. Première stratégie : marquage après synthèse.....	120
2.2.1.2.1.1 Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA) _{2y} (TANODAGA) _y	120
2.2.1.2.1.2. Marquage après synthèse.....	121
2.2.1.2.2. Deuxième stratégie : marquage avant synthèse	122
2.2.1.2.2.1. Préparation du chélaté	122
2.2.1.2.2.2. Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd)) _{2y} (TANODAGA) _y ,.....	122
2.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par un seul type de molécules mais portant deux sites de coordination spécifiques	123
2.2.2.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA].....	124
2.2.2.2. Purification	125

2.2.3. Lyophilisation.....	125
2.2.4. Caractérisation des nanoparticules synthétisées.....	125
2.2.4.1 La spectrophotométrie UV-visible	125
2.2.4.2. Microscopie électronique en transmission (MET).....	126
2.2.4.3. Diamètre hydrodynamique (D_h)	126
2.2.4.4. Potentiel zêta.....	128
2.2.4.5. Analyse thermogravimétrie (ATG)	128
2.2.4.6. Dosage ICP-AES	129
2.2.4.7. Estimation du nombre de ligands disponibles par dosage de l'ion europium(III)	129
2.2.4.8. Etude de la complexation des ions d'intérêt pour l'imagerie	131
2.2.4.8.1. Etude de la complexation de l'ion gadolinium(III).....	131
2.2.4.8.1.1. Dosage à la température ambiante :	131
2.2.4.8.1.2. Dosage par saturation des sites disponibles des chélateurs à 80°C :	132
2.2.4.8.2. Etude de la complexation de l'ion zirconium (IV)	132
2.2.4.9. Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or	133
2.2.4.9.1. Stabilité à différents pH.....	133
2.2.4.9.2. Stabilité dans le temps et en milieux physiologique	134
2.2.4.9.2.1. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en présence des ions d'intérêt:.....	134
2.2.4.9.2.2. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en absence des ions d'intérêt:.....	135
2.2.4.9.2.3. Milieu aqueux et en présence des ions d'intérêt :	135
2.2.4.9.2.4. Milieu aqueux et en absence des ions d'intérêt:.....	135
2.2.4.10. Radiomarquage et caractérisation du radiomarquage	136
2.2.4.10.1. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)) _x (TADFO) _y avec x/y= 10 et 2 par ⁸⁹ Zr ⁴⁺	136
2.2.4.10.2. Etude de la Stabilité du radiomarquage dans le temps.....	137

2.2.4.10.3. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd) ₂) _y (TANODAGA) _y , et Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64, en présence de l'ion gadolinium (III)	138
2.2.5. Imagerie simultanée IRM/TEP.....	138
2.2.5.1. Appareillage et protocole	138
2.2.5.2. Préparation des animaux avec et sans tumeur.....	139
2.2.5.3. Suspensions injectables	140
2.2.5.4. Comptage gamma.....	140
2.2.5.5. Analyse des organes par ICP-AES.....	140
2.3. Résultats et Discussion	141
2.3.1. Nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateur Au@(TADOTAGA) _x (TADFO) _y (x/y = 10 et 2)	141
2.3.1.1. Morphologie et stabilité colloïdale.....	141
2.3.1.2. Analyse de la couche organique.....	147
2.3.1.3. Marquage des nanoparticules par les ions gadolinium (III) et le radioélément zirconium-89.....	150
2.3.1.4. Etude de la biodistribution <i>in vivo</i>	157
2.3.2. Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA) et Au@(TADOTAGA)(TANODAGA), (x/y=10 et 2).....	162
2.3.3. Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	182
2.3.3.1. La plateforme moléculaire TA[DOTAGA-Lys-NODAGA]	182
2.3.3.2. Synthèse et caractérisation morphologique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	184
2.3.3.3. Stabilité colloïdale des suspensions aqueuses de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].....	185
2.3.3.4. Le radiomarquage des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64.....	189
2.4. Conclusion	195
Références bibliographiques	197

Synthèse, caractérisation et étude de la biodistribution des nanosondes multifonctionnelles

2.1 Introduction

L'objectif principal de ma thèse consiste à développer des nanosondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons choisi sur la base de la littérature et d'expériences préliminaires de synthétiser des nanoparticules d'or fonctionnalisées par deux types de chélateurs macrocycliques différents pour immobiliser à la fois les ions Gd^{3+} pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et $^{64}Cu^{2+}$ ou $^{89}Zr^{4+}$ pour la tomographie par émission de positon (TEP). La fonctionnalisation des nanoparticules d'or par deux sites de complexation peut être réalisée après synthèse des nanoparticules d'or. Cette stratégie nous a paru la moins intéressante car l'ajout post-synthèse et le contrôle de la proportion des chélateurs ajoutés peuvent altérer d'une part la composition et la stabilité colloïdale des nanoparticules et d'autre part le rendement des réactions de couplage est rarement de 100%. Au final, la post-fonctionnalisation produit des nanoparticules avec des surfaces complexes.

A partir de cette réflexion, l'immobilisation des sites de complexation au cours de la formation des cœurs d'or nous a semblé la voie la mieux adaptée. Elle peut être mise en œuvre par application de la méthode de Brust qui consiste à réduire un sel d'or en présence de dérivés organo-soufrés. Ce protocole conduit à la formation de nanoparticules recouvertes par les molécules organosoufrées dont l'immobilisation sur le cœur d'or est assurée par la forte affinité qui existe entre l'or et le soufre. Afin de réaliser la fonctionnalisation des nanoparticules d'or en cours de synthèse par deux sites de complexation différents, nous avons envisagé deux stratégies distinctes. La première consiste à réduire le sel d'or en présence de deux molécules différentes se distinguant par le type de chélateur qu'elles portent alors que la deuxième stratégie repose sur l'utilisation d'une molécule portant deux sites de complexation différents (Figures 36 et 37).

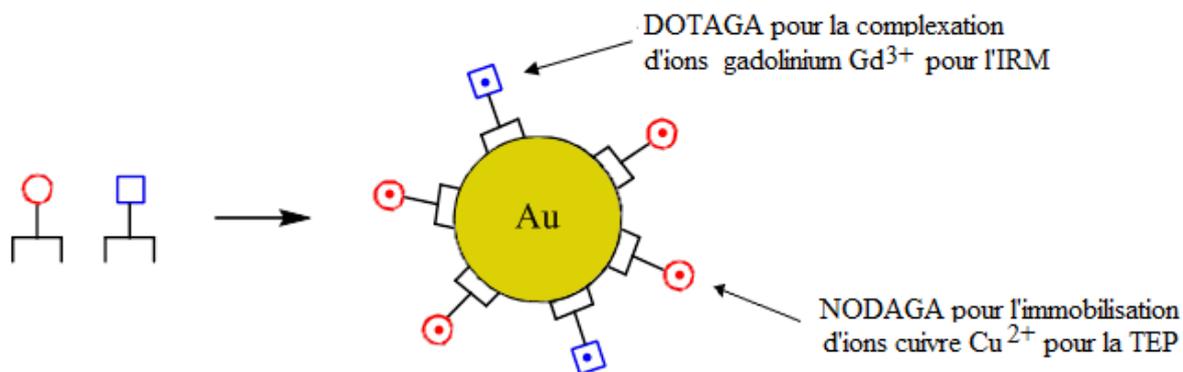


Figure 36 : Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouverte par un mélange de deux chélateurs différents.

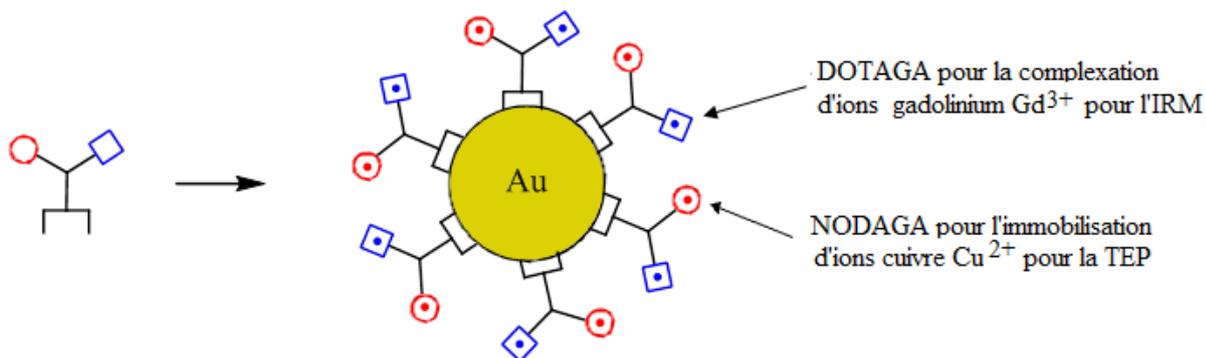


Figure 37 : Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une plateforme moléculaire comprenant deux sites de coordination différents.

En plus du ou des chélateurs, chaque molécule possèdera deux atomes de soufre qui garantiront un ancrage durable sur les cœurs d'or. Sur la base de travaux antérieurs, des membres de l'équipe, les deux atomes de soufre sont introduits dans chacune des différentes molécules par couplage avec l'acide thioactique (TA) [120] (Figure 38).

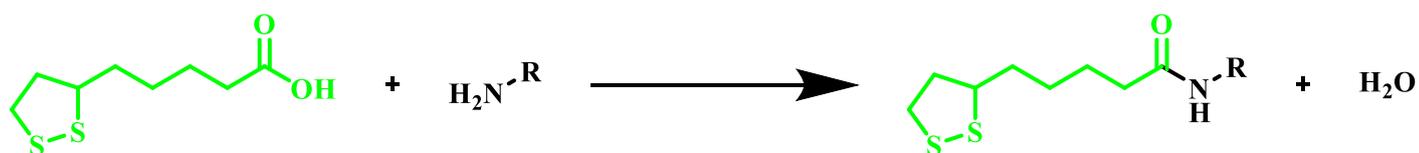


Figure 38 : Schéma de la synthèse de l'acide thioactique (TA) par une amine primaire

Cette stratégie nécessite donc le développement de molécules originales. La discussion engagée avec l'équipe de Pr Franck Denat a conduit à l'élaboration de quatre molécules (TADOTAGA, TANODAGA TADOTAGA-lys-NODAGA, TADFO) dont le protocole de synthèse a été établi au cours de la thèse de Vivek S Thakare (Directeurs de thèse : Pr Franck Denat et Dr Frédéric Boschetti) [121].

Les chélateurs organiques (TADOTAGA, TANODAGA et TADFO) ont été développées pour immobiliser respectivement les ions Gd^{3+} (IRM), $^{64}Cu^{2+}$ (TEP) et $^{89}Zr^{4+}$ (TEP), alors que la molécule TA[DOTAGA-lys-NODAGA] a été conçue pour piéger à la fois les ions Gd^{3+} grâce au macrocycle de type DOTAGA et Cu^{2+} grâce au cycle de type NODAGA (IRM+TEP) (Figure 39). Le suivi simultané de ces nanoparticules d'or par IRM et TEP qui nécessite l'immobilisation sur la même nanoparticule des ions Gd^{3+} et émetteurs de positon ($^{64}Cu^{2+}$ ou $^{89}Zr^{4+}$) pourrait donc être réalisé par des nanoparticules recouvertes de :

- ✓ TADOTAGA(Gd) et TANODAGA(^{64}Cu)
- ✓ TADOTAGA(Gd) et TADFO (^{89}Zr)
- ✓ TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(^{64}Cu)]

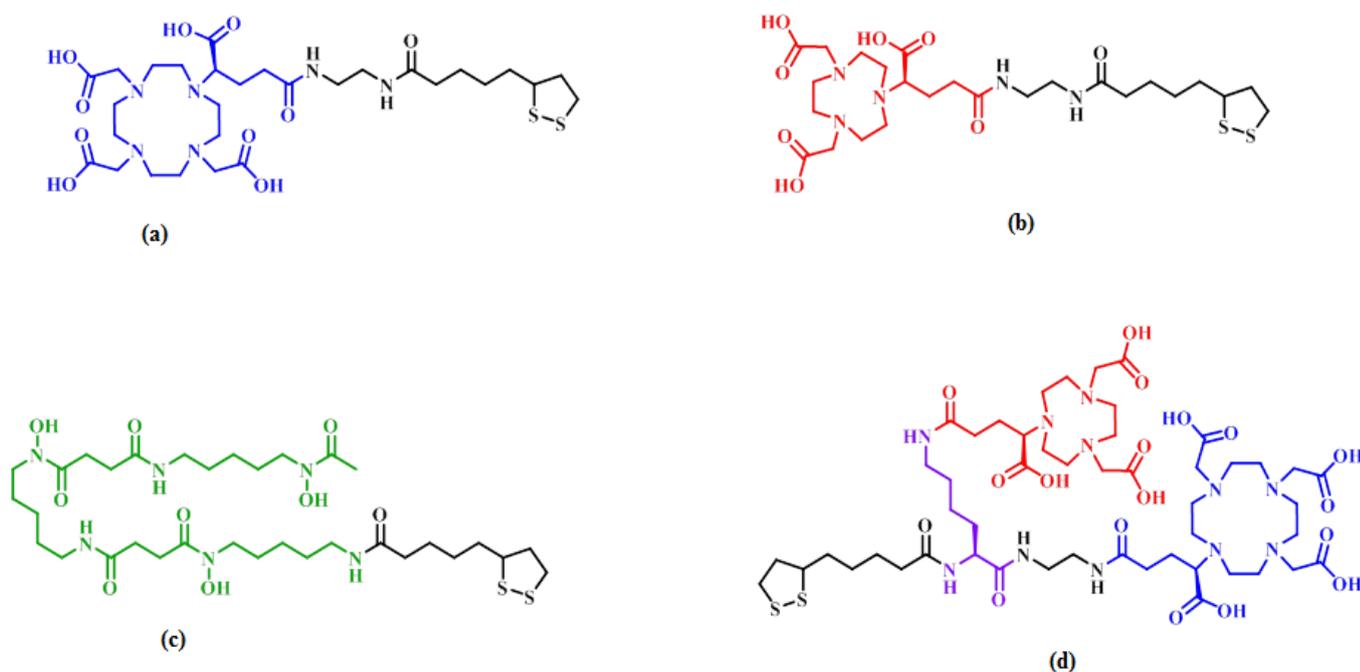


Figure 39 : Formules topologiques des différents chélateurs (a) (TADOTAGA), (b) TANODAGA, (c) TADFO, (d) TA[DOTAGA-lys-TANODAGA].

Ce chapitre décrira la synthèse de ces nanoparticules d'or et leur comportement comme agent de contraste

2.2 Synthèses et caractérisation des nanosondes IRM/TEP

2.2.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs

La première approche pour produire des nanosondes pour l'imagerie simultanée (IRM/TEP) a consisté à synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de deux types différents de chélateurs afin d'immobiliser sur une même nanoparticule à la fois des ions gadolinium pour l'IRM et des ions émetteurs de positons ($^{64}\text{Cu}^{2+}$, $^{89}\text{Zr}^{4+}$) pour la TEP. Deux familles de nanoparticules ont été conçues :

- La première regroupe des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des chélates de gadolinium et de cuivre-64 : $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))(\text{TANODAGA}(\text{Cu}))$.
- La deuxième est constituée des nanoparticules recouvertes par des chélates de gadolinium et de zirconium-89 : $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))(\text{TANODAGA}(\text{Zr}))$.

Les caractéristiques chimiques des ions de cuivre-64 et zirconium-89 étant différentes, l'immobilisation de ces ions requiert des chélateurs différents. Les ions cuivre-64 forment des complexes stables avec les macrocycles de type NOTA alors que les ions zirconium-89 sont complexés de façon durable par des dérivés de la DFO. Afin d'assurer l'immobilisation de ces chélateurs, les chélateurs (NODAGA et DFO) ont été modifiés par de l'acide thioctique. Cette fonctionnalisation permet d'introduire deux atomes de soufre (liaison disulfure endocyclique) qui sont connus pour leur forte affinité par les surfaces d'or [120],[122],[123],[124].

La stratégie mise en œuvre pour élaborer les nanoparticules d'or de chacune des deux familles a consisté à réduire le sel d'or par un réducteur puissant (NaBH_4), en présence du mélange de deux chélateurs (TADOTAGA et TANODAGA pour la première famille et (TADOTAGA et TADFO pour la deuxième famille. Les nanoparticules d'or ont été synthétisées $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x(\text{TANODAGA})_y$ et $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x(\text{TADFO})_y$ avec deux rapports molaires de chélateurs différents ($x/y = 10$ et 2).

2.2.1.1. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TADFO, $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$

La synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$ consiste à réduire le sel d'or par le tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4), en présence du mélange de chélateurs organiques (TADOTAGA et TADFO) (Figure 40).

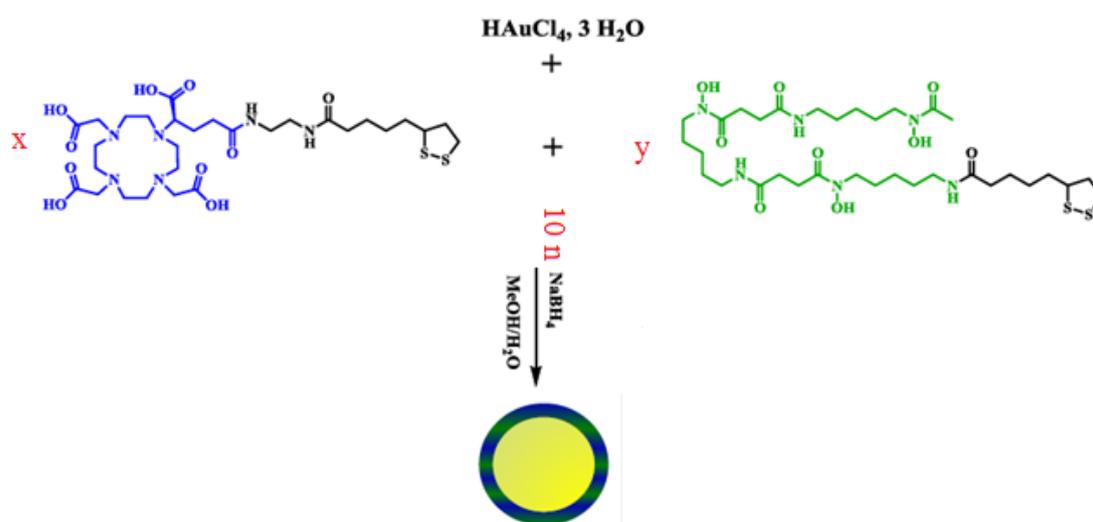


Figure 40 : Schéma de la synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par la couche mixte de chélateurs, $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$, ($x/y = 10$ et 2).

2.2.1.1.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2y} (\text{TADFO})_y$, ($x/y = 2$)

Une solution aqueuse de TADOTAGA (0,231 g ; $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 25 mL d'eau ultrapure) et une solution aqueuse de TADFO (0,123 g ; $1,64 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) sont introduites successivement dans un ballon monocol de 250 mL contenant une solution méthanolique de sel d'or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (0,192 g ; $4,869 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans un volume de 60 mL de méthanol) sous agitation magnétique. La solution jaune clair (avant l'ajout des chélateurs) devient orange vif. Enfin, le réducteur tétrahydruroborate de sodium NaBH_4 (0,2 g ; $5,28 \cdot 10^{-3}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) est ajouté au mélange de sel d'or et de chélateurs par fractions (6 mL puis progressivement). L'addition de la solution aqueuse de NaBH_4 au mélange s'accompagne instantanément de l'apparition d'une coloration noire et d'un dégagement gazeux.

Le mélange réactionnel ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure. Le ballon est recouvert à moitié pour permettre l'évacuation du dihydrogène.

2.2.1.1.2. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{10y} (\text{TADFO})_y$

Comme le rapport molaire ligand/sel d'or exerce une influence sur la taille des nanoparticules, la variation du rapport x a été réalisée à quantité de matière constante. En d'autres termes, la quantité de matière totale de chélateurs est la même ($4,90 \cdot 10^{-4}$ mol) quelle que soit la valeur de x. Dans le cas de la synthèse des nanoparticules d'or avec ($x/y=10$), nous avons procédé de la même façon que pour ($x/y=2$). La seule modification concerne la masse de TADOTAGA et de TADFO (Tableau 11).

Tableau 11: Réactifs de la synthèse des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$ pour ($x/y=10$ et 2)

Réactants	M (g/mol)	Masse (g)	n (mol) (x/y=10)	n (mol) (x/y=2)	V (mL)
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	393,85	0,192	$4,87 \cdot 10^{-4}$		dans 60 mL de méthanol
L1=TADOTAGA	707	0,315	$4,45 \cdot 10^{-4}$	$3,26 \cdot 10^{-4}$	dans 34,54 mL H_2O
L2= TADFO	748,99	0,0337	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$1,64 \cdot 10^{-4}$	dans 3,45 mL DMSO
NaBH_4	37,83	0,200	$5,28 \cdot 10^{-3}$		dans 13 mL H_2O

2.2.1.1.3. Purification

Après la synthèse, les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, ($x/y=10$ et 2) sont purifiées par dialyse contre l'eau pure en utilisant un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est compris entre 6 et 8 kDa. Le bain de dialyse est remplacé 3 fois par jour toute les quatre heures pendant 48 heures. Elle permet d'éliminer les éventuels résidus organiques tels que les ligands non accrochés et le solvant organique (le méthanol). Les nanoparticules d'or ainsi purifiées sont ensuite concentrées à l'aide d'une centrifugation dans des tubes à membrane (Vivaspin[®] de 10 kDa) à une vitesse de 1500 tr/min, jusqu'à l'obtention d'une solution contenant environ 10 g Au/L.

2.2.1.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par TADOTAGA et TANODAGA, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$

La synthèse des nanoparticules d'or, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}(\text{TANODAGA})$ consiste à réduire le sel d'or par le tétrahydroborate de sodium, en présence d'une couche mixte de chélateurs organiques (TADOTAGA (L_2) et TANODAGA (L_1)) avec un rapport molaire ($x/y = 10$ et 2) (Figure 41).

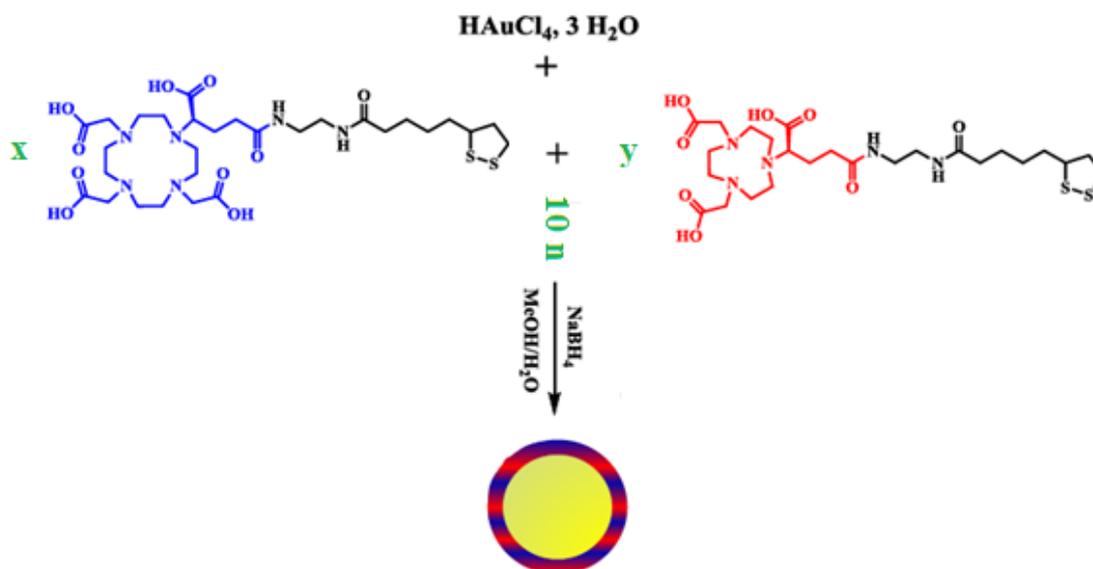


Figure 41 : Schéma de la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par la couche mixte de chélateurs, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y=10$ et 2 avec $x+y=n$).

Le marquage des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y=10$ et 2) par l'ion gadolinium a été réalisé selon deux stratégies. La première stratégie consiste à synthétiser dans un premier temps les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y=10$ et 2) puis à le marquer par l'ion gadolinium.

La deuxième stratégie est plus avantageuse car elle permet de réaliser la complexation de l'ion gadolinium avant la synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$. Cette stratégie permet une immobilisation sûre des ions gadolinium à la surface des nanoparticules d'or.

2.2.1.2.1. Première stratégie : marquage après synthèse

Elle consiste à synthétiser des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y=10$ et 2) selon la méthode de synthèse de Brust. Le marquage à l'ion gadolinium est effectué par ajout d'une solution d'ion gadolinium à la suspension de nanoparticules d'or fraîchement préparée.

2.2.1.2.1.1 Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$

Une solution aqueuse de chélateur TADOTAGA ($0,231$ g ; $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol de TADOTAGA dans 25 mL d'eau ultrapure) et une solution aqueuse de TANODAGA ($0,121$ g ; $1,64 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) sont ajoutées successivement dans un ballon monocol de 250 mL contenant une solution méthanolique de sel d'or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,192$ g ; $4,869 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans un volume de 60 mL de méthanol) sous agitation magnétique. La couleur de la solution de sel d'or est jaune-clair avant l'ajout des chélateurs. Après l'addition des chélateurs organiques, le mélange réactionnel vire à l'orange vif. Une solution aqueuse de NaBH_4 ($0,2$ g ; $5,28 \cdot 10^{-3}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) est ajoutée par fractions (6 mL puis progressivement) au mélange de sel d'or et de chélateurs. L'ajout de la solution aqueuse de NaBH_4 au mélange réactionnel se traduit par l'apparition d'une coloration noire. Cette coloration noire, accompagnée par un dégagement de dihydrogène, est attribuée à la formation de nanoparticules d'or. Le mélange réactionnel ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique

pendant environ une heure. Le ballon est recouvert à moitié par un bouchon pour permettre l'évacuation du dihydrogène.

Quelle que soit la valeur de x et y, la quantité totale de chélateurs reste identique. Pour cette raison, les protocoles ne diffèrent que par la quantité de chaque chélateur dont la quantité totale est identique pour chaque valeur de x et y dans le tableau 12.

Tableau 12 : Réactifs de la synthèse de nanoparticule Au@(TADOTAGA)_x(TANODAGA)_y, (x/y=10)

Réactants	Masse (g)	M (g/mol)	n (mol) (x/y=10)	n (mol) (x/y=2)	V (mL)
H ₂ AuCl ₄ · 3 H ₂ O	0,192	393,85	4,87.10 ⁻⁴	4,87.10 ⁻⁴	dans 60 mL de méthanol
L ₁ =TADOTAGA	0,315	707	4,45.10 ⁻⁴	3,26.10 ⁻⁴	dans 34,54 mL H ₂ O
L ₂ =TANODAGA	0,0272	605,77	4,5.10 ⁻⁵	1,64.10 ⁻⁴	dans 3,45 mL H ₂ O
NaBH ₄	0,200	37,83	5,28.10 ⁻³	5,28.10 ⁻³	dans 13 mL H ₂ O

2.2.1.2.1.2. Marquage après synthèse

Après synthèses, le pH des suspensions de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_x(TANODAGA)_y, (x/y=10 et 2) a été ramené à pH acide (pH 4-5) pour effectuer la complexation de l'ion gadolinium ([Gd³⁺] = 5 mM, 175 µL). Ensuite le pH des suspensions colloïdales a été ajusté à pH (7-8) à l'aide de solution acide ou basique à 1 M. Les suspensions colloïdales Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA)_y, (x/y=10 et 2) marquées au gadolinium (III) sont ensuite envoyées au laboratoire de radiopharmacie de la plateforme d'imagerie nucléaire du CGFL de Dijon pour radiomarquer avec le radionucléide de choix (⁶⁴Cu ou ⁶⁸Ga) pour une éventuelle étude de suivi par imagerie simultanée IRM/TEP.

Pour des raisons de fiabilité, nous avons opté pour la deuxième stratégie car elle nous permet d'avoir la certitude de la présence de chélates de gadolinium (TADOTAGA(Gd)) à la surface de nanoparticules d'or.

2.2.1.2.2. Deuxième stratégie : marquage avant synthèse

La deuxième stratégie consistait à réaliser la complexation de l'ion gadolinium avant la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y. Le protocole de la complexation et de la synthèse de nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y sont détaillées ci-après.

2.2.1.2.2.1. Préparation du chélaté

Dans un flacon, TADOTAGA (0,231 g ; $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous dans de l'eau ultrapure (13 mL). Dans un autre flacon (0,1212 g ; $3,26 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous de sel de gadolinium (GdCl₃·2H₂O) dans d'eau ultrapure (12,33 mL). Une fois les solides dissous, les deux solutions ont été mélangées puis chauffées à 80°C pendant 6h.

2.2.1.2.2.2. Protocole de la synthèse des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y,

Une solution aqueuse de chélate de gadolinium TADOTAGA(Gd³⁺) ([TADOTAGA(Gd)]= $2,57 \cdot 10^{-2}$ mol/L et V=25,33 mL) et une solution aqueuse de TANODAGA (0,121 g ; $1,64 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) sont ajoutées successivement dans un ballon monocol de 250 mL contenant une solution méthanolique de sel d'or H₂AuCl₄·3H₂O (0,192 g ; $4,869 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans un volume de 60 mL de méthanol) sous agitation magnétique. La couleur de la solution de sel d'or est jaune-clair avant l'ajout des macrocycles. Après l'addition des chélates de gadolinium et des chélateurs, le mélange réactionnel vire à l'orange vif. Une solution aqueuse de NaBH₄ (0,2 g ; $5,28 \cdot 10^{-3}$ mol dissous dans 13 mL d'eau ultrapure) est ajoutée par fractions (6 mL puis progressivement) au mélange de sel d'or et de chélates et chélateurs. L'ajout de la solution aqueuse de NaBH₄ au mélange réactionnel se traduit par l'apparition d'une coloration noire. Cette coloration noire, accompagnée par un dégagement de dihydrogène, est attribuée à

la formation de nanoparticules d'or. Le mélange réactionnel ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure. Le ballon est recouvert à moitié par un bouchon pour permettre l'évacuation du dihydrogène.

Les nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ et $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x(\text{TANODAGA})_y$, ($x/y = 10$ et 2) synthétisées selon la méthode de Brust sont purifiées par dialyse pendant 48 heures (5 changements de bains de dialyse) afin d'éliminer les résidus organiques. Puis elles sont concentrées de façon à obtenir par centrifugation dans des tubes Vivaspin[®] de 10 KDa, des concentrations proches de (10 g Au/L).

2.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or recouvertes par un seul type de molécules mais portant deux sites de coordination spécifiques

La deuxième approche pour développer des nanosondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP a consisté à synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes par un seul type de molécule TA[DOTAGA-lys-NODAGA] mais possédant deux sites de complexation. En l'occurrence, un dérivé DOTAGA pour la complexation de l'ion gadolinium pour l'imagerie IRM et un dérivé NODAGA pour l'immobilisation de l'ion cuivre-64 pour l'imagerie TEP. Afin d'assurer l'immobilisation de la plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-NODAGA] à la surface de nanoparticule d'or, celle-ci a été modifiée par de l'acide thioctique (TA) comportant deux atomes de soufre connus pour leur forte affinité par les surfaces d'or. La synthèse des nanoparticules $\text{Au} @ \text{TA}[\text{DOTAGA-lys-NODAGA}]$ a été réalisée en adaptant le protocole de Brust [125]. Pour cela, nous avons repris le protocole développé pour la synthèse des nanoparticules $\text{Au} @ \text{TADOTAGA}$ [126]. Les nanoparticules d'or ont été produites par réduction du sel d'or par NaBH_4 en présence de la plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-NODAGA] (Figure 42).

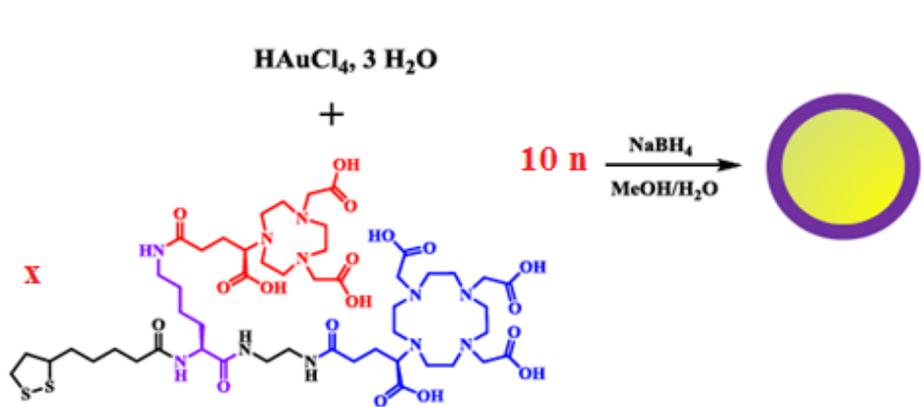


Figure 42 : Schéma de synthèse de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] recouvertes par une couche homogène de ligands possédant chacun deux sites de coordination.

Pour des raisons d'approvisionnement du ligand TA[DOTAGA-lys-NODAGA], nous avons adapté notre protocole en réduisant les quantités des différents réactifs de façon à préparer des suspensions colloïdales de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] avec une concentration en or d'environ 10 g Au/L.

2.2.2.1. Protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA]

Dans un ballon monocol de 50 mL, le sel d'or $\text{H[AuCl}_4\text{]} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (16 mg ; $4,06 \cdot 10^{-5}$ mol) est dissous dans le méthanol (5 mL). La solution de coloration jaune clair est ensuite placée sous agitation magnétique. En parallèle, le ligand TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] (48 mg ; $4,06 \cdot 10^{-5}$ mol) est dissous dans l'eau ultrapure (3 mL). Après dissolution, la plateforme moléculaire est ajoutée sous agitation au contenu contenant du ballon (le sel d'or). Il en résulte un changement de couleur du jaune-clair à l'orange vif. Enfin, le réducteur tétrahydroborate de sodium NaBH_4 (15 mg ; $3,99 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 1 mL d'eau ultrapure) est ajouté au mélange réactionnel par fraction (0,5 mL puis progressivement). La coloration de la solution vire instantanément au noir avec un dégagement de dihydrogène. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure. Le ballon est recouvert à moitié par un bouchon pour permettre l'évacuation du dihydrogène.

2.2.2.2. Purification

Après l'étape de la synthèse organique, les nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] sont purifiées à l'aide d'un boudin de dialyse dont le seuil de coupure du boudin est compris entre 6 et 8 kDa. Le bain de dialyse est remplacé 3 fois par jour toutes les quatre heures pendant 48 heures par de l'eau deionisée pour se débarrasser des résidus organiques et inorganiques. La suspension purifiée est ensuite concentrée à 10 g Au/L par centrifugation dans des tubes Vivaspin® de 10 kDa.

2.2.3. Lyophilisation

La lyophilisation est une technique de séchage à froid. Elle consiste en l'élimination progressive des molécules d'eau présente dans l'échantillon par passage de l'état solide à l'état gazeux.

Les suspensions colloïdales ont d'abord été congelées à -80°C pendant une nuit. Elles ont été ensuite introduites dans la cuve étanche de lyophilisation pour éviter les variations de pression et de température. Le système est relié à une pompe à vide pour extraire le gaz formé durant l'étape de la lyophilisation. La lyophilisation a été réalisée à l'Institut Lumière Matière (ILM) de Lyon dans l'équipe du Professeur Olivier Tillement.

2.2.4. Caractérisation des nanoparticules synthétisées

2.2.4.1 La spectrophotométrie UV-visible

La réduction du sel d'or en nanoparticules d'or à l'échelle nanométrique se caractérise par un changement de couleur lié à la taille et à la forme de nanoparticules d'or. Cette modification de couleur résulte du phénomène de la résonance plasmonique de surface observée lorsque la longueur d'onde du rayonnement incident est plus grande que la taille des particules métalliques ($\lambda \gg \varnothing_{\text{particules}}$). Cette résonance plasmonique de surface a lieu dans le domaine du visible pour des nanoparticules d'or. Elle se traduit par l'absorption de la lumière visible. Comme la forme et la position de la bande d'absorption dépendent de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules d'or, la spectrophotométrie UV-visible qui est une technique simple à mettre en œuvre. Elle fournit rapidement et facilement des renseignements sur les suspensions

colloïdales, comme la gamme de taille des nanoparticules d'or, la dispersion en taille, la stabilité colloïdale.

Mode opératoire :

Pour chaque type de nanoparticules d'or, les spectres ont été enregistrés entre 400 et 800 nm à partir des suspensions colloïdales (3 mL ; 0,2 g Au/L) obtenues par dilution dans l'eau ultrapure de suspensions-mères (10 g Au/L). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210.

2.2.4.2. Microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission (MET) est une technique de caractérisation très puissante. Elle permet une analyse morphologique, structurale et chimique des échantillons solides à l'échelle atomique et nanométrique. Elle consiste à faire passer un faisceau d'électrons à travers un échantillon. Ils sont ensuite recueillis par des détecteurs pour constituer une image électronique de l'échantillon.

Mode opératoire :

Une goutte (5 μ L) de chacun des échantillons de nanoparticules d'or préalablement dilués (0,10 g Au/L) a été déposée sur une grille en cuivre recouvert d'un film de carbone. Ensuite, les grilles ont été laissées à l'air libre pendant environ une nuit pour sécher. Les suspensions colloïdales séchées ont été introduites dans la machine (JEOL 2100F, 200kV) pour réaliser des clichés. L'étude de microscopie électronique à transmission (MET) s'est déroulée à Dijon au sein du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne. Les clichés ont été réalisés par le Dr Rémi Chassagnon.

2.2.4.3. Diamètre hydrodynamique (D_h)

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules prend en compte la taille du cœur d'or, l'épaisseur de la couche de ligands et de la couche de solvatation (Figure 43).

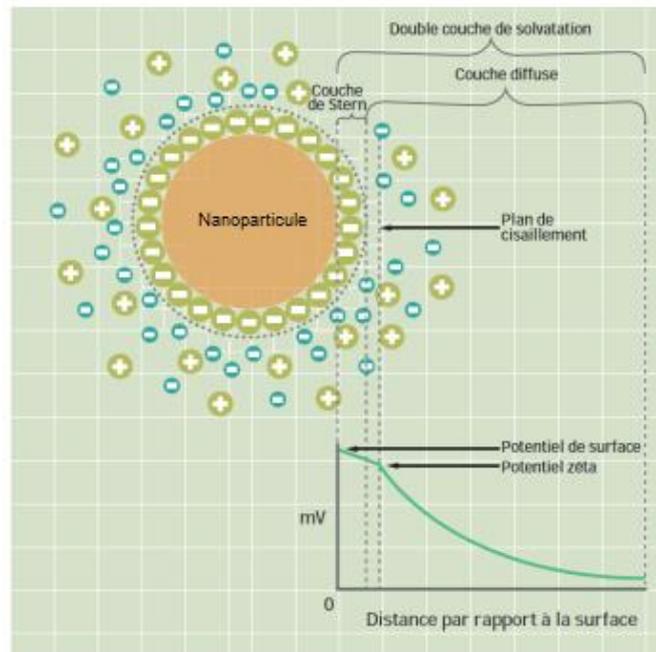


Figure 43 : Schéma de la couche de solvation et variation du potentiel de surface

Il reflète donc l'encombrement réel de la nanoparticule dans un milieu donné contrairement à la mesure de la taille réalisée à partir d'un cliché MET. Le diamètre hydrodynamique peut-être mesuré par des techniques de diffusion de lumière telle que la diffusion élastique de la lumière (DLS pour dynamic light scattering). Elle présente l'avantage de réaliser rapidement une analyse globale de distribution en taille des nanoparticules d'or.

Mode opératoire :

La mesure expérimentale du diamètre hydrodynamique (D_h) a été réalisée à partir d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or (0,25 g/L) ajustée à pH 7,4 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium NaOH, (1 ou 0,1 M) ou une solution d'acide chlorhydrique (1 ou 0,1 M). La mesure du diamètre hydrodynamique a été réalisée à l'aide d'un zétamètre (Nanosizer ZS de Malvern Instruments) équipé d'un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm et connecté à un ordinateur. La mesure du diamètre hydrodynamique a été effectuée trois fois pour chaque échantillon.

2.2.4.4. Potentiel zêta

Le potentiel zêta est un bon indicateur pour anticiper les domaines de stabilité colloïdale en s'appuyant sur le fait que des particules de même signe de charge se repoussent. Il est calculé à partir de la mobilité des particules en utilisant l'équation de Smoluchowski :

$$\mu = \varepsilon \zeta / \eta$$

Figure 44 : Equation de Smoluchowski

Avec μ , la mobilité électrophorétique des particules chargées ; ε , la permittivité diélectrique du milieu ; η la viscosité et ζ le potentiel zêta. La mesure du potentiel zêta est une technique rapide et fiable. Elle permet d'estimer la charge des nanoparticules d'or et donc la stabilité des suspensions colloïdales.

Mode opératoire :

La mesure expérimentale du potentiel zêta a été réalisée à partir des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or obtenues par dilution dans une solution aqueuse de chlorure de sodium. Au final la concentration en or de ces suspensions est de 1,25 mM (0,25 g Au/L) et celle en NaCl s'élève à 10^{-2} M. Les valeurs de pH des différentes suspensions colloïdales ont été ajustées avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium NaOH (1 ou 0,1 M) ou une solution d'acide chlorhydrique (1 ou 0,1 M). La mesure du potentiel zêta a été réalisée à l'aide d'un zêtamètre (Nanosizer ZS de Malvern Instruments) équipé d'un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm et connecté à un ordinateur. La mesure du potentiel zêta a été effectuée trois fois pour chaque échantillon.

2.2.4.5. Analyse thermogravimétrie (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique quantitative. Elle consiste à mesurer la perte de masse d'un échantillon lorsque celui-ci est soumis à une augmentation progressive de température dans une atmosphère contrôlée. Elle permet de nous apporter des indications sur la stabilité thermique et la partie volatile de l'échantillon. Ainsi avec l'ATG, on peut déterminer le pourcentage de la composante organique (la phase la plus volatile) présente dans un matériau donné.

Mode opératoire :

Les analyses ont été réalisées au sein du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) de Dijon, à l'aide d'un analyseur thermogravimétrique de type Discovery TGA. Les différentes poudres obtenues par lyophilisation des suspensions colloïdales, (environ 1 mg) ont été placées dans une nacelle en platine. Les variations de température et de pression ont été ensuite contrôlées depuis un logiciel de l'ordinateur relié à la machine. Pour cette mesure, nous avons travaillé avec une rampe de température de (5°C/min) jusqu'à 800°C sous air avec une isotherme de 10 min.

2.2.4.6. Dosage ICP-AES

Dans un premier temps les échantillons des suspensions colloïdales (50 µL ; 10 g Au/L) ont été minéralisés par ajout de l'eau régale (HNO₃/HCl 1:3 v/v, 1950 µL). Les échantillons minéralisés ont été ensuite envoyés au laboratoire Qualio à Besançon pour déterminer la teneur en or (g/L) par ICP-AES, (modèle Varian 720-ES à torche). Les paramètres de l'analyse sont résumés dans le tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13: Paramètres physiques de l'ICP-AES

Paramètres physiques	Les valeurs affichées
Puissance	1300 W
Débit d'argon	15 L/min
Type de nébuliseur	Concentrique
Longueurs d'onde de l'or (Au)	208 ; 207 ; 242,794 ; 267,594 nm
Température	~10 000 °C

2.2.4.7. Estimation du nombre de ligands disponibles par dosage de l'ion europium(III)

L'ion europium(III) de configuration électronique [Xe]4f⁷ est connu pour ses propriétés de luminescence reposant sur des transitions électroniques dans la couche 4f. La luminescence de l'ion europium(III) est très sensible à son environnement et se caractérise par un coefficient d'extinction molaire très faible, une durée de vie assez longue et un décalage entre sa bande d'absorption et sa bande d'émission.

Lorsque l'ion europium(III) est chélaté avec un ligand organique, son environnement est bien protégé (pas de contact avec l'eau) et son signal luminescent est préservé. Le but du dosage d'europium complexé consiste à quantifier indirectement les sites disponibles de chélateurs présents à la surface des nanoparticules d'or. Ainsi dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons effectué plusieurs dosage fluorimétriques des échantillons de nanoparticules d'or : Au@TADOTAGA; Au@TANODAGA; Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y.

Le principe du dosage consiste à ajouter une quantité croissante d'ions europium par ajout d'une solution aqueuse de chlorure d'europium (Eu³⁺; 1mM) dans des flacons contenant des suspensions de nanoparticules d'or (Au@TADOTAGA; Au@TANODAGA; Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y, ([Au]= 10 mM ; 2 g Au/L). La réaction a lieu en milieu tampon acétate et à pH 5, afin d'éviter la formation d'hydroxyde d'europium. Ensuite, le mélange réactionnel a été placé sous agitation dans une étuve à (80°C) pendant 48 heures pour permettre la complexation totale des ions europium(III).

Les mesures de la fluorescence ont été réalisées à l'ILM de Lyon au sein de l'équipe du professeur Olivier Tillement, à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence Varian Cary Eclipse Agilent. Les paramètres physiques du dosage sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Paramètres physiques du dosage des ions europium(III) par fluorimétrie

Paramètres physiques	Les valeurs affichées
Mode	Scan
Slit (Exc/Em)	20 nm/20 nm
Flash	1
Temps de retard	0,1 ms
Temps de portée	5 ms
Longueur d'onde d'excitation	395 nm
Longueur d'onde d'émission	594 nm (⁵ D ₀ → ⁷ F ₁) 616 nm (⁵ D ₀ → ⁷ F ₂)
Voltage	élevé
Filtre d'émission	430-1100 nm

2.2.4.8. Etude de la complexation des ions d'intérêt pour l'imagerie

2.2.4.8.1. Etude de la complexation de l'ion gadolinium(III)

L'ion gadolinium(III) forme un complexe stable avec le chélateur TADOTAGA. Pour quantifier indirectement les sites disponibles du chélateur TADOTAGA, nous avons évalué la quantité de gadolinium libre par un dosage colorimétrique avec un complexant faible, le xylénol orange. Comme le xylénol orange est un complexant plus faible que TADOTAGA, la formation des complexes entre le xylénol et les ions gadolinium qui se traduit par la déformation du spectre du xylénol orange indique qu'il n'y a plus de site disponible dans la couche de TADOTAGA. En d'autres termes, tous les TADOTAGA contiennent un ion gadolinium. En milieu acide, il absorbe à 433 nm et sa couleur est jaune tandis qu'en milieu basique, il absorbe à 573 nm et sa couleur vire au rose lorsqu'il est complexé avec les ions gadolinium(III) libres présent dans la solution. Cette complexation se traduit par une déformation du spectre d'absorption du xylénol orange (le pic à 433 nm diminue alors que celui à 573 nm augmente en présence des ions gadolinium(III) libres). Le rapport des absorbances A_{573}/A_{433} est proportionnel à la quantité des ions gadolinium(III) libres. L'étude de complexation de l'ion gadolinium(III) a été réalisée selon deux méthodes de dosage, à la température ambiante et par chauffage à 80°C.

2.2.4.8.1.1. Dosage à la température ambiante :

Le principe de ce dosage consiste à ajouter selon le rapport $Gd/(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$, une quantité croissante d'ions gadolinium par ajout d'une solution aqueuse de chlorure de gadolinium ($[Gd^{3+}] = 0,05$ M) dans différents flacons contenant des suspensions de nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$, en or ($[Au] = 0,5$ mM ; 0,1 g Au/L). Le mélange réactionnel est ensuite laissé à la température ambiante pendant 48 heures pour s'assurer de la complexation totale des ions gadolinium(III) à la surface des nanoparticules. Par la suite, le mélange réactionnel est centrifugé dans un tube Vivaspin® de 10 kDA. Enfin, les ions gadolinium(III) non complexés présents dans le filtrat, sont dosés (en prélevant 100 µL du filtrat) en présence de xylénol orange (15,63 µM ; 3 mL). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-visible

de type SPECORD 210. Les spectres ont été enregistrés dans une fenêtre de lecture comprise entre 350 et 650 nm.

2.2.4.8.1.2. Dosage par saturation des sites disponibles des chélateurs à 80°C :

Le dosage par saturation consiste à saturer les sites disponibles des ligands présents à la surface des nanoparticules d'or. Pour cela, un volume croissant d'une solution aqueuse de chlorure de gadolinium (III) ($[Gd^{3+}] = 1 \text{ mM}$) a été ajouté dans différents flacons contenant des suspensions de nanoparticules d'or ($Au@TADOTAGA$; $Au@TANODAGA$; $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y$, ($[Au] = 10 \text{ mM}$; 2 g Au/L). La réaction a eu lieu en milieu tampon acétate et à pH 5, afin d'éviter la formation d'hydroxyde de gadolinium. Ensuite, le mélange réactionnel a été placé sous agitation et dans une étuve à (80°C) pendant 48 heures pour permettre la complexation totale des ions gadolinium(III). Après 48 heures à 80°C , l'excédent des ions gadolinium qui ne peuvent pas être complexés à la surface de nanoparticules de fait de la saturation de la couche organique ont été dosés en présence de xylénol orange ($100 \mu\text{L}$ de suspension dans $2,5 \text{ mL}$ de solution de xylénol orange à $16,05 \mu\text{M}$). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210. Les spectres ont été enregistrés dans une fenêtre de lecture comprise entre 350 et 650 nm.

2.2.4.8.2. Etude de la complexation de l'ion zirconium (IV)

L'ion zirconium(IV) est un cation monoatomique, connu pour avoir une très grande affinité avec le dérivé DFO. Pour quantifier indirectement les sites disponibles du chélateur TADFO, nous avons effectué un dosage d'ions zirconium(IV) libre en présence d'un complexant faible, le chromazurol S (CAS). L'ion zirconium forme un complexe rose, stable $[CAS-Zr^{4+}]$ à 598 nm [8]. Le principe du dosage consiste à ajouter selon le rapport $Zr/(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$, une quantité croissante d'ion zirconium(IV) via une solution aqueuse de sulfate de zirconium(IV) ($[Zr^{4+}] = 0,05\text{M}$) dans différents flacons contenant des suspensions de nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$, ($[Au] = 5 \text{ mM}$; 1 g Au/L) (Figure 45). Le mélange réactionnel est ensuite laissé à la température ambiante pendant 48 heures pour s'assurer de la complexation totale des ions zirconium (Zr^{4+}) à la surface des

nanoparticules. Par la suite, le mélange réactionnel est centrifugé dans un tube Vivaspin® de 10 kDA. Enfin, les ions Zr^{4+} non complexés présents dans le filtrat (100 μ L) sont dosés en présence du Chromazurol S par colorimétrie à 598 nm (6,6 mM ; 3 mL). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210. Les spectres ont été enregistrés dans une fenêtre de lecture comprise entre 500 et 700 nm.

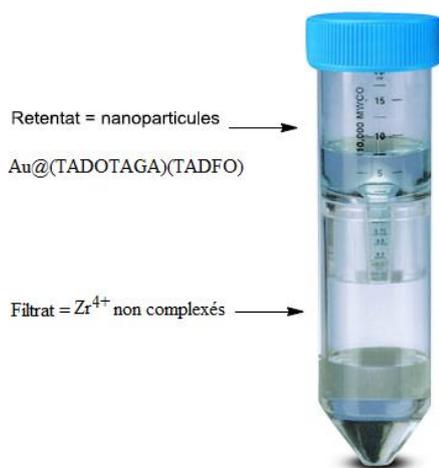


Figure 45: Dispositif d'ultrafiltration du mélange $Au@(TADOTAGA)_2y(TADFO(Zr))_y$.

2.2.4.9. Etude de la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or

2.2.4.9.1. Stabilité à différents pH

L'étude de la stabilité colloïdale à différents pH, en particulier autour du pH physiologique (pH = 7,4) est importante pour la préparation des suspensions injectables. Comme les propriétés optiques des suspensions de nanoparticules d'or sont sensibles à l'environnement, il est possible d'étudier la stabilité colloïdale par spectrophotométrie UV-visible. La stabilité colloïdale est caractérisée par l'absence de modification des spectres au cours du temps alors que l'agglomération et la précipitation induisent des changements significatifs dans l'allure des spectres.

Mode opératoire :

Les différents échantillons de suspensions colloïdales ($[Au] = 1,25$ mM ; 0,25 g Au/L) ont été répartis de manière homogène dans six flacons de même volume (5 mL). L'ajustement des valeurs de pH a été ensuite effectué avec une solution de NaOH ou une solution de HCl de (1 M). Enfin, les spectres des suspensions

colloïdales à différents pH [1 à 11] ont été enregistrés sur une gamme de longueurs d'onde s'étalant de 400 à 800 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210.

2.2.4.9.2. Stabilité dans le temps et en milieux physiologique

La stabilité colloïdale des suspensions en milieu physiologique (pH=7,4) est un paramètre indispensable pour l'étude de la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules. L'objectif principal de cette étude est de suivre dans le temps et en milieu physiologique simulé, la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or. Pendant 3 mois, nous avons étudié la stabilité colloïdale des échantillons de nanoparticules d'or marqués au gadolinium(III), cuivre(II) et zirconium(IV) dans deux milieux différents (milieu aqueux et milieu physiologique simulé [NaCl]=145 mM et [Hepes]=10 mM à pH 7,4). Une fois préparées, les différentes suspensions colloïdales ont été stockées à l'abri de la lumière avant d'enregistrer les spectres UV-visible à la température ambiante, deux jours par semaines durant 3 mois. A chaque mesure, le pH des suspensions colloïdales a été vérifié.

2.2.4.9.2.1. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en présence des ions d'intérêt:

Les échantillons de nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$, ($x/y = 10$ et 2); $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TANODAGA})_y$ avec ($x/y = 10$ et 2); $\text{Au} @ \text{TA}[\text{DOTAGA-Lys-NODAGA}]$ ont été marquées par les ions gadolinium(III), cuivre(II) et zirconium(IV) en milieu acide, pH (acide 4-5) pour favoriser la complexation. Ensuite, une solution tampon de NaCl/Hepes (237 μL ; 145 mM/10 mM) a été ajoutée aux différentes suspensions colloïdales ($\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x (\text{TADFO}(\text{Zr}))_y$ avec ($x/y = 10$ et 2); $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x (\text{TANODAGA}(\text{Cu}))_y$ avec ($x/y = 10$ et 2); $\text{Au} @ \text{TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}(\text{Cu})]$) avant d'ajuster le pH au pH physiologique (7,4) à l'aide d'une solution de NaOH ou HCl à 1 M. Le volume final étant porté à 5 mL dans chacune des suspensions colloïdales.

2.2.4.9.2.2. En milieu physiologique simulé (NaCl/Hepes) et en absence des ions d'intérêt:

Nous avons refait la même expérience que précédemment en absence des ions d'intérêt, c'est-à-dire les suspensions colloïdales $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, ($x/y= 10$ et 2); $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$ avec ($x/y= 10$ et 2); $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA-lys-NODAGA}]$ sont d'emblée conditionnées en milieu physiologique, avec l'ajout de la solution tampon de NaCl/Hepes ($237 \mu\text{L}$; $145 \text{ mM}/10 \text{ mM}$) avant d'ajuster le pH à $7,4$ en utilisant une solution de NaOH ou HCl (1 M). Le volume final est porté à 5 mL dans chacune des suspensions colloïdales.

2.2.4.9.2.3. Milieu aqueux et en présence des ions d'intérêt :

Les différentes suspensions colloïdales $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ avec ($x/y= 10$ et 2); $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$ avec ($x/y= 10$ et 2); $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA-lys-NODAGA}]$ ont été marquées par les ions gadolinium(III), cuivre(II) et zirconium(IV)) en milieu acide (pH acide $4-5$) pour effectuer la complexation. Ensuite les suspensions colloïdales marquées aux différents ions ($\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}))_x\text{(TADFO}(\text{Zr}))_y$ avec ($x/y= 10$ et 2); $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}))_x\text{(TANODAGA}(\text{Cu}))_y$ avec ($x/y = 10$ et 2); $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}(\text{Cu})]$) ont été ramenées à $\text{pH} = 7,4$ à l'aide d'une solution de NaOH ou HCl (1 M). Le volume final est porté à 5 mL dans chacune des suspensions colloïdales. En l'absence des ions d'intérêt (l'ion gadolinium(III), l'ion cuivre(II) et l'ion zirconium(IV)), les suspensions colloïdales ont seulement été ajustées à $\text{pH} = 7,4$.

2.2.4.9.2.4. Milieu aqueux et en absence des ions d'intérêt:

En absence des ions d'intérêt, les différentes suspensions colloïdales $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, ($x/y= 2$ et 10); $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y= 2$ et 10); $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA-lys-NODAGA}]$ ont été seulement ajustées à $\text{pH} = 7,4$ à l'aide d'une solution de NaOH ou HCl (1 M).

2.2.4.10. Radiomarquage et caractérisation du radiomarquage

Le radiomarquage est une technique qui consiste à immobiliser à la surface des nanoparticules par un composé radioactif. Le marquage par des radionucléides métalliques est rendu possible par la présence d'agent chélatant à la surface des nanoparticules. Une fois les nanoparticules radiomarquées, elles sont administrées à l'organisme à explorer avant d'être détectées par imagerie nucléaire, en l'occurrence la TEP.

Comme cela a été mentionné dans la partie précédente (Chapitre 1), les radionucléides métalliques sont généralement choisis en raison de leur période, de leur énergie, du type de chélateur. Dans notre cas, les travaux de radiomarquage ont été axés principalement sur l'utilisation des deux radionucléides, le cuivre-64 et le zirconium-89.

2.2.4.10.1. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TADFO)_y avec x/y= 10 et 2 par ⁸⁹Zr⁴⁺

Dans l'optique d'étudier la biodistribution de nanoparticules d'or par imagerie simultanée IRM/TEP après injection intraveineuse, les nanoparticules d'or recouvertes par une couche organique contenant TADFO ont été radiomarquées avant injection par les ions zirconium-89, connus pour former un complexe stable avec les dérivés DFO. L'immobilisation des ions zirconium-89 par les dérivés DFO et la présence des ions gadolinium piégés par le chélateur TADOTAGA devraient permettre le suivi des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y et Au@(TADOTAGA)_{10y}(TADFO)_y par imagerie simultanée IRM/TEP.

Dans un microtube (a) contenant une solution tampon de carbonate de sodium (Na₂CO₃ ; 28,9 µL) est ajoutée une solution d'oxalate de zirconium-89 (Zr(C₂O₄)₂ ; 64,2 µL ; 2 MBq). Le mélange réactionnel est laissé pendant 3 minutes à la température ambiante. Dans un autre microtube (b), une suspension colloïdale de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))(TADFO) (346 µL) est diluée dans une solution de HEPES (137,5 µL ; 1 M) en présence d'un antioxydant, l'acide gentisique (5 mg). La solution d'ion zirconium-89 en milieu tampon (microtube a) est ensuite ajoutée à la suspension colloïdale (microtube b). Le mélange réactionnel a été incubé à 25 ° C sous agitation (1000 tr / min) pendant 15 minutes. La pureté

radiochimique est ensuite déterminée par radiochromatographie (AR-2000) sur une feuille de chromatographie en microfibres de verre (ITLC-SA).

La biodistribution des nanoparticules d'or radiomarquées au zirconium-89, (Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})$)($\text{TADFO}(\text{Zr})$)) a été ensuite étudiée *in vivo* après injection intraveineuse à des souris saines par imagerie simultanée IRM/TEP. L'ensemble des opérations a été réalisé au sein de la plateforme d'imagerie nucléaire du centre George François Leclerc (CGFL) à Dijon, par Dr Mathieu Moreau et Dr Alexandra Oudot.

2.2.4.10.2. Etude de la Stabilité du radiomarquage dans le temps

Mode opératoire :

L'étude de la stabilité du radiomarquage des nanoparticules a été réalisée dans deux milieux différents : dans un sérum de veau fœtal (riche en ions et protéines) et dans un milieu compétiteur contenant de l'EDTA. Pour le premier test, une suspension de nanoparticules Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})$)(TADFO) marquées au ^{89}Zr (50 μL) a été ajoutée à du sérum de veau fœtal (50 μL). Pour le second test, une suspension de nanoparticules Au@($\text{TADOTAGA}(\text{Gd})$)(TADFO) marquée au ^{89}Zr (50 μL) a été ajoutée dans une solution d'EDTA (100 μL ; 0,25 M). Le pH de ces deux mélanges a été ajusté à 7 avec des solutions de NaOH. Ces échantillons ont été chauffés à 37°C avant d'étudier la stabilité du radiomarquage par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des bandelettes de chromatographie (Tec-ControlTM, n° 150-771, Biodex).

Pour cela, un volume de chacun des échantillons (5 à 8 μL) a été prélevé à différentes périodes (0h, 24h, 48h, 5 jours et 7 jours après le radiomarquage) pour être déposé sur une bandelette. L'élution a été réalisée à l'aide d'un tampon citrate de sodium (20 mM ; pH 5). Ensuite, les bandelettes ont été découpées en deux morceaux conformément au guide du fabricant puis placées dans un tube afin de mesurer la radioactivité dans un compteur gamma (Cobra II autogamma, Packard). L'activité de la ligne de dépôt (premier morceau) sera comparée à celle du front de solvant.

2.2.4.10.3. Radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd)_{2y}(TANODAGA)_y, et Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64, en présence de l'ion gadolinium (III)

Comme les ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ forment des complexes stables avec les dérivées NODAGA, nous avons synthétisé des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA) et Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA] afin d'immobiliser les ions Cu^{2+} à la surface des nanoparticules. La présence des ions gadolinium piégés par TADOTAGA et des ions cuivre-64 devrait permettre l'étude *in vivo* de la biodistribution et de la pharmacocinétique des nanoparticules par imagerie simultanée IRM/TEP.

Dans un microtube A contenant une solution tampon d'acétate d'ammonium AcONH_4 (137 μL), est ajoutée une suspension colloïdale Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA) (500 μL). Ensuite dans le même microtube est introduite une solution de $^{64}\text{CuCl}_2$ (137 μL) en présence d'une solution d'acide chlorhydrique à 1M. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 45 minutes. La pureté radiochimique est ensuite déterminée par radiochromatographie (AR-2000). Le radiomarquage des nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA] au cuivre-64 a été réalisé de la même façon que celui des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA).

Les nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA(^{64}Cu)) et Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(^{64}Cu)] radiomarquées au cuivre-64 ont été ensuite administrées par voie intraveineuse à des souris pour le suivi *in vivo* par imagerie simultanée IRM/TEP.

2.2.5. Imagerie simultanée IRM/TEP

2.2.5.1. Appareillage et protocole

Les souris saines ont été imagées par un système d'imagerie IRM/TEP intégré qui a été développé dans le cadre du projet IMAPPI. Une fois anesthésié à l'isoflurane (2% en oxygène), elles ont été ensuite placées sur un lit qui est introduit dans l'enceinte de l'imager IRM/TEP. L'imagerie simultanée IRM/TEP a été réalisée 1 et 24 heures après l'injection des nanoparticules radiomarquées au cuivre-64 pour les nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(^{64}Cu)] et Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA(^{64}Cu))_y et au zirconium-89 pour les

nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd)}_x\text{(TADFO(}^{89}\text{Zr))}_y\text{)}$ avec différents rapports molaires des chélateurs ($x/y=10$ et 2). L'imageur IRM/TEP est constitué d'un imageur IRM (Aimant sec 7T ; Powerscan MRS-7024-PW MR Solutions, Guilford, Royaume-Uni) couplé à un imageur TEP (SiPM dual-ring PET-I-802 insert). Les acquisitions IRM et TEP ont été effectuées simultanément. La respiration des animaux a été contrôlée avec un capteur de pression abdominale et un logiciel dédié (PC Sam, SAII, Stony Brook, US). Les données ont été collectées dans le système PET pendant 30 à 60 minutes. Les images ont été reconstruites avec l'algorithme OSEM (maximisation attendue des sous-ensembles ordonnés 3D) implémenté dans le système en utilisant 2 itérations, 32 sous-ensembles et une taille de voxel isotrope de $0,28 \text{ mm}^3$.

Les images IRM à spin rapide pondérées T_1 et T_2 ont été acquises avec synchronisation respiratoire et séquences en plans axial et coronal. Les séquences T_1 ont été acquises avec un temps de répétition (TR) de 1000 ms, un temps d'écho (TE) de 11 ms. Les séquences T_2 ont été acquises avec un TR de 4000 ms et un TE de 45 ms. Les paramètres suivants ont été utilisés pour T_1 et T_2 : angle de retournement de 90° , moyenne de 4 signaux, épaisseur de coupe de 1 mm, taille de pixel transaxiale de $0,15 \times 0,15 \text{ mm}^2$ et matrice de 256×256 pixels.

2.2.5.2. Préparation des animaux avec et sans tumeur

Pour cette étude, des souris NMRI nude femelles âgées de six à huit semaines ont été utilisées. Les cellules tumorales de type TS/A (adénocarcinome mammaire murin) ont été implantées par injection sous cutanée sur le flanc à raison de $2 \cdot 10^7$ cellules. L'implantation est réalisée sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Après trois à cinq semaines de croissance tumorale, les souris reçoivent une injection intraveineuse de $100 \mu\text{L}$ de suspension injectable de nanoparticules (3 souris par type de nanoparticules). Pour cela, nous avons étudié deux types de nanoparticules : $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(}^{64}\text{Cu)}]$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA(}^{64}\text{Cu))}_y$. Après l'injection par voie intraveineuse, les nanoparticules ont été suivies par imagerie simultanée IRM/TEP. Pour les deux autres types de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd)}_x\text{(TADFO(}^{89}\text{Zr))}_y\text{)}$ avec le rapport molaire $x/y = (10 \text{ et } 2)$, l'étude de la biodistribution a été réalisée avec des souris saines après une

injection intraveineuse de 100 μ L de suspension de nanoparticules (3 souris par type de nanoparticules).

2.2.5.3. Suspensions injectables

Après synthèse, les différentes suspensions colloïdales ont été purifiées puis leur pH a été ajusté au pH physiologique (pH 7,4 ; 150 mM NaCl/10 mM Hepes) à l'aide de solutions acide (HCl) ou basique (NaOH) à 1 M. Elles ont été ensuite filtrées à la seringue afin d'extraire toute impureté chimique et ou biologique.

Enfin, les suspensions colloïdales sont radiomarquées par le radionucléide choisi avant d'être injectées par voie intraveineuse chez l'animal, pour étudier leur biodistribution dans l'organisme.

2.2.5.4. Comptage gamma

Pour le comptage gamma des organes, le sang, les tumeurs et les organes ont été prélevés, pesés et la radioactivité dans ces échantillons a été mesurée avec un compteur à scintillation (Cobra 4180, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Le compteur a été calibré de manière croisée avec le calibrateur de dose utilisé pour mesurer la dose injectée. La plage de linéarité a été déterminée pour toutes les géométries utilisées dans le comptage *ex vivo*. Les données ont ensuite été converties en pourcentage de la dose injectée et en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu. Les comptages ont été réalisés au sein de la plateforme d'imagerie nucléaire du centre George François Leclerc (CGFL).

2.2.5.5. Analyse des organes par ICP-AES

Après le comptage gamma (c'est-à-dire, une fois que la radioactivité a atteint un niveau suffisamment faible), les différents organes des souris ont été récupérés pour réaliser des analyses en ICP-AES. Les organes ont d'abord été décongelés puis ont été séchés à l'étuve à 80°C pendant 48 h. Ils ont été ensuite digérés à l'eau régale puis filtrés à l'aide d'une seringue avant de les envoyer au laboratoire Qualio pour déterminer la concentration en or (g/L) (voir **2.2.4.6.** pour les paramètres de l'appareil).

2.3. Résultats et Discussion

2.3.1. Nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateur $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$ ($x/y = 10$ et 2)

2.3.1.1. Morphologie et stabilité colloïdale

La synthèse des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$ a été réalisée par réduction du sel d'or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ par NaBH_4 en présence du mélange de deux chélateurs. Deux rapports molaires de ces chélateurs ($x/y = n(\text{TADOTAGA})/n(\text{TADFO})$) ont été testés ($x/y = 10$ et 2). Comme la DFO est hydrophobe, nous avons adapté le protocole en utilisant un solvant organique (DMSO) pour dissoudre la DFO. Après synthèse et purification, les nanoparticules ont d'abord été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET) en prélevant une goutte ($5 \mu\text{L}$) de chacun des échantillons de nanoparticules d'or préalablement dilués. Les différentes suspensions colloïdales ont été ensuite déposées sur une grille en cuivre recouvert de carbone. Les clichés pris lors des sessions de microscopie électronique à transmission (MET) ont fourni des informations structurales et morphologiques. Les micrographies des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_x (\text{TADFO})_y$ ($x/y = 10$ et 2) montrent manifestement une distribution assez homogène du diamètre du cœur des nanoparticules (Figure 46).

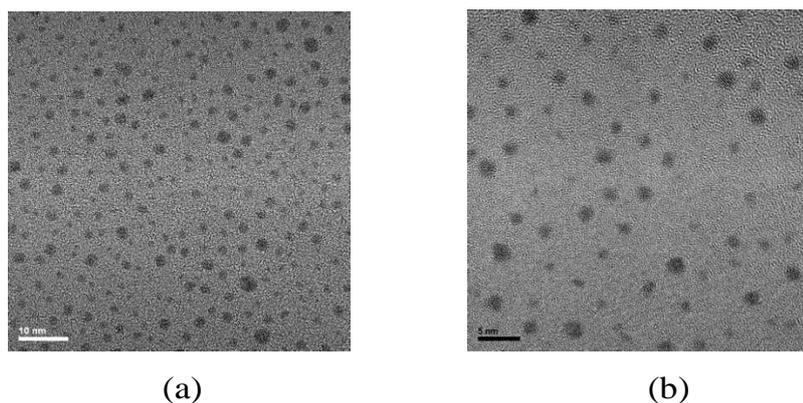


Figure 46: Clichés MET des particules d'or (a) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{10y} (\text{TADFO})_y$ et $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2y} (\text{TADFO})_y$

Ces dimensions (2,30 nm pour $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{10y} (\text{TADFO})_y$ et 2,43 nm pour $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2y} (\text{TADFO})_y$) sont identiques à celle du cœur d'or des nanoparticules d'or ($\text{Au} @ \text{DTDTPA}$, $\text{Au} @ \text{TADOTA}$, $\text{Au} @ \text{TADOTAGA}$) déterminées

précédemment dans les travaux de Christophe Alric [128] et de Gautier Laurent [126]. Les faibles dimensions observées par MET sur un nombre limité de nanoparticules d'or sont caractéristiques de l'ensemble de l'échantillon d'après l'allure des spectres d'absorption UV-visibles réalisés sur les mêmes suspensions colloïdales. Le phénomène de résonance de plasmon observé pour les nanoparticules d'or se caractérise par une forte absorption de la lumière visible qui dépend de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules [129]. Cependant pour les nanoparticules de taille inférieure à 3 nm, la bande d'absorption plasmon n'est quasiment plus visible. Ainsi l'étude par spectroscopie UV-visible s'avère pertinente car elle donne accès à des informations qualitatives voire quantitative sur la gamme de tailles, la distribution en taille et la stabilité colloïdale. Dans la figure 47, les spectres UV-visibles des suspensions colloïdales $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ ($x/y=2$ et 10) affichent une bande plasmon très aplatie au voisinage de 520 nm.

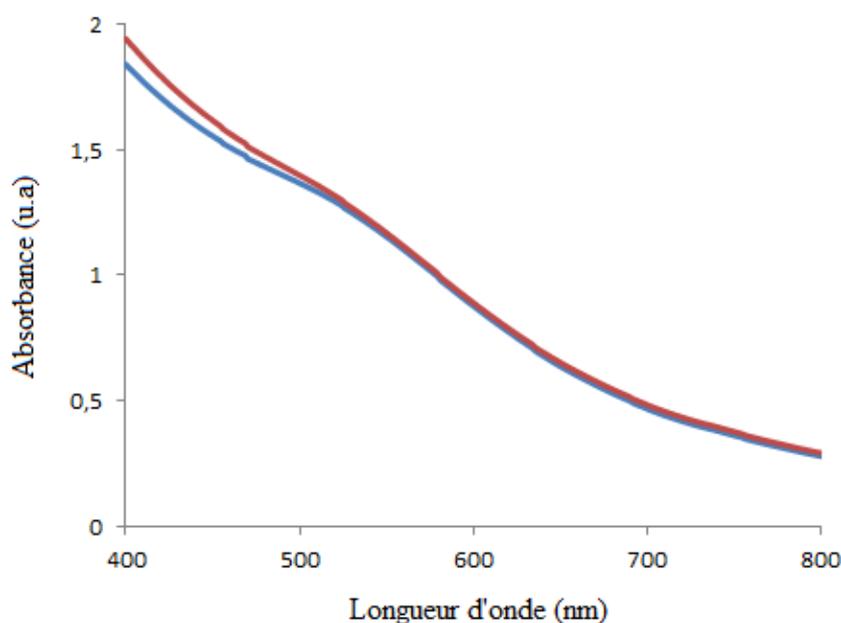


Figure 47: Spectres UV visible des suspensions des nanoparticules d'or (bleu) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TADFO)}_y$ et (rouge) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TADFO)}_y$,

La faible absorption au voisinage de 520 nm indique que les diamètres des cœurs d'or de ces particules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TADFO)}_y$, (en bleu) et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TADFO)}_y$ (en rouge) sont de l'ordre de 2 à 3 nm. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus à partir des clichés de MET. Pour cette raison, nous avons réalisé des mesures de diamètre hydrodynamique de chacune des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ ($x/y=10$ et 2) par

diffusion de lumière (DLS). Le diamètre du cœur d'or qui constitue les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ est une information utile mais pas suffisante car elle ne représente pas la taille réelle de l'objet. La connaissance de l'encombrement réel des nanoparticules d'or est essentielle pour des applications *in vivo*. Par exemple, il a été montré au travers de plusieurs études que la clairance rénale n'est observée que pour des nanoparticules dont le diamètre hydrodynamique n'excède pas 10 nm [130]. Les mesures de taille (Φ_{TEM} , D_h) et les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés après dilution de suspensions colloïdales dont la concentration en or déterminée par ICP-AES après purification varie entre 8 et 10 g/L. Les résultats de ces mesures sont récapitulés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats récapitulatifs des mesures physico-chimiques $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ en fonction de x/y de (DLS, TEM, ICP-AES).

Nanoparticules d'or	$\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ (x/y=10)	$\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ (x/y=2)
D_h (nm)	8,04 nm	8,86 nm
Φ_{TEM} (nm)	2,30 nm	2,43 nm

En plus des informations sur la taille, les données sur la stabilité colloïdale en phase aqueuse sont également essentielles pour une application *in vivo* des nanoparticules d'or. Nous avons donc étudié la stabilité colloïdale des différentes particules d'or sur une plage de pH allant de 1 à 11. A l'exception des pH inférieurs à 5, les spectres UV visibles des nanoparticules d'or sont superposés sur une large gamme de Ph (de 5 à 11) (Figure 48). Cela signifie que les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ (x/y=10 et 2) forment des suspensions colloïdales stables et notamment au pH physiologique (7,4). Elles paraissent donc adaptées pour les applications *in vivo* après injection intraveineuse.

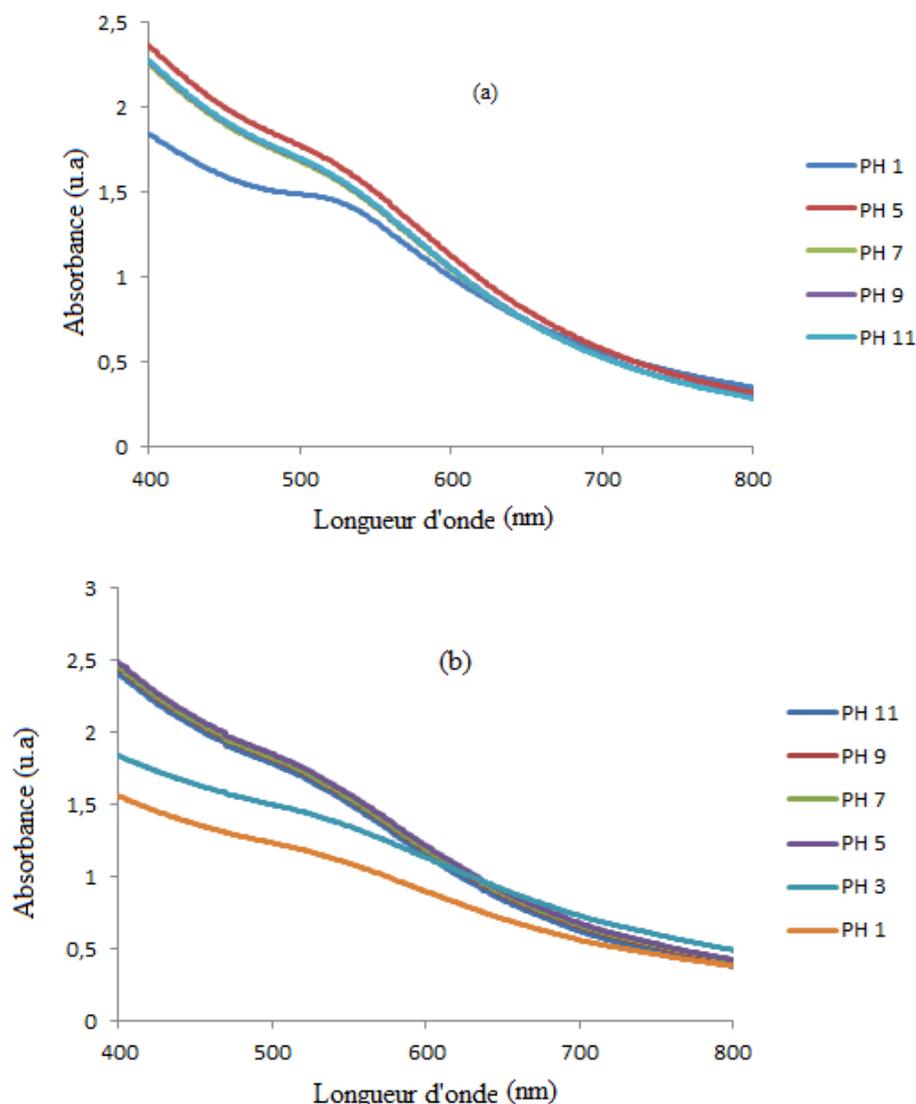


Figure 48: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or à différents pH :(a) Au@(TADOTAGA)_{10y}(TADFO)_y et (b) Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y.

La diminution d'absorbance observée sur les spectres des suspensions de pH < 5 reflète une modification de la taille de la forme et de l'environnement des nanoparticules d'or. De telles modifications sont caractéristiques d'une agglomération des nanoparticules. Cette stabilité colloïdale des nanoparticules d'or entre pH 5 et 11 concorde avec les mesures de potentiels zêtas effectuées sur ces mêmes suspensions de nanoparticules d'or. Les courbes de potentiel Zêta en fonction du pH de différentes nanoparticules d'or montrent que les nanoparticules sont chargées négativement pour des pH supérieurs à 3 et positivement pour des pH inférieurs à 3 (Figure 49). Les charges négatives résultent de la déprotonation des groupements acide carboxylique (-COOH) et des groupements ammonium alors que charges positives résultent de la protonation des amines tertiaires et des

groupements carboxylates. Si, on compare les valeurs de potentiels zêta des deux courbes des suspensions colloïdales $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$, (courbe rouge) et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$, (courbe bleue) on constate que la courbe en bleu présente des valeurs absolues de potentiels zêtas nettement plus élevées que celle de la courbe en rouge dans l'intervalle de pH compris entre 3 et 11. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$ seraient, comme attendu au vu du faible rapport x/y , recouvertes d'une couche organique mixte (TADOTAGA et TADFO) qui contient moins de fonctions $-\text{COOH}$ par rapport aux nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$, ($x/y=10$). La charge positive provient de la protonation des groupements amine tertiaire. En conclusion, la forte charge négative des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$ observée à partir de pH 5 garantit une stabilité colloïdale à pH physiologique. Cette dernière constitue un atout pour la préparation des suspensions injectables. Toutefois, il est important d'évaluer la stabilité colloïdale dans le temps en milieu physiologique (pH 7,4).

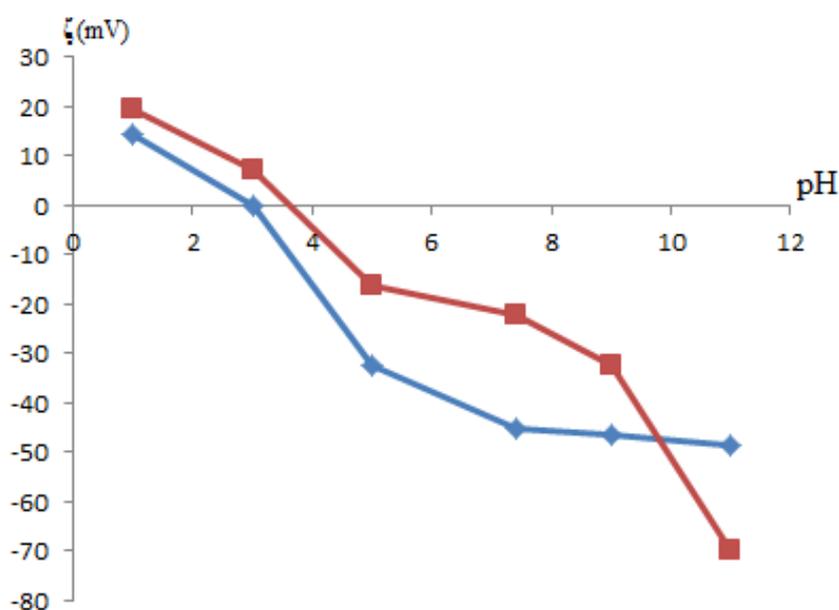


Figure 49 : Courbes représentant le potentiel zêta en fonction du pH des suspensions de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$ (diamants bleus) et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10\text{y}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$ (carrés rouges).

Afin de réaliser une telle évaluation, nous avons enregistré pendant environ 3 mois les spectres UV-visible des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{\text{x}}\text{(TADFO)}_{\text{y}}$

($x/y=10$ et 2), en présence et en absence d'ions gadolinium (III) et zirconium(IV). Ces suspensions ont été préparées comme si elles allaient être injectées (solution aqueuse de NaCl (145 mM) d'Hepes (10 mM) tamponnée à pH 7,4). Pour les différentes nanoparticules d'or étudiées, nous constatons une quasi superposition des courbes dans le temps en milieu aqueux et en milieu NaCl/Hepes, en présence et en absence des ions gadolinium et zirconium) (Figure 50).

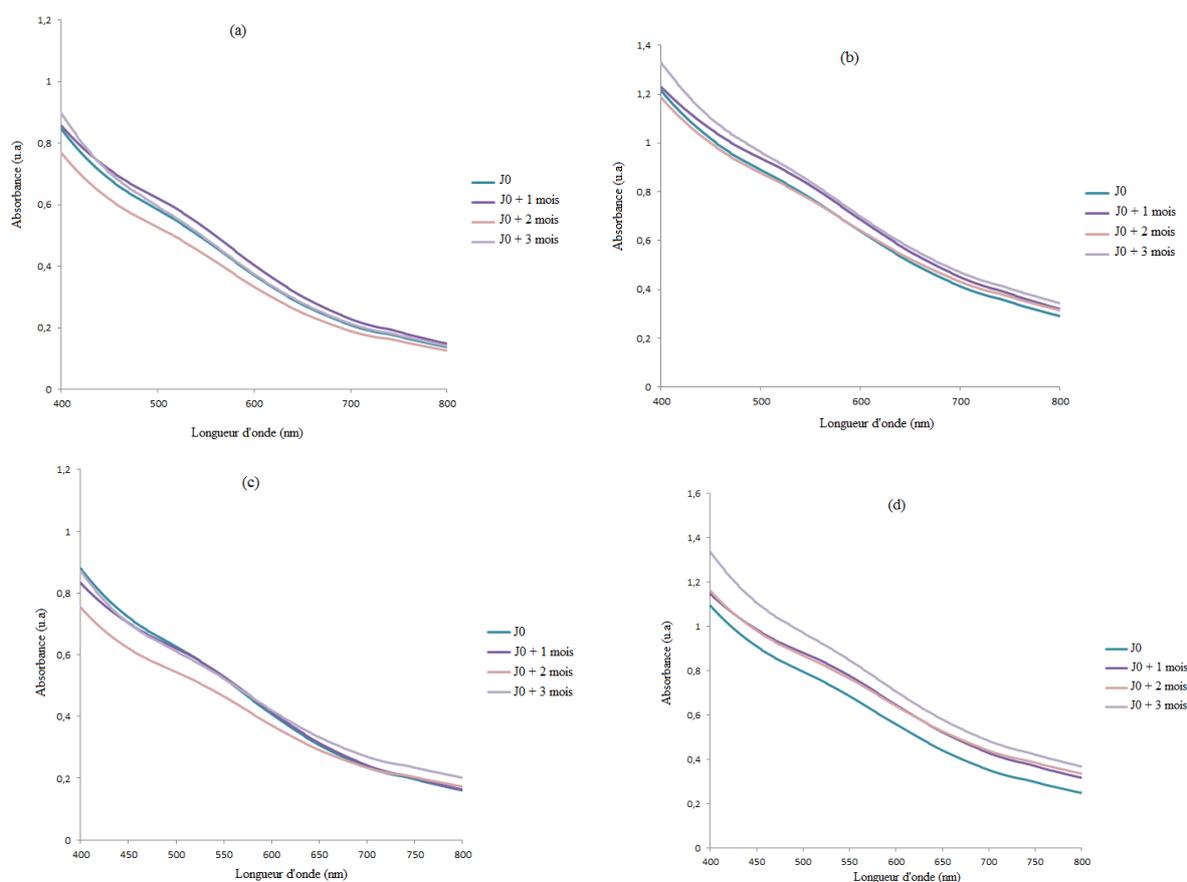


Figure 50: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or, (a et b) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{10}\text{y}(\text{TADFO(Zr)})_{\text{y}}$, et (c et d) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2}\text{y}(\text{TADFO(Zr)})_{\text{y}}$, en milieu aqueux (a et c) et en milieu NaCl/hepes (b et d) à pH 7,4.

Cette relative superposition des spectres reflète une absence de modification modérée des spectres. Nous pouvons en déduire que les suspensions des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{\text{x}}(\text{TADFO})_{\text{y}}$, ($x/y= 10$ et 2) présentent une excellente stabilité colloïdale satisfaisante dans les conditions d'injection (milieu

physiologique). Ces suspensions sont donc aptes pour une administration *in vivo* par injection intraveineuse.

2.3.1.2. Analyse de la couche organique

Les différentes caractérisations réalisées sur les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, ($x/y=10$ et 2) et sur leurs suspensions ont permis de montrer que la réduction de sel d'or en présence du mélange de chélateurs TADOTAGA et TADFO conduisait à la formation de nanoparticules d'or de taille contrôlée avec une bonne stabilité colloïdale. Ces résultats suggèrent que les cœurs d'or sont recouverts par une couche organique dont la composition est inconnue. Afin de mieux caractériser cette couche, nous avons effectué des analyses thermogravimétriques. Après lyophilisation, les différentes poudres de nanoparticules d'or ont été soumises à l'analyse thermogravimétrique. La masse nécessaire pour effectuer une telle mesure est de l'ordre de 1 à 10 mg de poudre pour chaque type de particule d'or. L'analyse thermogravimétrique s'est déroulée sous air avec une isotherme de 10 min et une rampe de température de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 800°C .

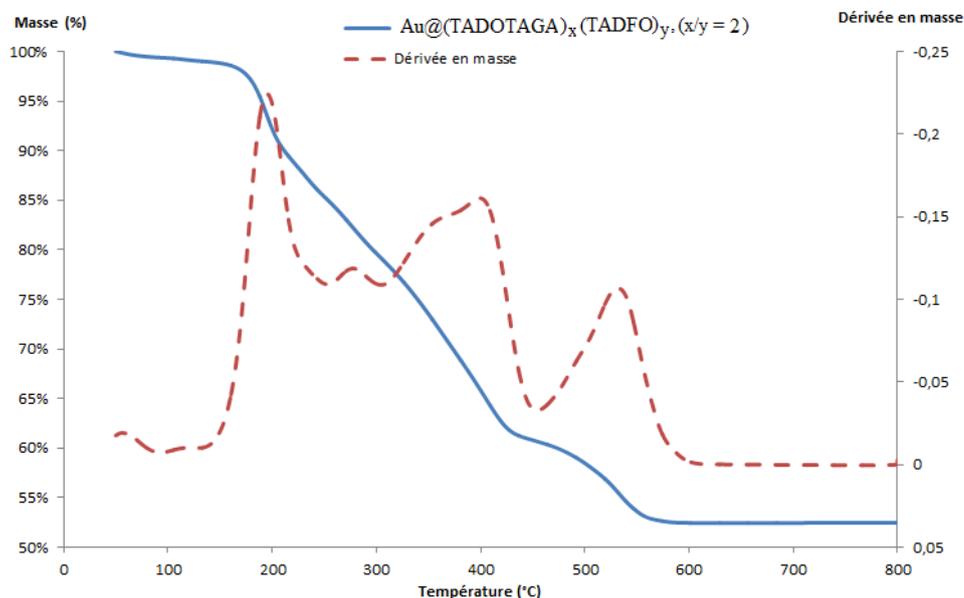


Figure 51: Courbe d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TADFO)}_y$.

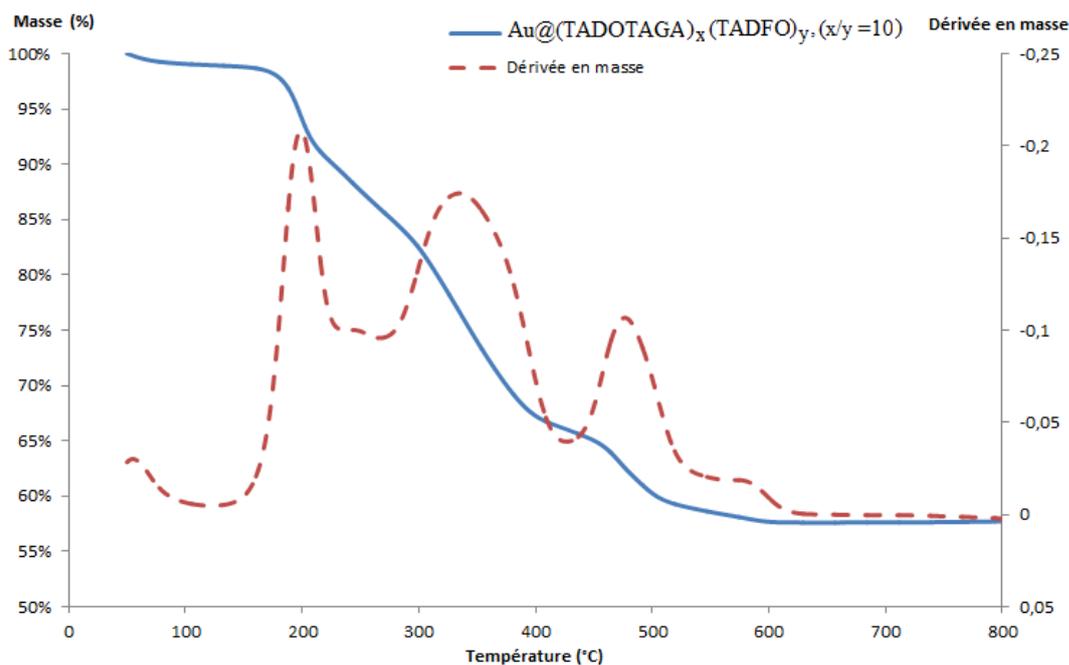


Figure 52: Courbe d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10}\text{(TADFO)}_y$.

Dans les figures 51 et 52, on constate une variation de la masse des échantillons de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, ($x/y=10$ et 2) entre (100 à 550°C , en bleu). Cette variation de masse correspond à la désorption des ligands organiques, macrocyclique (TADOTAGA) et linéaire (TADFO) estimée à 48% pour $x/y=2$ et à $42,5\%$ pour ($x/y=10$) (Figures 51 et 52). Si 100% correspond à la particule fonctionnalisée avec la couche mixte des ligands (TADOTAGA)(TADFO), par soustraction, la masse de l'or restante est évaluée à 52% pour $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TADFO)}_y$ et $57,5\%$ $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TADFO)}_y$ (Figures 51 et 52). Ainsi la perte de masse due à la variation de la température peut-être estimée pour déterminer le nombre de ligands présents par nanoparticule d'or. L'analyse de thermogravimétrie des poudres de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ (avec $x/y = 10$ et 2) confirme la présence d'une couche organique (partie volatile de l'échantillon) dont la proportion (entre $42,5$ et 48%) est du même ordre de grandeur que celle mesurée pour $\text{Au}@\text{TADOTAGA}$ pour une taille similaire du cœur d'or. (41% soit 79 chélateurs TADOTAGA par nanoparticule d'or de $2,3 \pm 0,5$ nm). Les résultats de l'ATG ne permettent cependant pas de distinguer la proportion de TADOTAGA et de TADFO immobilisées à la surface des cœurs d'or d' $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$. Il n'est donc pas possible de déterminer la

quantité exacte des chélateurs à la surface de ces nanoparticules mais seulement un intervalle dont les bornes supérieures et inférieures encadrent la valeur globale de chélateurs TADOTAGA, TADFO présents à la surface des nanoparticules (Tableau 16). En effet, connaissant le diamètre du cœur d'or (MET), le pourcentage de la phase métallique et celui de la phase organique (ATG), la masse molaire de chaque chélateur, il est possible d'accéder à la quantité totale de chélateur (TADOTAGA + TADFO) par nanoparticule d'Au@ $(\text{TADOTAGA})_x(\text{TADFO})_y$.

Tableau 16 : Composition de la couche organique déterminée par ATG

Au@ $(\text{TADOTAGA})_x(\text{TADFO})_y$			
x/y		10	2
$D_h(\text{nm})$		8,04	8,86
$\Phi_{\text{TEM}} (\text{nm})$		2,30 nm	2,43 nm
% massique de l'or		52	57,5
% massique de couche organique		48	42,5
Nombre de chélateurs/ Nanoparticule	Si 100 % de TADOTAGA	73	66
	Si 100 % TADFO	69	61

D'après le tableau 16, le nombre de chélateurs TADOTAGA et TADFO est compris entre 69 et 73 pour $x/y = 10$ et entre 61 et 66 pour $x/y = 2$. Ces valeurs sont proches de celle de nanoparticule d'or Au@TADOTAGA (79 par nanoparticule).

2.3.1.3. Marquage des nanoparticules par les ions gadolinium (III) et le radioélément zirconium-89

L'étude de la complexation de l'ion gadolinium (III) sur les nanoparticules d'or recouvertes par une enveloppe mixte de ligands ($\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$ ($x/y=10$ et 2)) a été réalisée par titration colorimétrique avec le xylénol orange. Visuellement, la complexation de l'ion gadolinium libre donne lieu à un changement de couleur du xylénol orange lorsqu'il est complexé avec l'ion Gd^{3+} . La coloration du xylénol orange passe de l'orange au rose. Elle se traduit par une déformation de la courbe d'absorption UV-visible du xylénol orange en présence de l'ion gadolinium (Figure 53). En l'absence de Gd^{3+} , le xylénol orange est caractérisé par une forte bande d'absorption à 443 nm (courbe bleue) tandis qu'en présence de Gd^{3+} , on observe une diminution de la bande d'absorption à 433 nm et une augmentation de l'absorbance à 573 nm qui sont caractéristiques de la complexation du xylénol orange avec Gd^{3+} libre en milieu tampon (pH 5,8) (courbe violette, Figure 53).

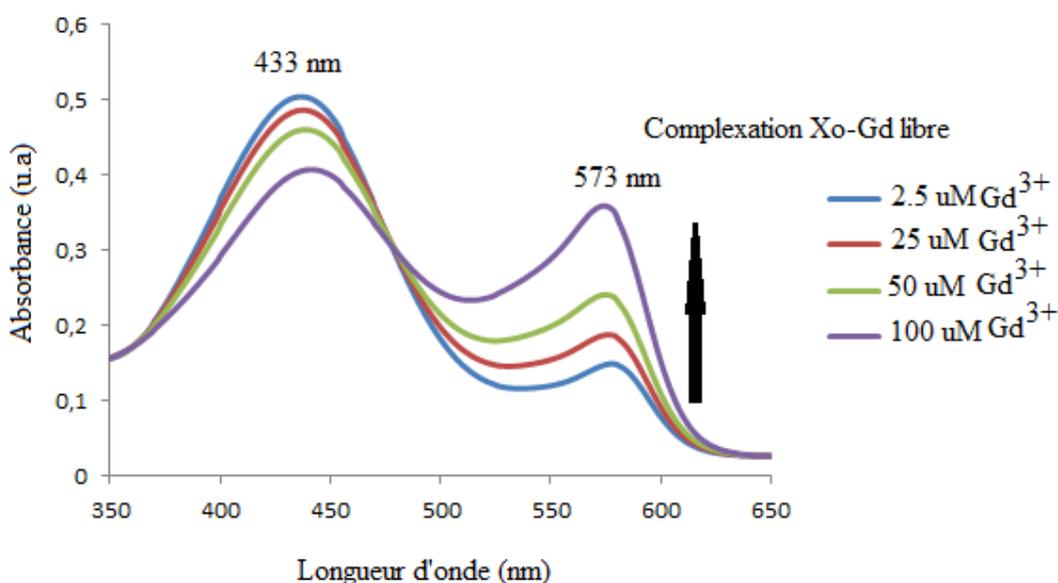


Figure 53: Spectre UV-visible de xylénol orange en présence d'une quantité croissante d'ions gadolinium

Par la suite, nous avons quantifié avec précision la quantité d'ion gadolinium non complexé par cette technique de dosage. Pour une quantité d'or ($1,05 \cdot 10^{-5}$ mol), nous avons observé que 97% des ions Gd^{3+} étaient complexés jusqu'à une quantité d'ions Gd^{3+} ajoutée de $1,698 \cdot 10^{-6}$ mol. Au-delà de cette quantité d'ions ajoutée aux nanoparticules, le pourcentage diminue. Cela indique que le maximum d'ions

complexés est atteint lorsque $1,698 \cdot 10^{-6}$ mol de Gd^{3+} ont été ajoutées à $1,05 \cdot 10^{-5}$ mol d'or. Considérant qu'une nanoparticule d'or contient entre 411 et 464 atomes d'or lorsque le diamètre varie de 2,40 nm à 2,50 nm (intervalle dans lequel est compris le diamètre moyen des nanoparticules, nous pouvons en déduire le nombre d'ions Gd^{3+} et donc de chélateur TADOTAGA par nanoparticule (Tableau 17).

Tableau 17 : Quantification des nombres de chélateurs (TADOTAGA) par dosage d'ions gadolinium (III) libre

Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y		
Φ_{TEM} (nm)	2,40	2,50
Nombre de nanoparticules dans l'échantillon (mol)	$2,47 \cdot 10^{-8}$	$2,188 \cdot 10^{-8}$
Nombre de Gd^{3+} libre (3%) (mol)	$4,941 \cdot 10^{-7}$	
Nombre de Gd^{3+} introduit (mol)	$1,698 \cdot 10^{-6}$	
Nombre de Gd^{3+} complexé (97%) (mol)	$1,647 \cdot 10^{-6}$	
Nombre de chélateurs (TADOTAGA)/ Nanoparticule	69	78

Les résultats obtenus sont prometteurs et sont dans le même ordre des grandeurs que ceux déterminés par l'étude de complexation de l'ion zirconium libre (IV) (Tableau 18).

Comme il est connu que le ligand TADFO forme un complexe stable avec l'ion zirconium(IV) (Zr^{4+}), nous avons aussi voulu quantifier par dosage colorimétrique, la quantité de d'ions zirconium libres. Il forme un complexe stable avec des reflets violet bleuâtre avec le Chromazurol S (CAS), en milieu acide (pH 4) avec une absorption maximale à 598 nm. L'étude de complexation des ions zirconium libres

a montré des résultats encourageants avec l'apparition de la coloration violette (Figure 54). Par conséquent, nous avons pu déterminer le nombre d'ions zirconium(III) libres. Le calcul pour quantifier le nombre des ions zirconium (III) libres est similaire à le même que précédent (Tableau 17). Comme le montre la figure 54, pour une quantité d'or ($5,07 \cdot 10^{-6}$ mol), nous avons constaté que les ions Zr^{4+} complexaient à partir d'une quantité d'ions Zr^{4+} ajoutée compris entre $6,675 \cdot 10^{-7}$ et $1,335 \cdot 10^{-6}$ mol. Mais cette complexation n'est pas totale, ce qui veut dire qu'une partie des ions zirconiums ne sont pas complexés. Si on considère qu'une nanoparticule d'or contient entre 411 et 464 atomes d'or lorsque le diamètre varie de 2,40 nm à 2,50 nm (intervalle dans lequel est compris le diamètre moyen des nanoparticules, nous pouvons en déduire le nombre d'ions Zr^{4+} et donc de chélateur TADFO par nanoparticule (Tableau 18).

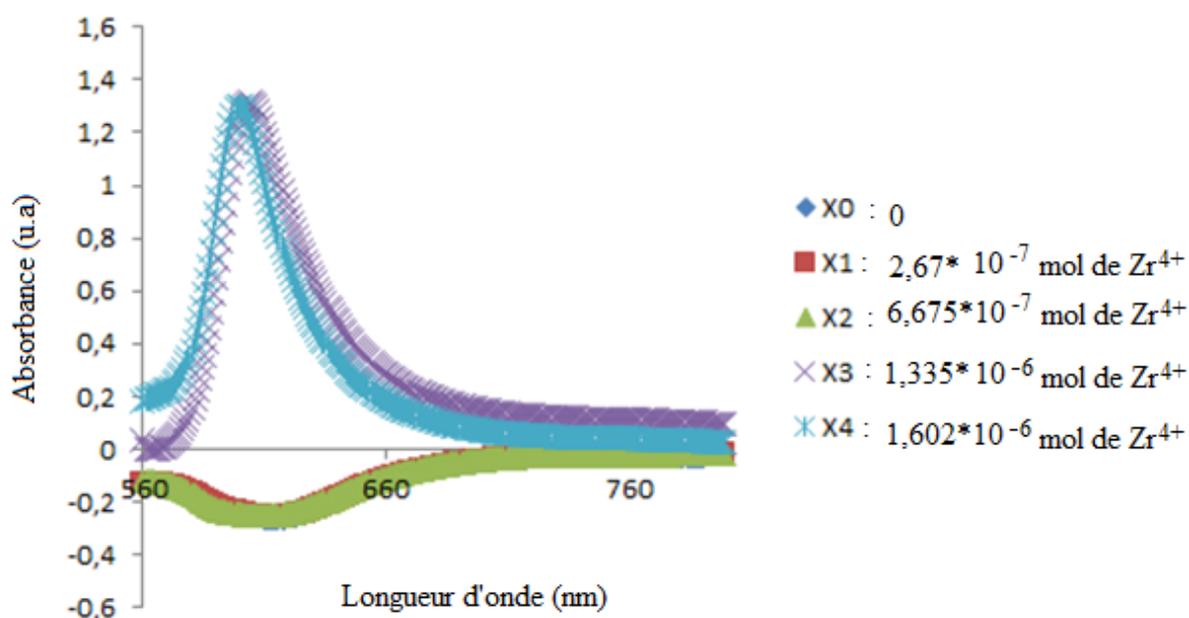


Figure 54: Spectre des suspensions de nanoparticules Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y en présence d'ions Zr⁴⁺ et de Chromazurol S.

Tableau 18 : Détermination des nombres de chélateurs (TADFO) par dosage d'ions zirconium (IV) libre

Au@(TADOTAGA) _{2y} (TADFO) _y		
Φ_{TEM} (nm)	2,40	2,50
Nombre de nanoparticules dans l'échantillon (mol)	$1,23 \cdot 10^{-8}$	$1,09 \cdot 10^{-8}$
Nombre de Zr ⁴⁺ introduit (mol)	$6,675 \cdot 10^{-7}$	
Nombre de chélateurs (TADFO)/Nanoparticule	54	61

D'après le tableau 18, le nombre de chélateurs TADFO par nanoparticule est compris entre 54 et 61. Ces résultats sont proches de celle déterminée par l'ATG sur la même nanoparticule d'or.

Pour confirmer cela, une étude de radiomarquage a été réalisée par la suite sur les nanoparticules Au@(TADOTAGA)_x(TADFO)_y (avec $x/y = 10$ et 2). Le radiomarquage consiste à immobiliser à la surface des nanoparticules d'or, un radio-isotope pour l'imagerie nucléaire (TEMP ou TEP). Le radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TADFO)_y par ⁸⁹Zr⁴⁺ a été réalisé par Dr Mathieu Moreau (ICMUB) au CGFL Dijon et par Dr Vu Long Tran et Dr Charles Truillet (IMIV, CEA ; Orsay). Le radiochromatogramme d'une solution d'oxalate de zirconium-89 présente un seul pic intense à environ 11 cm du point de dépôt (Figure 55A). La forte radioactivité mesurée entre 10 et 12 cm (pic) est associée à la présence des ions zirconium-89 qui ont été entraînés par l'éluant. Le radiochromatogramme des nanoparticules d'or révèle également la présence d'un pic intense mais à l'endroit du dépôt (Figure 55B et 56). Il est le signe d'une forte activité attribuée à la présence des ions ⁸⁹Zr⁴⁺. Comme le radiochromatogramme ne présente qu'un seul pic visible à l'endroit du dépôt de la suspension de nanoparticules, nous pouvons en déduire que la quasi-totalité des ions ⁸⁹Zr⁴⁺ n'a

pas été éluée alors que l'éluant utilisé favorise l'élué des ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$ libres (Figure 55A). L'examen visuel des radiochromatogrammes après le dépôt des nanoparticules d'or permet de constater la présence d'une tache brune avant et après l'élué. Cette tache brune correspond aux nanoparticules d'or qui ne migrent pas malgré l'élué.

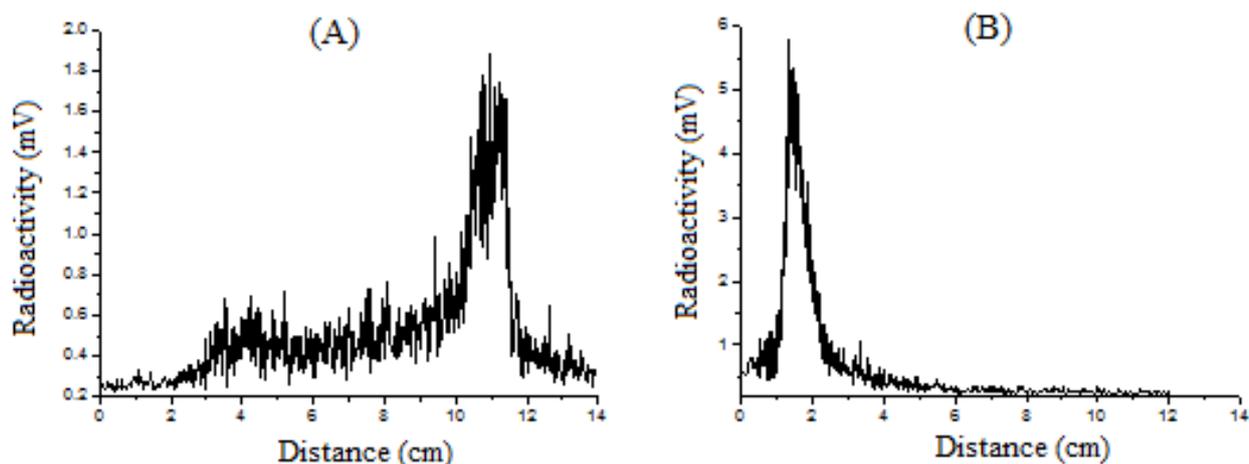
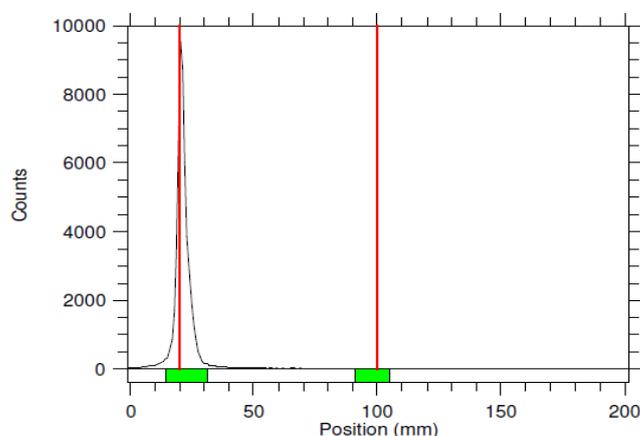


Figure 55: Radiochromatogramme (CCM) après élué (A) d'une solution d'oxalate de zirconium-89 et (B) d'un mélange d'ions zirconium-89 et de nanoparticules $\text{Au@TADOTAGA}(\text{Gd})_{10}\text{y}(\text{TADFO})_{\text{y}}$ (60 min à 80°C).

L'absence d'élué des nanoparticules d'or a été observée quelle que soit la quantité de TADFO (le chélateur de l'ion zirconium-89) dans la couche organique (Figure 56).

(a)

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	31.0	21.3	0.016	50041.0	50041.0	93.57	99.83
Rgn 2	90.8	104.9	96.2	0.953	83.0	83.0	0.16	0.17
2 Peaks					50124.0	50124.0	93.73	100.00



(b)

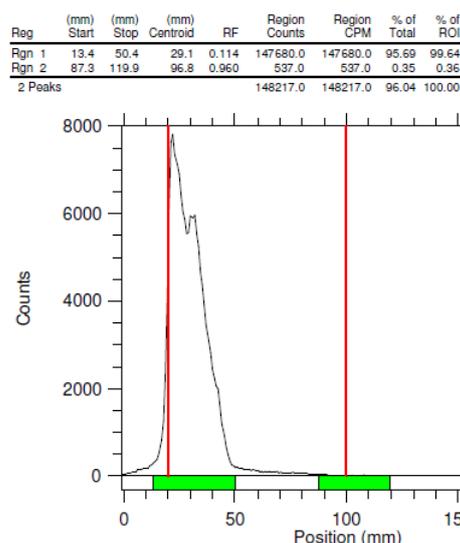


Figure 56: Radiochromatogramme après élution d'un mélange d'ions zirconium-89 et d'une suspension de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y$, (a) $x/y=2$ et b) $x/y=10$.

Ces observations suggèrent que les ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$ et les nanoparticules d'or sont colocalisés. Cette colocalisation peut être interprétée comme la marque d'un radiomarquage efficace des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TADFO)}_y$ par les ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$. La pureté radiochimique des suspensions colloïdales marquées au zirconium-89 est très élevée (99,83 % pour $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TADFO)}_y$ et 99,64 % $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TADFO)}_y$). De plus, le radiomarquage est rendu possible par la présence de TADFO car les tentatives de radiomarquage de $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}$ ont échoué (Figure 57).

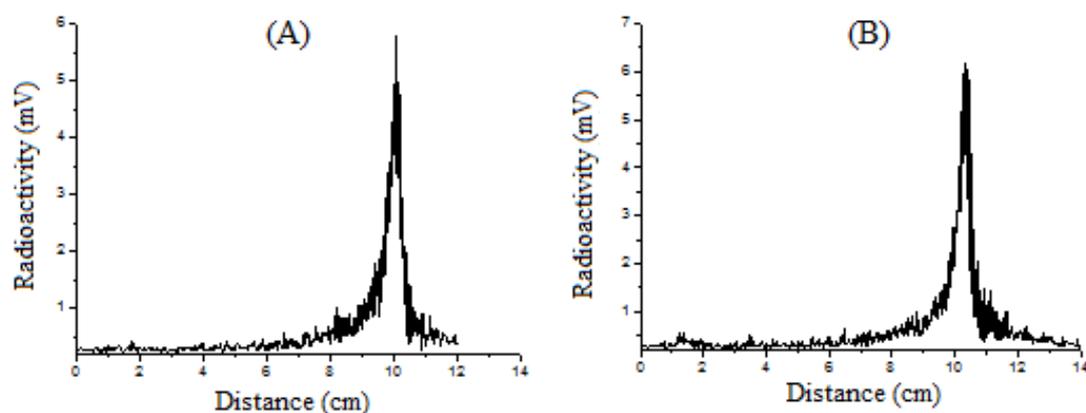


Figure 57: Radiochromatogrammes (CCM) après élution d'un mélange d'ions zirconium-89 et de nanoparticules $\text{Au}@\text{TADOTAGA(Gd)}$: incubation pendant (A) 60 min à 37°C et (B) 60 minutes supplémentaires à 80°C .

L'ajout d'une solution d'oxalate de zirconium-89 à une suspension de nanoparticule Au@(TADOTAGA(Gd)) à 37°C et à 80°C présentent un pic d'éluion positionné à la même distance (10-11 cm) de la zone de dépôt (0 cm) que le pic enregistré pour la solution d'oxalate de zirconium-89 (Figure 55A et 57). Même à 80°C, (l'augmentation de température étant connu pour favoriser la complexation des ions par les macrocycles DOTA), la quantité d'ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$ complexée par la couche organique de Au@(TADOTAGA(Gd)) est très faible (moins de 3%) contrairement à ce qui a été observé avec les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TADFO)_y renfermant le motif DFO dans la couche organique adsorbée à la surface des cœurs d'or. En plus, d'une pureté radiochimique élevée, le radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TADFO)_y est caractérisé par une excellente stabilité. Aucun relargage d'ions $^{89}\text{Zr}^{4+}$ n'est observé durant 7 jours quand les nanoparticules d'or radiomarquées Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TADFO)_y sont dispersées dans du sérum de veau fœtal. Seule une petite fraction est libérée (<5 %) au bout de 7 jours lorsque les nanoparticules sont mises en contact avec un chélateur compétiteur (EDTA) (Figure 58).

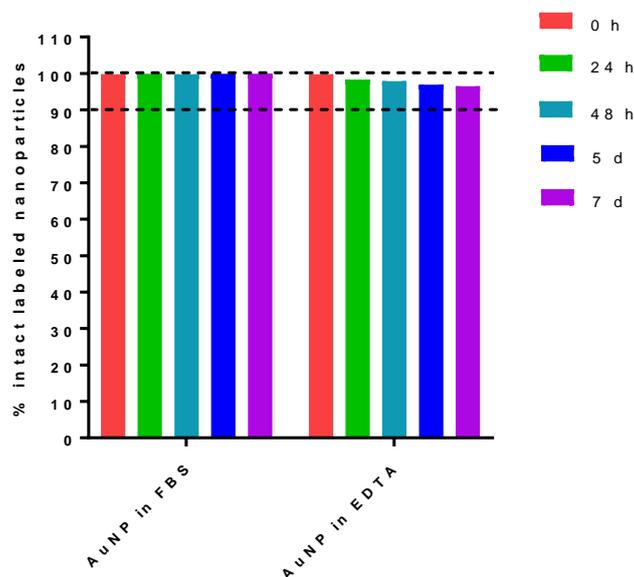


Figure 58: Etude de la stabilité du radiomarquage des suspensions de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_{10y}(TADFO(^{89}Zr))_y dans du sérum de veau fœtal (FBS) et en présence d'un compétiteur EDTA.

Les nanoparticules d'or $(\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_x\text{(TADFO)}_y)$ ($x/y=10$ et 2) radiomarquées par $^{89}\text{Zr}^{4+}$ bénéficient d'après l'étude de radiomarquage de caractéristiques avantageuses (pureté radiochimique et stabilité élevées) qui justifient leur utilisation *in vivo* comme agent d'imagerie simultanée IRM/TEP.

2.3.1.4. Etude de la biodistribution *in vivo*

Suite au radiomarquage réalisé avec succès, nous avons effectué une étude de biodistribution *in vivo* avec les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TADFO}(^{89}\text{Zr}))_y$ ($x/y=10$ et 2). Le suivi simultané des nanoparticules $(\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TADFO}(^{89}\text{Zr}))_y)$ en IRM/TEP est rendu possible par la complexation des ions gadolinium par le dérivé DOTAGA pour l'IRM et par l'immobilisation des ions zirconium-89 ($^{89}\text{Zr}^{4+}$) par la DFO pour la TEP. L'objectif de cette étude *in vivo* était de vérifier qu'un suivi par imagerie IRM/TEP simultanée était possible et de comparer les comportements biologiques des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TADFO}(^{89}\text{Zr}))_y$ ($x/y=10$ et 2) après injection intraveineuse dans des souris normales. Après injection, les nanoparticules ont été suivies de manière simultanée par imagerie IRM/TEP. L'acquisition des images en IRM réalisée 1h après injection intraveineuse des suspensions de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_y\text{(TADFO}(^{89}\text{Zr}))_y$ mettent en évidence un rehaussement de contraste positif dans le foie et plus faiblement dans les reins et dans la vessie (Figure 59). Dans le même temps, la TEP révèle que la radioactivité est cantonnée dans certaines zones de l'organisme mais en raison d'une mauvaise résolution et de l'absence de repère anatomique, il est difficile d'identifier précisément les tissus dans lesquels sont localisés les radioisotopes. La fusion des images acquises en IRM et en TEP montre une superposition locale et précise du rehaussement du contraste positif en IRM et de la radioactivité (TEP) 1h et 24h après injection par voie intraveineuse (Figure 59).

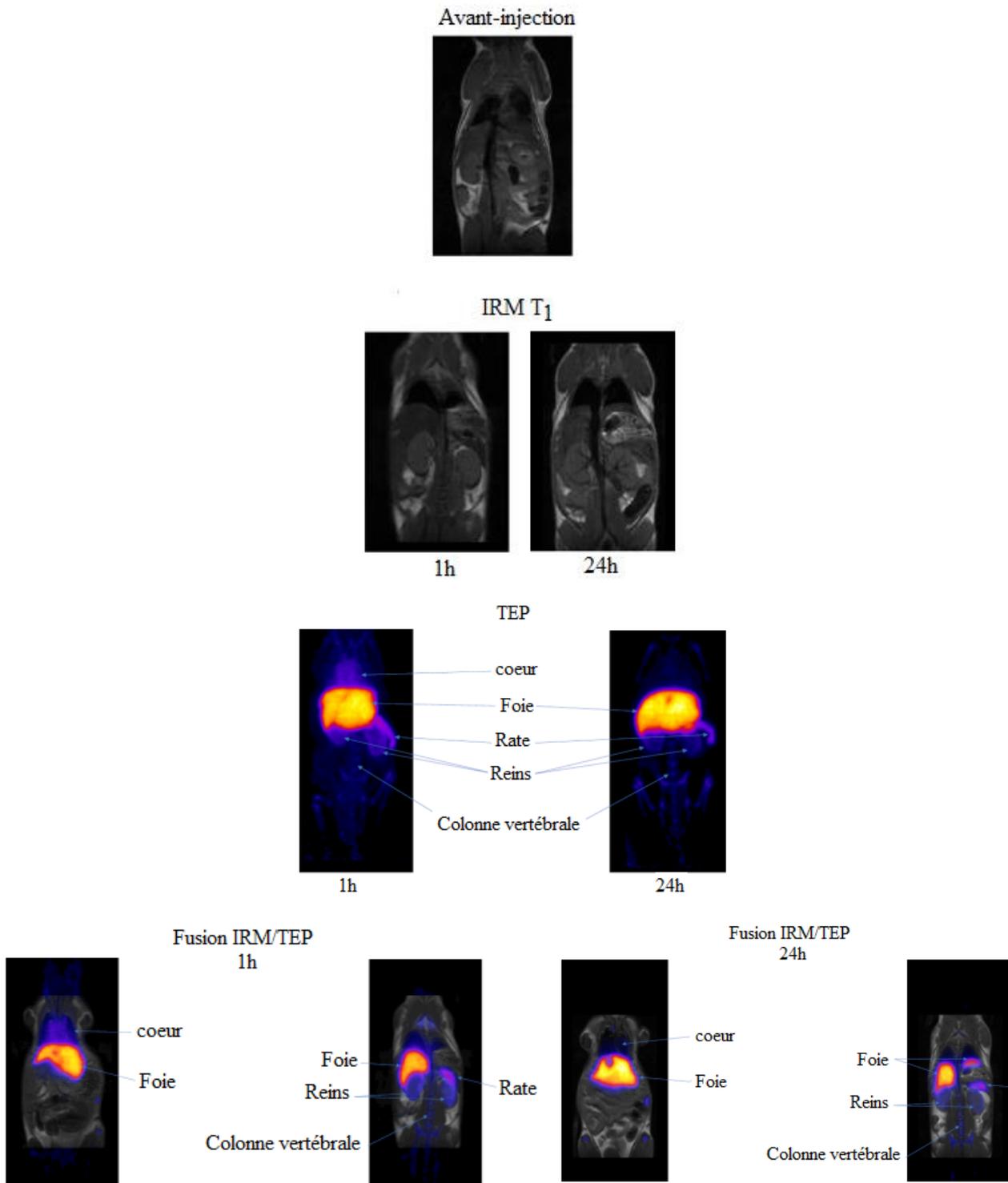


Figure 59: Images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 24h après injection par voie intraveineuse de nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_2\text{y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))\text{y}$.

Contrairement au cas des nanoparticules $\text{Au} @ \text{TADOTAGA}(\text{Gd}$ ou In) dont la composition est proche de celle des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TADFO})({}^{89}\text{Zr})\text{y}$, nous avons constaté sur les fusions

d'images IRM/TEP une accumulation importante des nanoparticules d'or dans le foie, le cœur, la rate et sur la colonne vertébrale.

Pour confirmer la colocalisation des nanoparticules d'or et de la radioactivité, nous avons effectué un comptage gamma post-mortem et un dosage ICP des mêmes organes. Le résultat du comptage gamma post-mortem des différents organes coïncide avec les images en IRM, en TEP et également la fusion des images IRM/TEP (Figure 60).

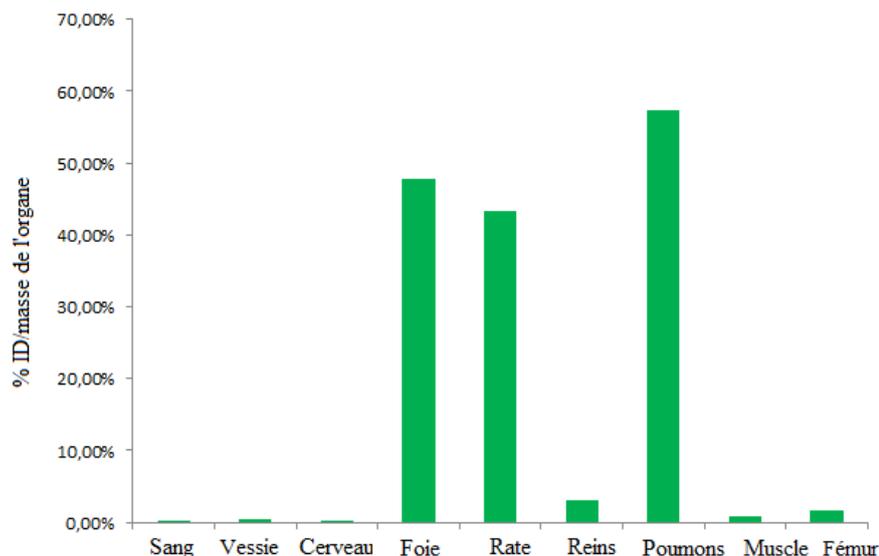


Figure 60: Biodistribution 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ d'après le comptage gamma post-mortem.

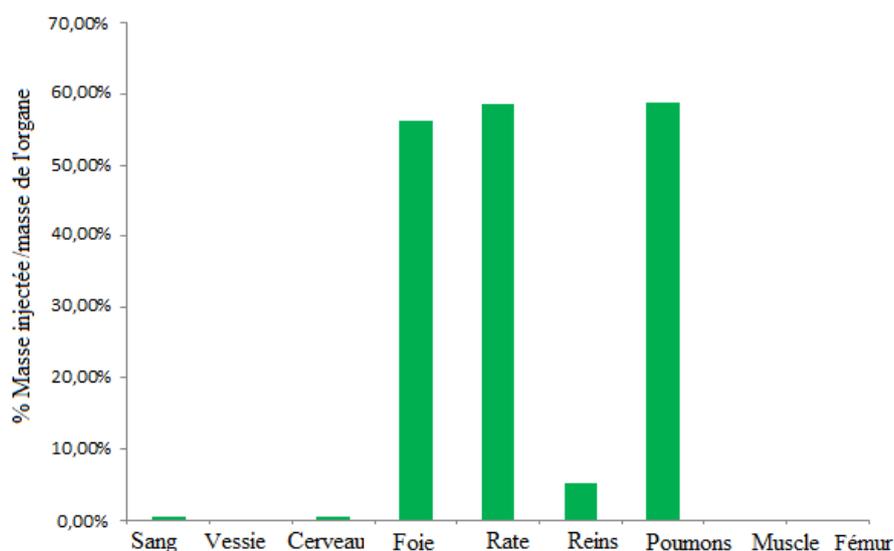


Figure 61: Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd})_2(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$.

L'analyse ICP des organes montre qu'il y a une quantité d'or importante et similaire en proportion dans le foie, les poumons, la rate et beaucoup plus faible dans les reins (Figure 61). L'allure semblable des graphes tracés à partir des résultats du comptage gamma et du dosage de l'or par ICP confirme que la radioactivité dans les différents organes est bien due à la présence des nanoparticules radiomarquées au zirconium-89 et non à celle du zirconium-89 libre.

Visiblement, le profil de biodistribution des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ n'est pas celui qui était attendu. Au lieu d'observer une élimination rénale rapide qui avait déjà été observé pour les nanoparticules proches en termes de composition ($\text{Au} @ \text{TADOTAGA}(\text{Gd}$ ou In) [131], nous constatons d'après les images acquises simultanément par IRM/TEP, l'analyse ICP et le comptage post-mortem, une forte accumulation dans le foie (Figures 59, 60 et 61). Cela semble résulter du caractère hydrophobe du ligand DFO qui a tendance à favoriser la capture hépatique des nanoparticules par le foie. En revanche, lorsqu'on diminue la quantité du ligand TADFO en synthétisant de nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{10y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ avec un rapport molaire (TADFO/TADOTAGA) plus faible, la biodistribution de ces nanoparticules se rapproche de celle observée pour $\text{Au} @ \text{TADOTAGA}$ avec une plus grande accumulation dans les reins et la vessie. Cependant, une légère accumulation dans le foie et dans la rate bien que plus faible que celle observée dans le cas des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ a été constatée 30 min et 20h après l'injection par voie intraveineuse (Figure 62).

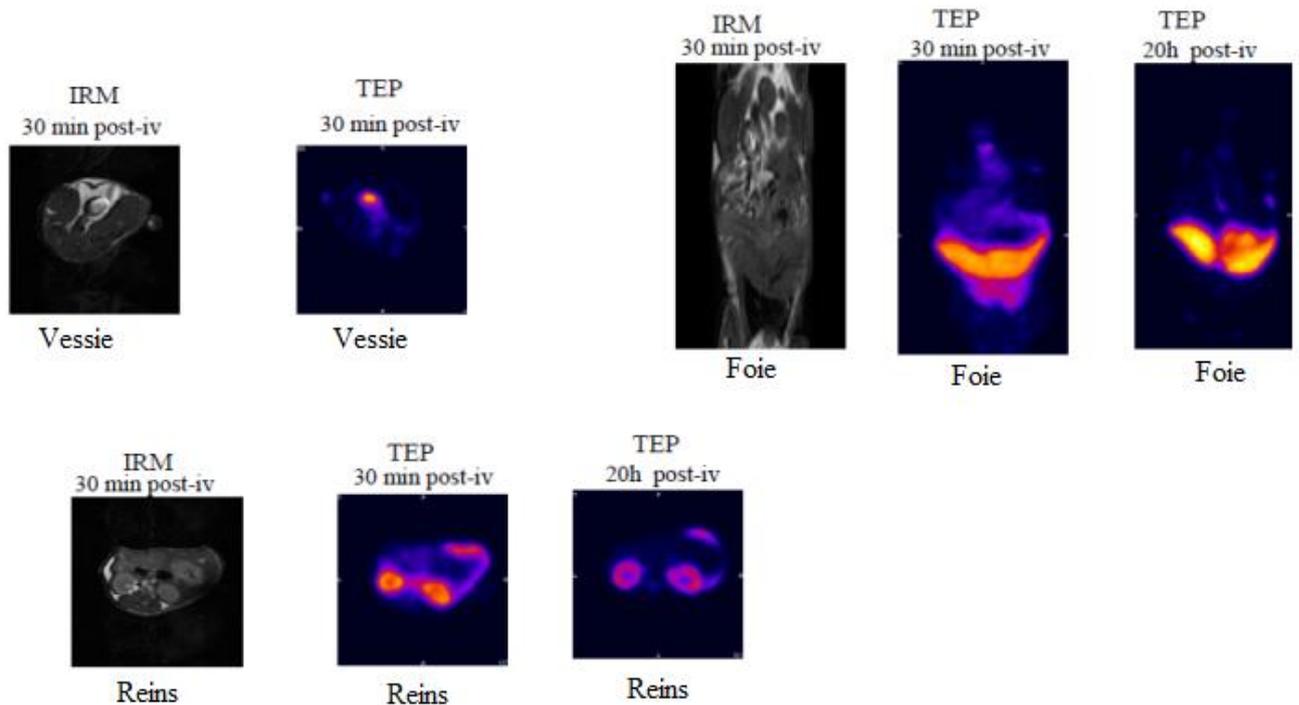


Figure 62: Images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 20h après injection par voie intraveineuse des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{10} (\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$.

D'autres pistes peuvent être envisagées pour trouver une alternative à l'utilisation du ligand DFO afin d'améliorer la biodistribution de la sonde bimodale. Récemment dans le cadre de leurs travaux de recherche, Pandya *et al.* ont démontré que le ligand macrocyclique DOTA complexait mieux l'ion zirconium que le ligand DFO [132]. De plus, ils ont montré que la biodistribution *in vivo* du complexe $({}^{89}\text{Zr}\text{-DOTA})$ était plus adaptée que celle du complexe ${}^{89}\text{Zr}\text{-DFO}$. Aucune accumulation dans le foie et la rate n'a été constatée durant cette étude. Nous nous sommes donc inspirés de ce résultat prometteur pour adapter le comportement des nanosondes IRM/TEP. Mais les tentatives de radiomarquages de nanoparticules $\text{Au} @ \text{TADOTAGA}$ par les ions zirconium-89 se sont soldées par un échec.

2.3.2. Au@(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA) et Au@(TADOTAGA) (TANODAGA), (x/y=10 et 2).

Nous avons montré qu'il était possible de co-marquer des nanoparticules par les ions Gd^{3+} et $^{89}Zr^{4+}$. Grâce à ce double marquage, les nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_x(TADFO)_y$ ont pu être suivies par imagerie simultanée IRM/TEP. Cependant le caractère hydrophile de TADFO pose problème pour la synthèse et semble préjudiciable au contrôle de la biodistribution. Des travaux sont en cours pour mettre au point des chélateurs du zirconium plus hydrophiles. Nous avons également cherché dans le cadre de cette thèse à développer des nanoparticules d'or co-marquées par les ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$. Les ions $^{64}Cu^{2+}$ sont comme les ions $^{89}Zr^{4+}$ des émetteurs de positon mais possèdent une durée de vie plus courte (~12,7h contre 78,4h). Les nanoparticules d'or ainsi marquées pourront également être suivies simultanément par IRM/TEP. Un des atouts des ions $^{64}Cu^{2+}$ est qu'il existe une large gamme de chélateurs hydrophiles contrairement au cas des ions $^{89}Zr^{4+}$. Dans le cadre d'une étude préliminaire, nous avons confirmé que les dérivés DOTA n'étaient pas les mieux adaptés pour préparer des radiotraceurs à base de $^{64}Cu^{2+}$. Nous avons opté pour l'immobilisation de deux types de macrocycles hydrophiles, TADOTAGA et TANODAGA, pour former des complexes stables avec Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$, respectivement. La synthèse des nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_x(TANODAGA)_y$ a été réalisée par réduction du sel d'or $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ avec $NaBH_4$ en présence d'un mélange de ces chélateurs ($x/y = n(TADOTAGA)/n(TANODAGA) = 10$ et 2). Afin d'éviter une éventuelle compétition entre la formation des chélates TADOTAGA(Gd) et TANODAGA(Gd) lors du marquage des nanoparticules $Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA)_y$ par les ions gadolinium, nous avons également exploré la possibilité de remplacer dans le mélange réactionnel le chélateur TADOTAGA par le chélate de gadolinium TADOTAGA(Gd) tout en préservant le rapport molaire ($x/y = n(TADOTAGA(Gd))/n(TANODAGA)$).

Après synthèse et purification, les nanoparticules ont d'abord été caractérisées par spectrophotométrie UV-visible (Figure 63) de suspensions diluées dans l'eau (0,2 g Au/L).

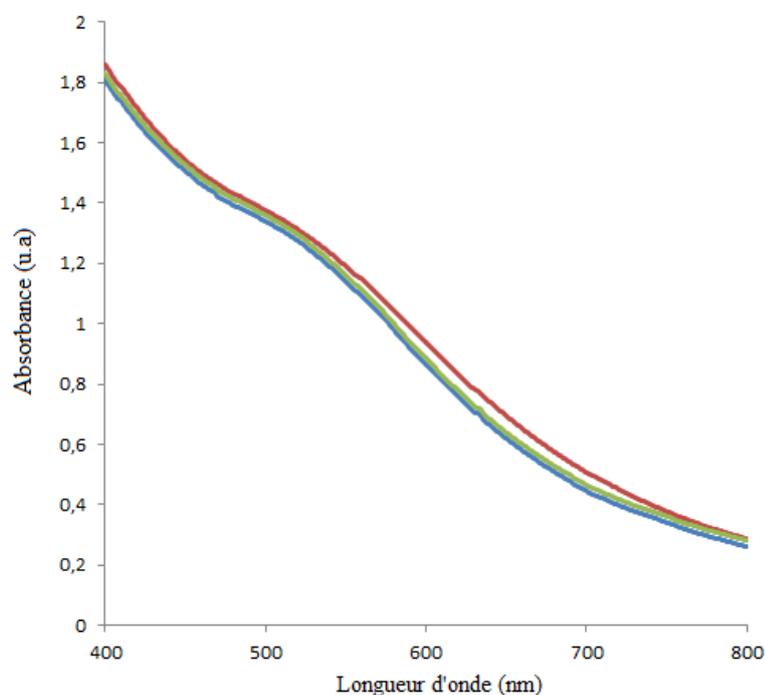


Figure 63: Spectres UV visible de suspensions des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ (bleue), $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ (vert) et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$ (rouge).

Les trois types de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$ sont quasiment indiscernables. Ils présentent une allure semblable avec une faible forme aplatie de la bande de plasmon (autour de 520 nm) qui est caractéristique des nanoparticules d'or possédant une taille inférieure à 3 nm. D'après l'interprétation des spectres, le diamètre des cœurs d'or de ces 3 types de nanoparticules est inférieur à 3 nm. Afin de préciser plus finement la taille des cœurs d'or de chaque échantillon, nous avons effectué de la microscopie électronique en transmission (MET) après dépôt et séchage d'une goutte de chacune des suspensions. Environ une vingtaine d'images ont été prises pour chaque échantillon $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$; $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$; $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$. A première vue, les micrographes des nanoparticules montrent une dispersion optimale des nanoparticules d'or et une distribution en taille assez homogène (Figure 64). Le diamètre du cœur d'or moyen déterminé à partir des images est compris entre 2,42 et 2,49 nm. Ces dimensions sont similaires à celle du cœur d'or des nanoparticules

d'or (Au@TADOTAGA) déterminées précédemment. Comme le suggérait l'analyse des spectres d'absorption UV-visibles réalisés sur les mêmes suspensions colloïdales, la taille des cœurs d'or est inférieure à 3 nm.

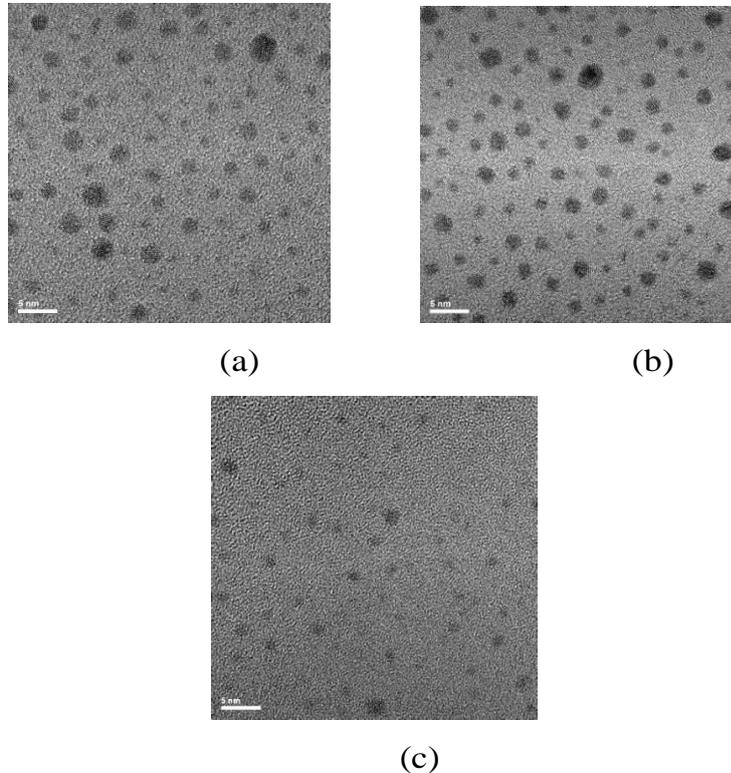


Figure 64: Clichés TEM des particules d'or (a) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ (b) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ et (c) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{10y}(\text{TANODAGA})_y$.

En outre, le diamètre hydrodynamique des différentes nanoparticules a été mesuré par diffusion de lumière DLS (Tableau 19). Les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TANODAGA})_y$ ($x/y=2$ et 10) sont très proches aux incertitudes près (respectivement 10,2 nm; 9,34 nm ; 9,6 nm). Et comme la clairance rénale n'est observée que pour des nanoparticules dont le diamètre hydrodynamique ne dépasse pas 10 nm. Nous pouvons en conclure que ces nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TANODAGA})_y$ ($x/y=2$ et 10) sont adaptées pour les applications *in vivo*. L'ensemble de ces mesures de taille (UV-visible, ϕ_{TEM} , D_h) a été réalisés après dilution de suspensions colloïdales purifiées dont la concentration en or déterminée par ICP-AES varie entre 8 et 10 g/L.

Tableau 19: Résultats récapitulatifs des mesures physico-chimiques (DLS, ICP-AES).

Nanoparticules d'or	$\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TANODAGA})_y, (x/y=2)$	$\text{Au@}(\text{TADOTAGA})_x(\text{ANODAGA})_y, (x/y=2)$	$\text{Au@}(\text{TADOTAGA})_x(\text{TANODAGA})_y, (x/y=10)$
D_h (nm)	10,2 nm	9,34 nm	9,62 nm
ϕ_{TEM} (nm)	2,42 nm	2,45 nm	2,49 nm

Si le contrôle de la taille des nanoparticules est important pour les applications *in vivo*, la stabilité colloïdale est capitale pour le suivi simultané des nanoparticules par IRM/TEP. Elle a été donc déterminée en fonction du pH, sur une large gamme de pH allant 1 à 11. L'allure des spectres des suspensions colloïdales des échantillons $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA})_y$, $\text{Au@}(\text{TADOTAGA})_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ et $\text{Au@}(\text{TADOTAGA})_{10y}(\text{TANODAGA})_y$ à différents pH montre une superposition des courbes sur une large gamme de pH (Figure 65).

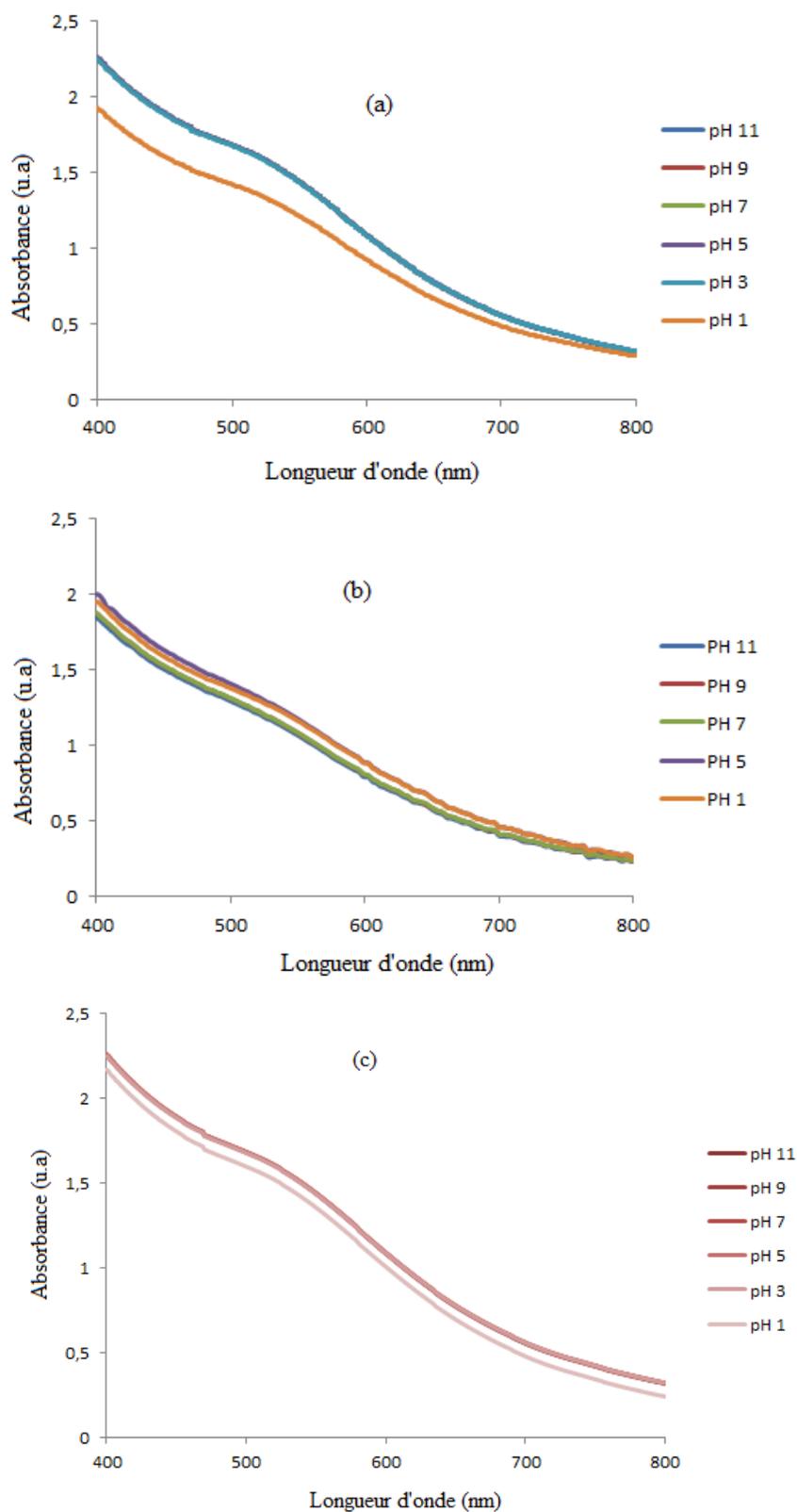


Figure 65: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or à différents pH : (a) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ (b) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{10y}(\text{TANODAGA})_y$ et (c) $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA})_y$.

Cette stabilité colloïdale des nanoparticules est attribuée à la répulsion électrostatique de charges présentées à leur surface. Comme le montre l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH. Les courbes de potentiel Zêta de différentes nanoparticules d'or montrent la même allure sur la gamme de pH [1-11], (Figure 66).

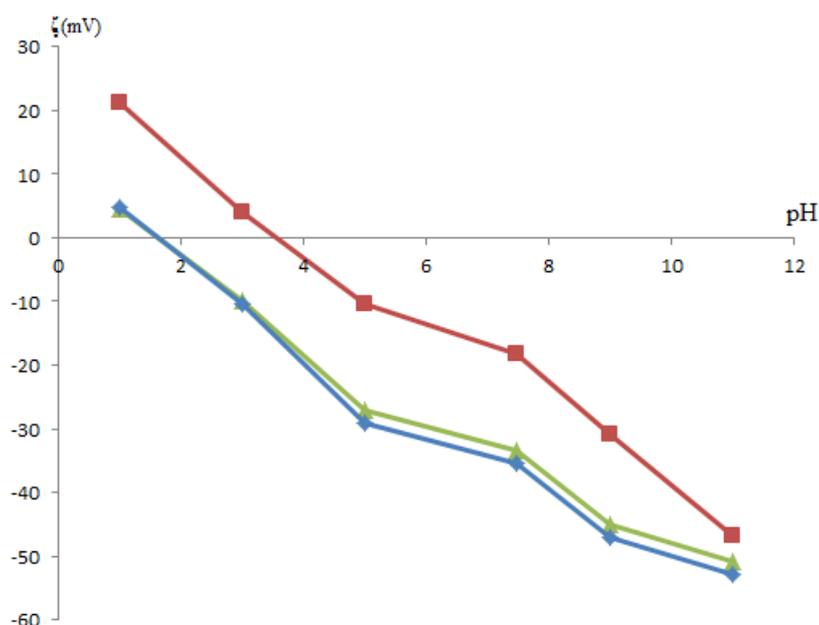
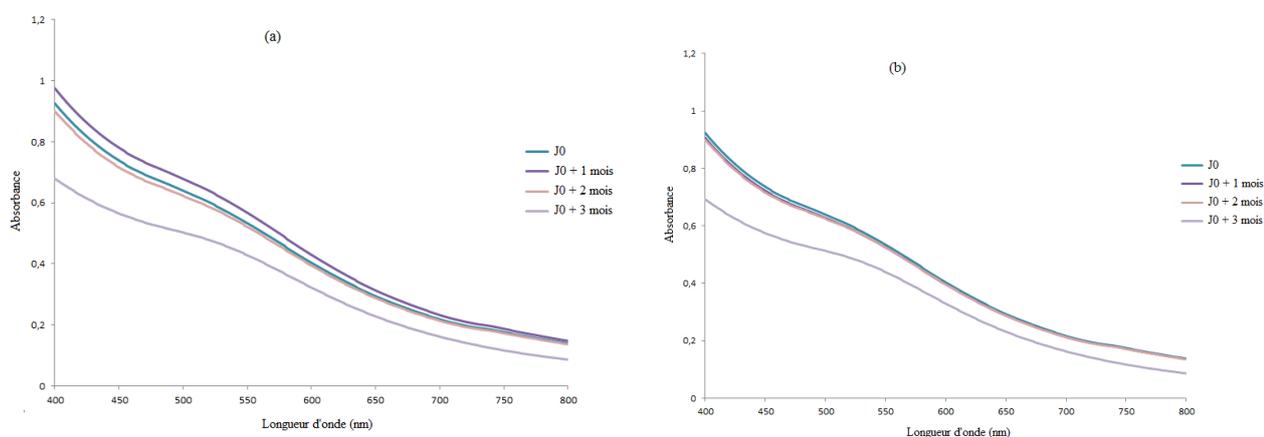


Figure 66: Courbe représentant le potentiel zêta en fonction du pH des différentes suspensions de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$, $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$.

Les charges positives pour pH inférieur à 3 sont dues à la protonation des amines tertiaires et des groupements carboxylates des ligands macrocycliques présents à la surface de nanoparticules d'or alors que les charges négatives à pH supérieur à 3 sont attribuées à la déprotonation des fonctions acide carboxylique (-COOH) et des groupements ammonium. La comparaison des courbes de potentiel zêta montre que les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$, les plus riches en TANODAGA ($x/y=2$) par rapport aux nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$, présentent en valeur absolue un potentiel plus élevé quel que soit le pH. Même si le rapport (x/y) utilisée en synthèse n'est pas nécessairement celui qui pourrait être mesuré dans la couche organique adsorbée à la surface des nanoparticules, il est attendu que la proportion de TANODAGA dans la couche organique soit plus élevée

quand $x/y=2$. Comme TANODAGA ne se trouve pas sur la forme de chélate contrairement à TADOTAGA(Gd), une proportion plus élevée de TANODAGA devrait donc conduire à des potentiels plus élevés en valeur absolue pour pH supérieur au pH de charge nulle car il y a alors dans ce cas plus de COOH/COO^- libres. Le fait qu'une telle évolution soit observée expérimentalement, nous amène à penser que les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ soient comme attendu, plus riches en TANODAGA quand la proportion x/y mise en œuvre lors de la synthèse est égale à 2. Cependant quel que soit le rapport molaire x/y , les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ sont fortement chargées à pH physiologique (pH 7,4).

Par la suite, nous avons évalué la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$ dans le temps et dans deux milieux différents, milieu aqueux et en milieu physiologique à pH 7,4. L'allure des courbes des différentes nanoparticules d'or ne présente aucune modification de la bande de plasmon au voisinage de 520 nm (Figure 67). Dans les deux milieux d'études (milieu aqueux et en milieu physiologique à pH 7,4), les courbes des suspensions colloïdales sont superposées suivant les trois premiers mois.



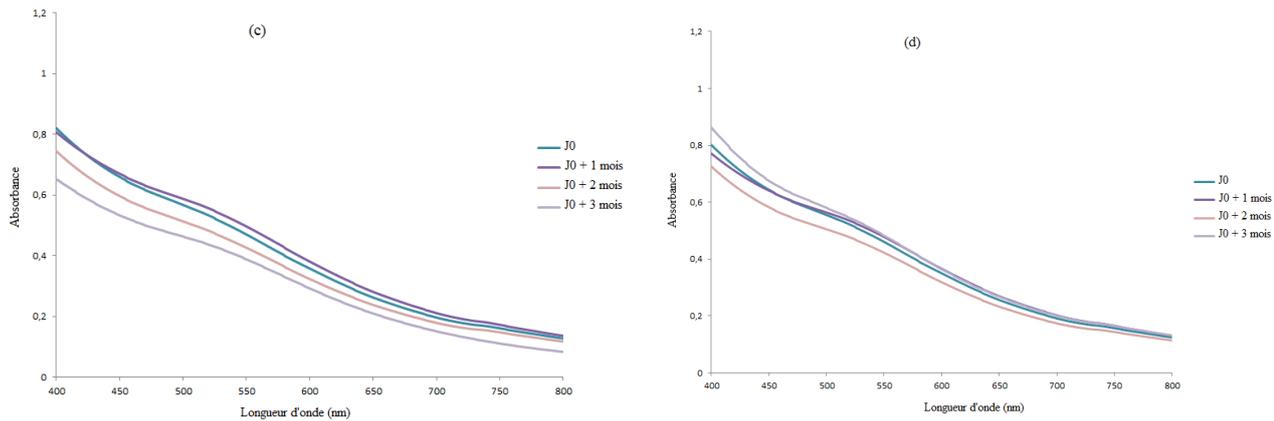


Figure 67: Spectres UV-visible de suspensions des nanoparticules d'or : (a,b) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ et (c,d) $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{10y}\text{(TANODAGA)}_y$ en milieu NaCl/hepes (a,c) et milieu aqueux (b,d).

Nous en déduisons que ces suspensions colloïdales sont également stables pendant trois mois quelle que soit le milieu de stockage.

Composition de la couche organique

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique quantitative qui consiste à mesurer la variation ou la perte de masse d'un échantillon lorsque celui-ci est soumis à des variations de température sous atmosphère contrôlée. Elle permet de nous fournir des renseignements sur la stabilité thermique et le contenu volatil de notre échantillon. Lorsque des nanoparticules d'or recouvertes par des ligands organiques (linéaire ou macrocyclique) sont chauffées, les ligands organiques présents à la surface de nanoparticules d'or se désorbent puis éventuellement se décomposent avant de se volatiliser sous l'effet de la chaleur. Ainsi il reste le cœur d'or nu. Le changement de masse des nanoparticules lors du chauffage donne la quantité de ligand organique présente à la surface des nanoparticules. Les échantillons lyophilisés à partir des suspensions colloïdales ($\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$, $\text{Au}@\text{TADOTAGA}$ et $\text{Au}@\text{TANODAGA}$) ont été soumis à l'analyse thermogravimétrique (ATG). Les résultats de l'ATG des nanoparticules d'or recouvertes par des ligands macrocycliques sont représentés sous forme de graphiques représentant la perte de masse (%) en fonction de la température (Figures 68-70).

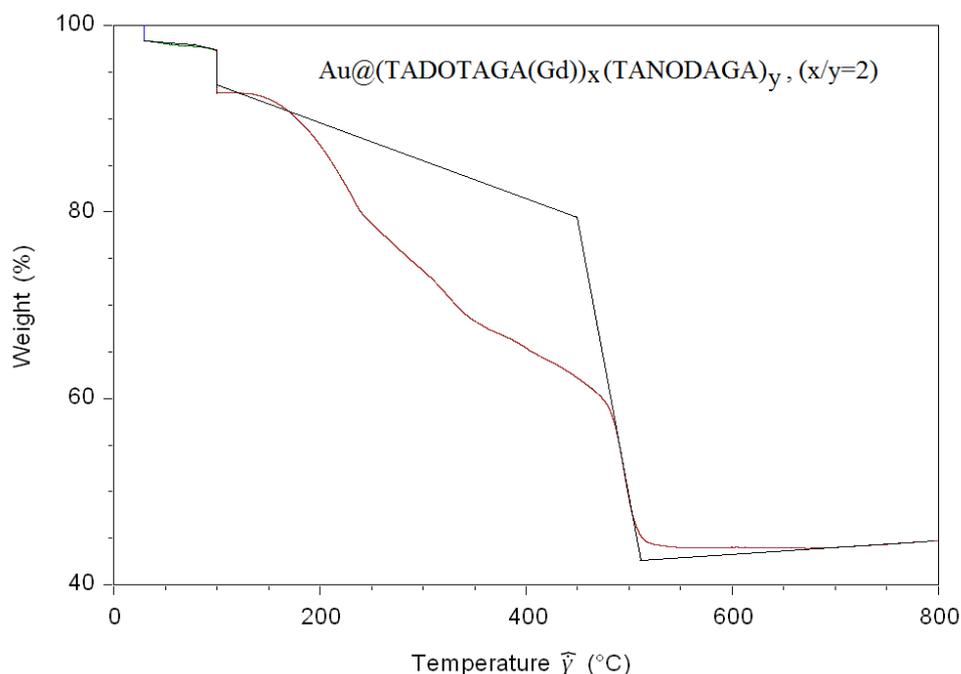


Figure 68: Courbes d'analyse thermogravimétrique de poudre de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$.

La perte de masse des échantillons $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$, $\text{Au}@\text{TADOTAGA}$ et $\text{Au}@\text{TANODAGA}$ a eu lieu dans la plage de température comprise entre 100 et 500°C. Cette perte de masse totale déterminée dans cette plage de température correspond à la perte de l'eau jusqu'à 150°C et des ligands organiques présents à la surface des nanoparticules. A partir de cette perte de masse due à la variation de la température, nous avons estimé la quantité de chélateurs présente à la surface des nanoparticules d'or de chacun des échantillons. Pour les nanoparticules $\text{Au}@\text{TADOTAGA}$, les nombres chélateurs a été estimé à 85 ligands par particule. Ce résultat est similaire à celui déterminé dans la thèse de Gautier Laurent [126].

Pour les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{TANODAGA}$, le nombre de chélateur a été estimé à 48 par particule. Tandis que pour la couche mixte $\text{(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA)}$, le nombre de ligands présents à la surface a été estimés à 56 par particule. Le résultat de l'ATG de la nanoparticule avec la couche mixte $\text{(Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA)}_y)$ est largement inférieur à celle de la nanoparticule avec un seul ligand ($\text{Au}@\text{TADOTAGA}$). Cela pourrait s'expliquer par une perte de masse assez importante dans la couche mixte $\text{(TADOTAGA(Gd))(TANODAGA)}$.

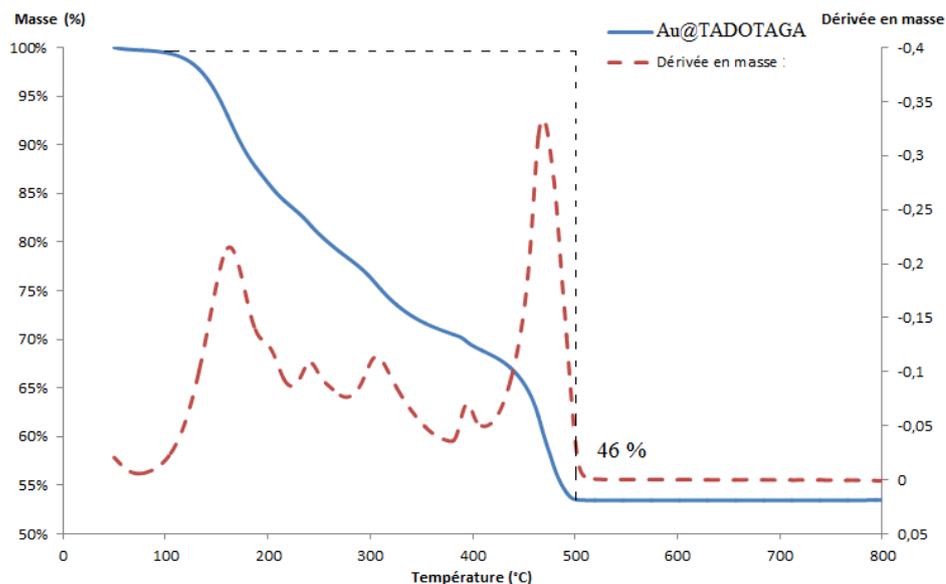


Figure 69: Courbes d'analyse thermogravimétrique d'une poudre de nanoparticules d'or Au@TADOTAGA.

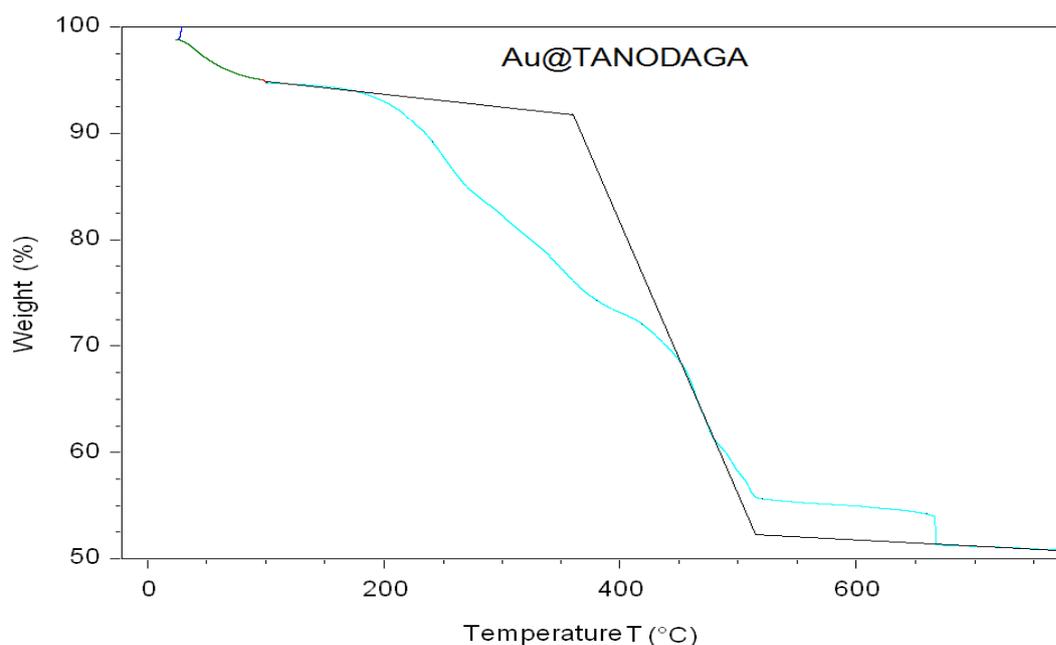
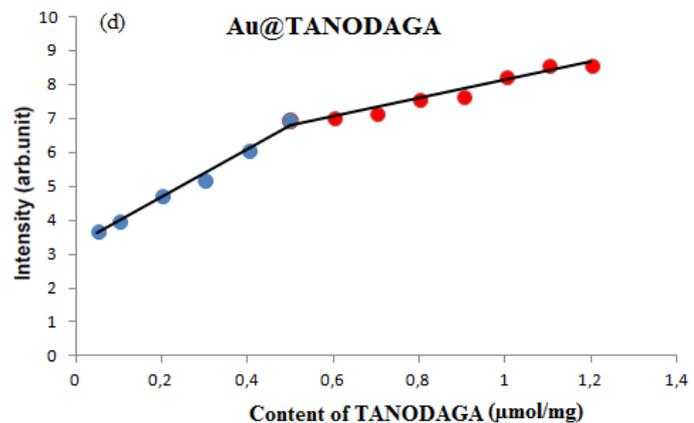
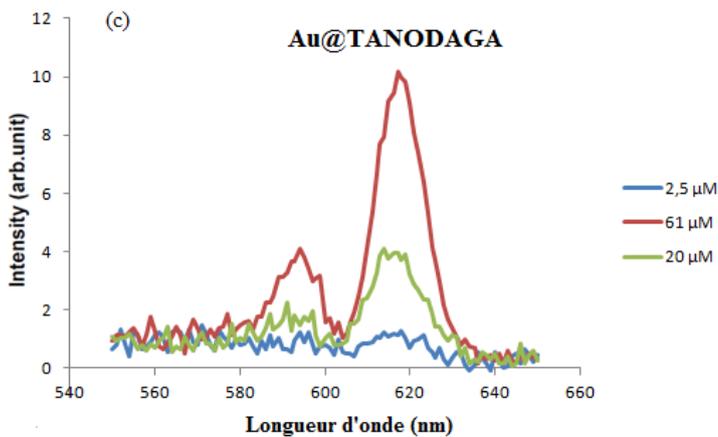
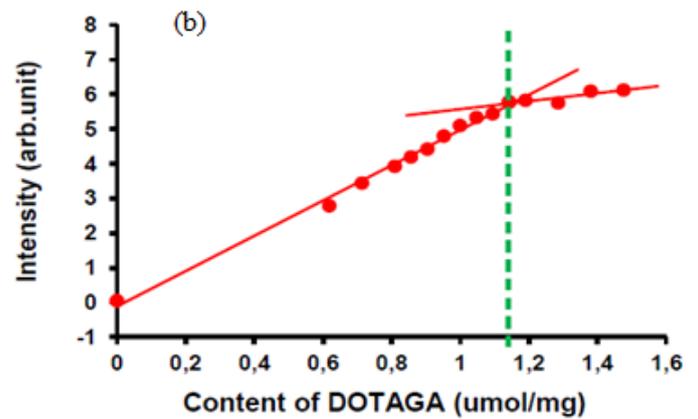
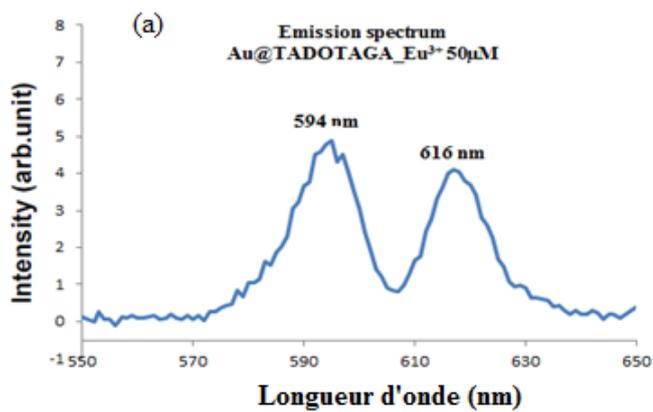


Figure 70: Courbes d'analyse thermogravimétrique d'une poudre de nanoparticules d'or Au@TADOTAGA.

Afin de conforter les résultats de l'ATG, nous avons réalisé des dosages par fluorimétrie. L'ion europium est un lanthanide fluorescent qui émet lorsqu'il est complexé une luminescence intense à longue durée de vie (de l'ordre de la milliseconde). En effet, pour une excitation à 393 nm, deux pics d'émission sont visibles sur le spectre dans la région comprise entre 550-650 nm, l'un à 594 nm

($^5D \rightarrow ^7F_1$) et l'autre à 616 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$). L'ajout croissant d'euporium (III) dans une suspension des particules d'or conduit à sa complexation par les chélateurs libres jusqu'à saturation. Une fois tous chélateurs complexés, les ions euporium (III) ajoutés resteront libres en solution. Comme les ions euporium (III) libres en phase aqueuse émettent beaucoup moins que les ions euporium (III) complexés, les ions euporium (III) ajoutés après saturation de tous les chélateurs adsorbés sur les nanoparticules ne contribueront quasiment pas à la production de photons. La courbe qui représente l'intensité de photoluminescence en fonction de la quantité de l'ion euporium (III) ajoutée présentera alors une rupture de pente à partir de la saturation. C'est ce qui est clairement observé sur les courbes correspondantes de la figure 71.



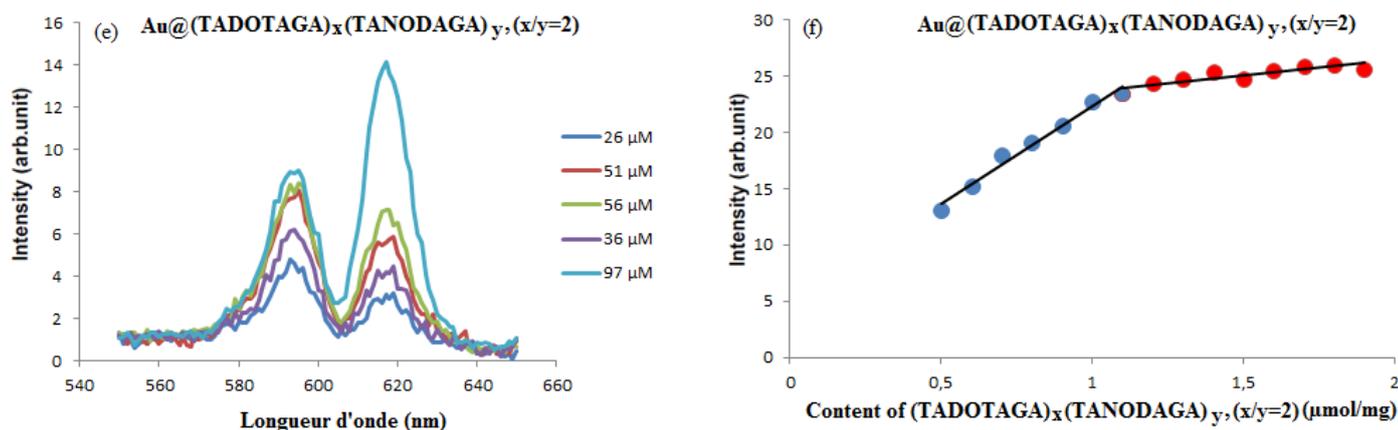


Figure 71: Spectre de la luminescence de l'euprémium chélaté par différents chélateurs présents à la surface de nanoparticules d'or : (a et b) Au@TADOTAGA, (c et d) Au@TANODAGA et (e et f) Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA)_y, (x/y=2).

A partir de la valeur du point de rupture, on a déduit le nombre de ligands disponibles par particule d'or. D'après nos calculs, on trouve 90 ligands par particule pour Au@TADOTAGA. Ce résultat concorde bien avec celui déterminé à partir de l'analyse thermogravimétrique (ATG). La comparaison avec les nanoparticules Au@TADOTAGA et Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y révèle que le point de rupture de la pente a lieu plutôt que prévu pour la nanoparticule Au@TANODAGA. Le nombre de ligands disponibles quantifié est de 48 ligands par particule pour Au@TANODAGA. Nous en déduisons que le ligand TANODAGA complexe moins l'euprémium. Avec la couche mixte, la rupture a eu lieu au voisinage de 1,15 µM. D'après le calcul, le nombre total en TADOTAGA et en TANODAGA déterminée par cette technique de dosage est 93 ligands en ((TADOTAGA)(TANODAGA)/particule). Mais malheureusement, cette technique ne nous permet pas de distinguer la proportion de la couche mixte de chélateur organique (TADOTAGA) et (TANODAGA) immobilisées à la surface des cœurs d'or d'Au@(TADOTAGA)_x(TANODAGA)_y.

Avec une technique similaire à celle décrite ci-dessus, nous avons étudié la complexation de l'ion gadolinium avec des échantillons de suspensions colloïdales (Au@TADOTAGA; Au@TANODAGA; Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y, (x/y=2)). Pour cela nous avons ajouté une quantité croissante d'ions gadolinium libres (III) aux suspensions colloïdales en présence du xylénol orange. Comme le pouvoir complexant des chélateurs

macrocycliques est nettement supérieur à celui du xylénol orange, les ions gadolinium (III) ajoutés formeront des complexes avec les ligands macrocycliques adsorbés à la surface des nanoparticules d'or avant d'en former avec le xylénol orange. En absence de formation de complexe entre les ions gadolinium (III) libres et les molécules de xylénol orange, le spectre du xylénol orange est inchangé. Le rapport des bandes d'absorption A573/A433 reste alors constant. A partir du moment où il y a formation des complexes entre les ions gadolinium (III) libre et les molécules, c'est à dire lorsqu'il n'y a plus de macrocycle libre pour complexer les ions gadolinium (III) libre, le rapport varie linéairement avec la quantité d'ion gadolinium (III) libres. La courbe représentant le rapport des bandes d'absorption du A573/A433 est alors caractérisée par un plateau puis d'une partie pentue. Le plateau correspond à la formation des complexes à partir des ligands macrocycliques. Alors que la partie pentue est relative de la formation des complexes de l'ion gadolinium libre (III) à partir du xylénol orange qui est rendue possible par le fait qu'il n'y a plus de macrocyclique disponible. La quantité d'ion gadolinium (III) ajoutée qui est située au niveau de la rupture de pente représente la quantité nécessaire pour saturer tous les sites de complexation présents sur les nanoparticules d'or. La détermination de cette valeur permet donc d'accéder au nombre de chélateurs présents à la surface des nanoparticules d'or. Chaque courbe de la figure 72 présente cette allure caractéristique : un palier suivi d'une droite pentue. D'après ces courbes, il a été possible de déterminer le nombre de chélateurs ayant formé des complexes de gadolinium.

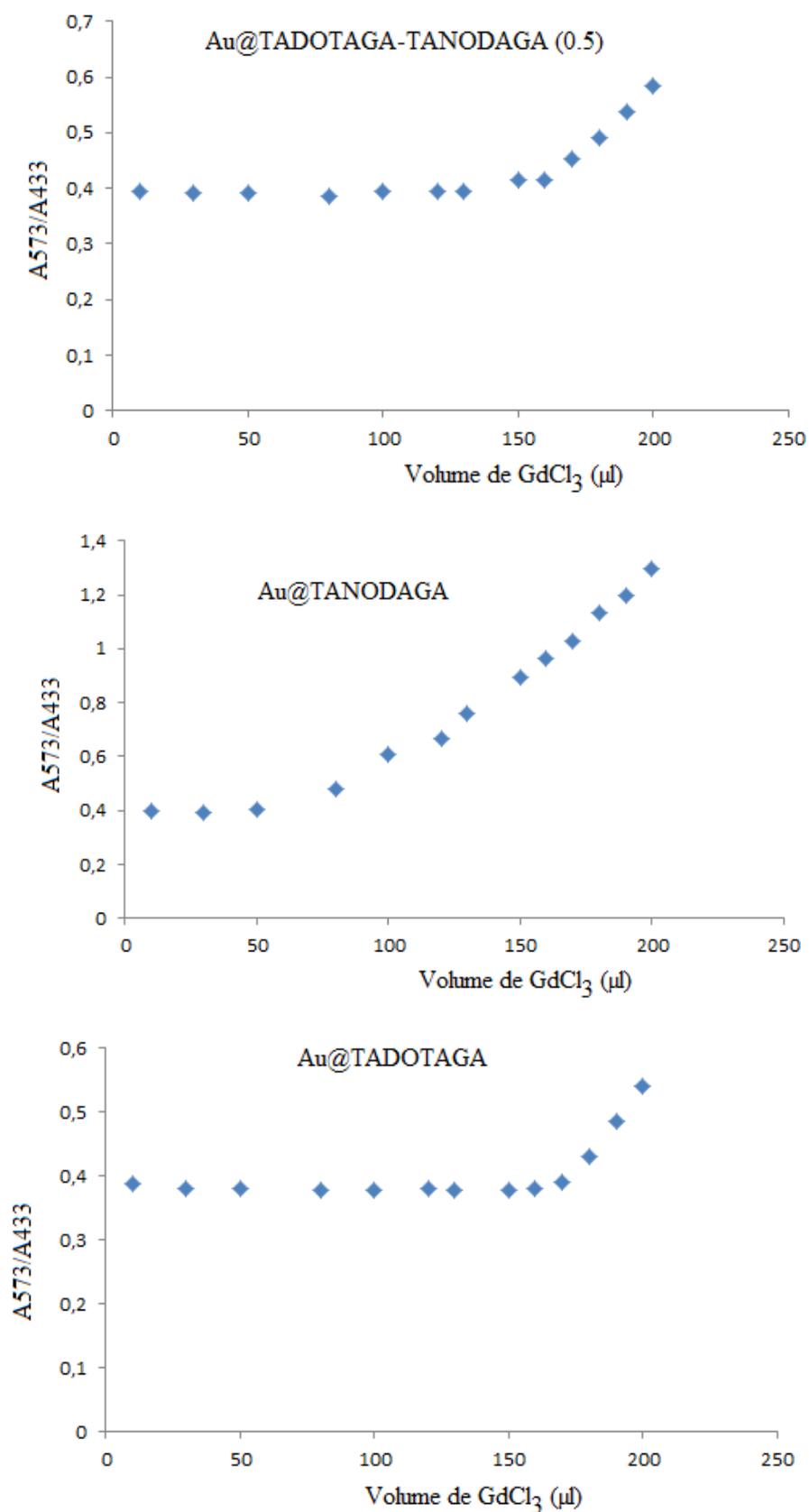


Figure 72: Courbes représentant l'évolution du rapport des bandes d'absorption A₅₇₃/A₄₃₃ en fonction de la quantité d'ions Gd³⁺ ajoutée à des suspensions colloïdales contenant les nanoparticules d'or (a) Au@TADOTAGA (b) Au@TANODAGA (c) Au@TADOTAGA_{2y}(TANODAGA)_y

Par cette méthode, nous avons ensuite quantifié le nombre de ligands macrocycliques sur chaque type de nanoparticules. Les résultats sont reportés dans le tableau 20 ci-dessous.

Tableau 20 : Détermination des nombres de chélateurs par nanoparticules par dosage d'ions gadolinium libre

Nanoparticules d'or	Au@((TADOTAGA) _{2y} (TANODAGA) _y		Au@TADOTAGA		Au@TANODAGA	
	Φ_{TEM} (nm)	2,40	2,50	2,40	2,50	2,40
Nombre de chélateurs /Nanoparticules	123	138	139	157	41	46

Pour réaliser la chélation du cuivre-64 radioactif des échantillons de nanoparticules d'or (Au@((TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y et Au@TANODAGA), une solution d'ions ⁶⁴Cu²⁺ a été ajoutée dans une série de tubes contenant les suspensions de nanoparticules d'or à différentes concentrations. Le rendement radiochimique ainsi que la stabilité du radiomarquage dans le temps ont été évaluées par radiochromatographie (Figure 73).

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	14.3	30.1	20.7	0.009	138659.0	138659.0	95.98	98.47
Rgn 2	38.9	53.0	45.3	0.317	1449.0	1449.0	1.00	1.03
Rgn 3	87.3	104.9	93.6	0.919	709.0	709.0	0.49	0.50
3 Peaks					140817.0	140817.0	97.47	100.00

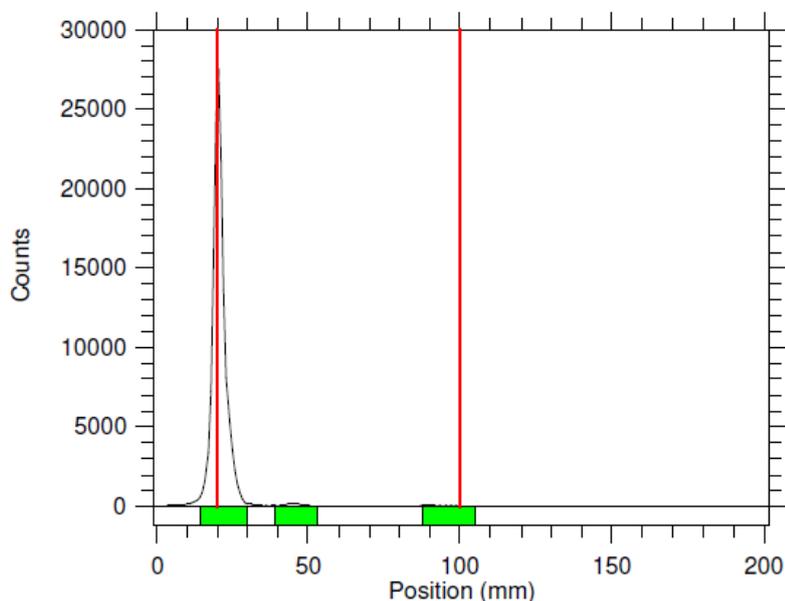


Figure 73: Radiochromatogramme après élution d'un mélange d'ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ et de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2\text{y}}\text{(TANODAGA)}_{\text{y}}$.

Le radiochromatogramme ne présente qu'un seul pic proche de la zone de dépôt du mélange d'ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ et des nanoparticules (Figure 73). Cet unique pic indique que la radioactivité est concentrée exclusivement au niveau des nanoparticules d'or ($R_f(\text{Cu}^{2+}) \approx 0$) qui ne migrent pas dans les conditions de l'expérience ($R_f(\text{nanoparticules}) \approx 0$). Les ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ à l'origine de ce pic de radioactivité a été choisi pour favoriser leur élution ($R_f(\text{Cu}^{2+})$ attendu à 1). La colocalisation des ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ et des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2\text{y}}\text{(TANODAGA)}_{\text{y}}$ associée à la présence d'un seul pic de radioactivité dont le rapport frontal (R_f) est proche de zéro signifie tous les ions Cu^{2+} ont été immobilisés à la surface des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2\text{y}}\text{(TANODAGA)}_{\text{y}}$. Comme les macrocycles TADOTAGA renferment tous un ion Gd^{3+} , nous pouvons en déduire que les ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ont été piégés par les macrocycles TANODAGA. La pureté radiochimique déterminée à partir des aires des pics du radiochromatogramme est proche de 99%.

De plus, l'allure des courbes montre que les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd}^{3+}\text{))}_{2\text{y}}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_{\text{y}}$ sont caractérisées une excellente stabilité radiochimiques en présence d'un chélateur compétiteur (EDTA)

et dans du sérum de veau fœtal (Figure 74). La présence chélateur compétiteur (EDTA) proximité de la suspension de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}^{3+})\text{)}_{2y}\text{(TANODAGA}(\text{}^{64}\text{Cu}))_y$ n'a pas entraîné une décomplexation du cuivre-64 présent dans la couche organique des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}^{3+})\text{)}_{2y}\text{(TANODAGA}(\text{}^{64}\text{Cu}))_y$. Ces observations montrent les ions cuivre (II) sont bien retenus dans la couche mixte.

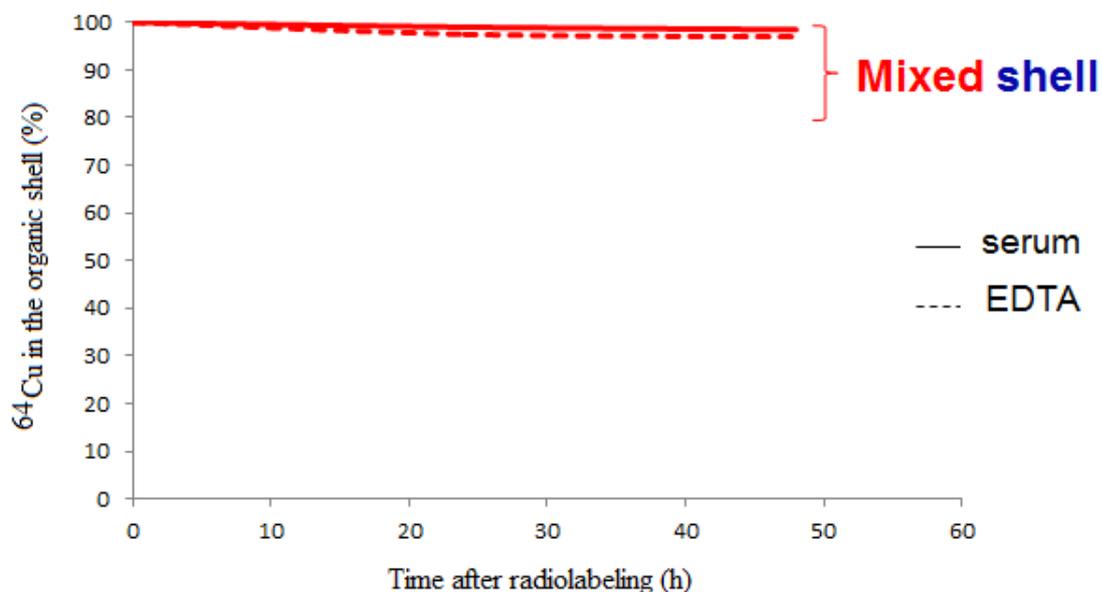


Figure 74: Etude de la stabilité du radiomarquage de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}^{3+})\text{)}_{2y}\text{(TANODAGA}(\text{}^{64}\text{Cu}))_y$ dans du sérum de veau fœtal et en solution aqueuse contenant un complexant compétiteur EDTA.

La réussite du radiomarquage des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$ est un point positif dans le cadre du développement des nanosondes combinant IRM/TEP. Cependant, l'application *in vivo* de ces nanosondes ($\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}\text{(TANODAGA)}_y$) exige de vérifier la stabilité du radiomarquage dans le temps. En effet, la libération des ions ${}^{64}\text{Cu}^{2+}$, que nous essayons dans le cadre de cette thèse d'empêcher (voir présentation de la thèse, page 98) pose problème pour un suivi sans ambiguïté des nanoparticules d'or. La figure 71 montre que la quantité d'ions ${}^{64}\text{Cu}^{2+}$ complexées dans la couche organique des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}\text{(TANODAGA}(\text{}^{64}\text{Cu}))_y$ est quasiment constante pendant 48h. La libération des ions ${}^{64}\text{Cu}^{2+}$ (par décomplexation) est négligeable même en milieu comportant un compétiteur efficace (EDTA). L'excellente stabilité du

radiomarquage permet d'envisager l'application des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_y$ comme nanosondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.

La présence sur une même nanoparticule d'or des ions Gd^{3+} et $^{64}\text{Cu}^{2+}$ devrait conférer aux nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TANODAGA)}_y(x/y=2)$ un comportement d'agent de contraste en IRM et de radiotraceur pour la TEP. Afin de confirmer le potentiel des nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu}^{2+}))_y$ pour l'imagerie simultanée IRM/TEP, une étude de biodistribution *in vivo* a été réalisée sur des souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée. La répartition des nanoparticules d'or radiomarqués dans les différents organes de la souris après injection par voie intraveineuse a été suivie par imagerie simultanée IRM/TEP (Figure 75). La combinaison de ces deux techniques est très attrayante pour localiser avec précision, la distribution de nanoparticules d'or dans l'organisme de l'animal (Voir chapitre 1).

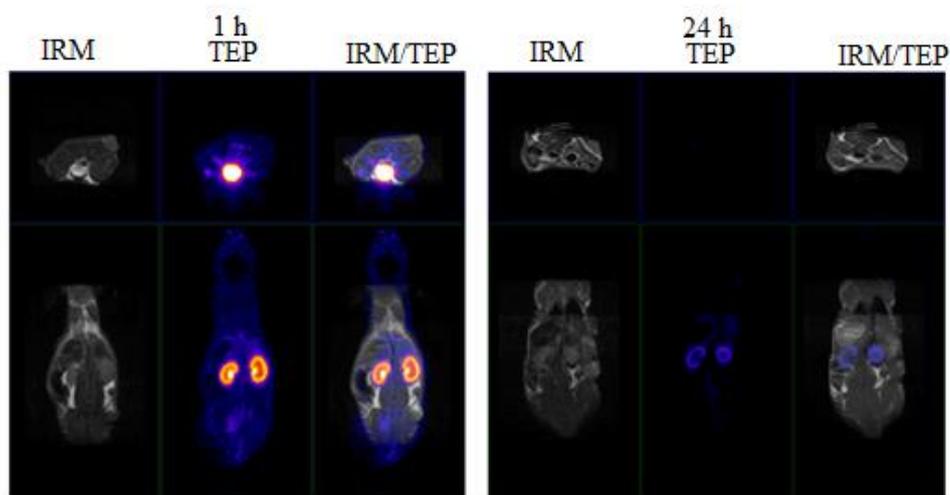


Figure 75: Images IRM,TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h et 24h après l'injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_y$.

L'étude de la biodistribution *in vivo* a été réalisée sur la plateforme d'imagerie IRM/TEP du CGFL de (Dijon) de façon simultanée sur le même animal après une seule injection par voie intraveineuse de l'agent d'imagerie bimodale $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_y$. L'acquisition des images a été effectuée à deux temps, 1h et 24h après l'injection. L'acquisition des images en IRM réalisée 1h après l'injection semble indiquer un léger blanchiment au niveau

des reins et de la vessie (Figure 75). Ce léger blanchiment est caractéristique du rehaussement du contraste positif en IRM induit par les ions gadolinium. Ce qui implique qu'il y a une accumulation des nanoparticules dans ces zones. Nous avons également observé après examen des images TEP acquises 1h après l'injection intraveineuse que la radioactivité provenant des ions cuivre-64 était concentrée dans certaines zones du corps. La faible résolution de la TEP ne permet pas de situer précisément les zones dans lesquelles sont concentrés les émetteurs de positon. La fusion des images IRM et TEP, rendue possible par l'acquisition simultanée de ces images à partir du même animal et de la même injection, montre clairement qu'il y a superposition des zones blanchies et des zones radioactives. Il y a donc colocalisation des ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$ dans les reins et la vessie. De ces images, nous pouvons donc déduire que les nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA)_y$ circulent librement et sont éliminées par la voie rénale dès la première heure après l'injection. La présence des nanoparticules d'or dans les organes impliquées dans l'élimination rénale (reins et vessie) et la faible accumulation dans le foie et la quasi absence dans les autres organes sont confirmées par le comptage gamma et l'analyse ICP des organes des animaux sacrifiés 1h après l'injection intraveineuse (Figure 74).

Le comportement sain de ces nanoparticules est confirmé par l'examen des images IRM/TEP, du comptage gamma et de l'analyse ICP des organes effectuées 24h après l'injection intraveineuse. Le blanchiment des reins et de la vessie n'est plus visible sur l'image IRM. Dans le même temps, un très faible niveau de radioactivité est détecté dans les reins (d'après la fusion des images et le comptage gamma post-mortem) (Figures 75 et 76). L'analyse ICP montre également que la quantité d'or dans les reins a fortement diminué entre 1h et 24h après l'injection intraveineuse (Figure 77). Les données collectées par l'imagerie simultanée IRM/TEP, le comptage gamma et l'analyse ICP des organes indiquent que les nanoparticules $Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(^{64}Cu^{2+}))_y$. L'acquisition des images a été effectuée sans accumulation dans les tissus sains et sont éliminées rapidement par voie rénale.

Ce profil de biodistribution est similaire à celui observé pour les nanoparticules proches en termes de composition ($Au@TADOTAGA(Gd$ ou $In)$) [131]. En revanche aucun relargage des ions cuivre-64 n'a été constaté avec cette stratégie contrairement à ce qui avait été observé dans le cas des nanoparticules

Au@TADOTAGA (Gd, ^{64}Cu). En revanche, l'accumulation dans la tumeur n'est pas détectable sur les images. Seules les analyses post-mortem des tumeurs (Comptage gamma et ICP) révèlent la présence en faible quantité des nanoparticules d'or radiomarquées. L'absence de ciblage des nanoparticules d'or pourrait résulter de la clairance rénale trop rapide mais également d'une trop faible vascularisation des tumeurs implantées en sous-cutanée.

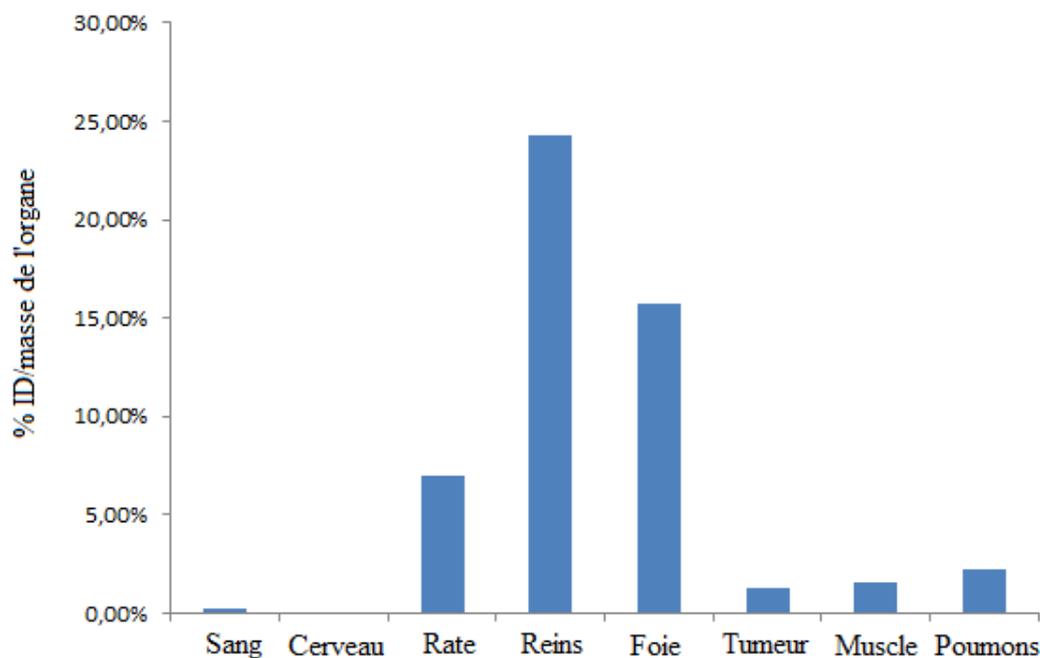


Figure 76: Mesure post-mortem de la radioactivité par comptage gamma des organes des souris sacrifiées 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA($^{64}\text{Cu}^{2+}$))_y.

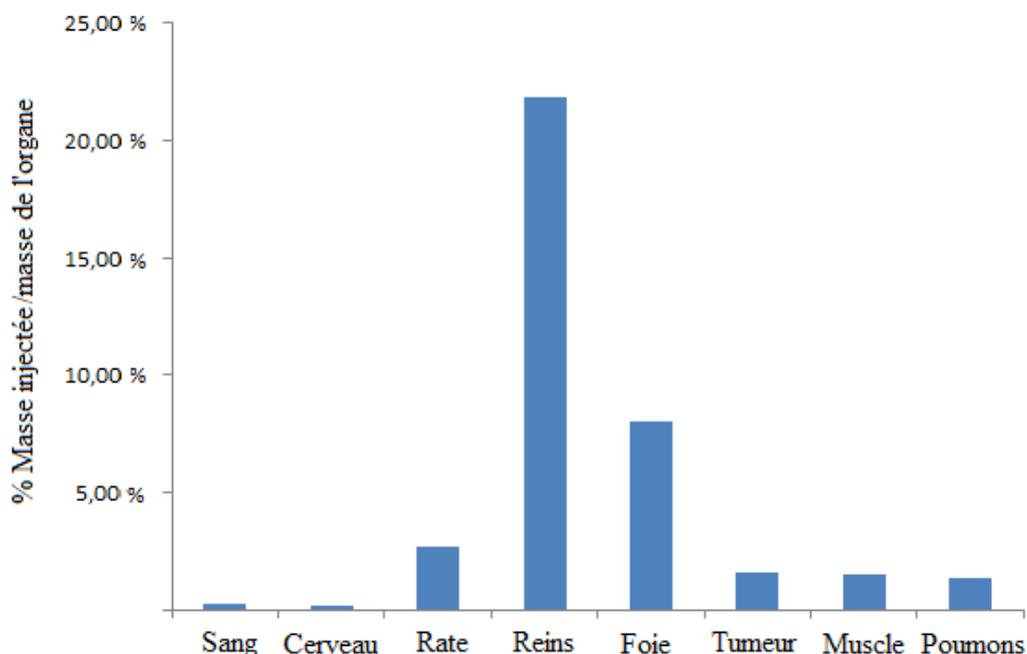


Figure 77 : Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_y$.

En résumé, le double marquage des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{2y}\text{(TANODAGA}^{(64}\text{Cu))}_y$ permet leur suivi par imagerie IRM/TEP simultanée. Grâce à cette combinaison d'imagerie réalisée simultanément, il a été possible de mettre en évidence le comportement sain de ces nanoparticules d'or après injection intraveineuse.

2.3.3. $\text{Au}@\text{TA}[\text{DOTAGA-llys-NODAGA}]$

2.3.3.1. La plateforme moléculaire $\text{TA}[\text{DOTAGA-Lys-NODAGA}]$

Avec la première approche, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TANODAGA)}_y$ $x/y=10$ et 2. Le cœur d'or de ces nanoparticules est recouverte à la surface par une couche mixte de deux types différents de chélateurs (TADOTAGA) et TANODAGA) afin d'immobiliser à la fois des ions gadolinium pour l'IRM et des ions cuivre-64 ($^{64}\text{Cu}^{2+}$), émetteurs de positons pour la TEP. Les nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_x\text{(TANODAGA)}_y$, ($x/y=10$ ou 2) sont caractérisées par leur petite taille ($\phi_{\text{TEM}} = 2,42 \text{ nm}$; $D_h = 10,2 \text{ nm}$) et leur bonne stabilité colloïdale

(environ 3 mois à pH= 7,4). Elles présentent des caractéristiques semblables à celles des nanoparticules d'or recouvertes par un seul chélateur (Au@TADOTAGA) développées dans le cadre de la thèse de Gautier Laurent [126] [131]. Grâce au co-marquage par les ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$, ces nanoparticules d'or $Au@((TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(^{64}Cu))_y)$ ont pu être suivies par imagerie simultanée IRM/TEP. Ce suivi a révélé que les nanoparticules $Au@((TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(^{64}Cu))_y)$ sont caractérisées par un comportement sain après administration *in vivo*. Elles circulent librement sans accumulation indésirable dans les organes sains sauf les organes impliqués dans l'élimination rénale (reins et vessie). En raison de leur petite taille, les nanoparticules ont été éliminées par la voie rénale. Ce mode d'élimination qui constitue un prérequis incontournable pour l'application *in vivo* des nanoparticules non biodégradables rend les nanoparticules $Au@((TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA)_y)$ adaptées pour l'imagerie multimodale. Les résultats obtenus avec la couche mixte sont très prometteurs mais le développement de ces nanoparticules souffre de la difficulté à caractériser finement la couche mixte. Ce point faible peut être surmonté par le remplacement des deux chélateurs par une plateforme moléculaire TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] comportant dans la même structure un site d'ancrage et deux chélateurs différents. L'intérêt de cette approche réside principalement dans la garantie d'avoir ces deux chélateurs à la surface des nanoparticules d'or dans des proportions connues car imposées par la composition de la plateforme moléculaire. Cette molécule trifonctionnelle a été synthétisée par Vivek Thakare à partir de la lysine (schéma) dont les trois fonctions réactives (deux fonctions amine primaire et une fonction acide carboxylique) permettent d'accrochage au site d'ancrage et des deux chélateurs DOTAGA et NODAGA. Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc cherché à développer, par une seconde approche, des nanoparticules enrobées par une couche homogène de molécules désignées par le sigle [TADOTAGA-lys-NODAGA]. Ces plateformes moléculaires comportent un site d'ancrage et un bras espaceur terminé à chacune de ses deux extrémités par deux chélateurs différents un dérivé DOTAGA pour la complexation des ions gadolinium et un dérivé NODAGA pour l'immobilisation des ions cuivre-64.

2.3.3.2. Synthèse et caractérisation morphologique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA]

La synthèse de Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] a été réalisée en adaptant le protocole de Brust. Nous avons repris le protocole développé pour la synthèse des nanoparticules Au@TADOTAGA. Les nanoparticules d'or ont été produites par réduction du sel d'or par le NaBH₄ en présence de la plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-NODAGA].

Après purification par dialyse, les nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] ont d'abord été diluées dans l'eau (0,2 g Au/L) avant de réaliser les différentes caractérisations physico-chimiques. A première vue, Les clichés du TEM montrent des nanoparticules d'or distinctes les unes des autres, sphériques et de taille semblable (Figure 78). Le diamètre du cœur d'or déterminé en moyennant plusieurs valeurs (79 mesures à partir des images de MET) est de l'ordre 2,35 nm ± 0,2 nm.

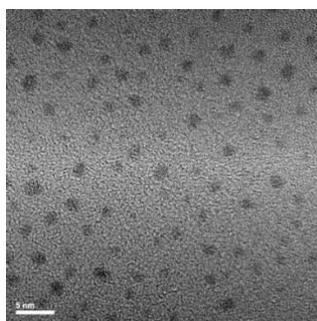


Figure 78: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].

Comme attendu pour des nanoparticules d'or ayant un diamètre inférieur à 3 nm, la bande de plasmon n'est pas visible sur les spectres d'absorption UV-visible des suspensions des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] (Figure 79).

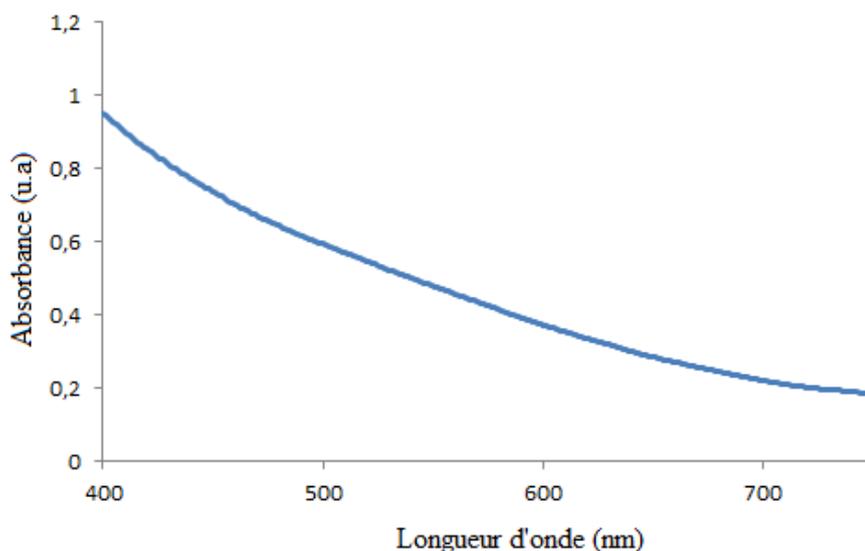


Figure 79: Spectre UV-visible d'une suspension aqueuse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].

Dans le cas des nanoparticules d'or composées d'un cœur d'or de dimension très réduite (diamètre inférieur à 3 nm) et d'une monocouche de chélateurs, un diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm est attendu. La mesure réalisée par diffusion de la lumière (DLS) révèle que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] est de 7,95 nm. Ainsi, les nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] présentent une taille adaptée pour des applications *in vivo*. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec les nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs de même nature que les sites de complexation de la plateforme moléculaire (DOTAGA et NODAGA).

2.3.3.3. Stabilité colloïdale des suspensions aqueuses de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA]

Comme la stabilité colloïdale sur une plage de pH centrée sur 7,4 (pH physiologique) est requise pour les études *in vivo*, nous l'avons évaluée dans le cas des échantillons de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] à différents pH, compris dans l'intervalle de pH 1 à 11. Les suspensions colloïdales ont été ajustées au pH désiré avant d'effectuer les mesures à la température ambiante, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Les spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or ont ensuite été tracés à différents pH (Figure 80).

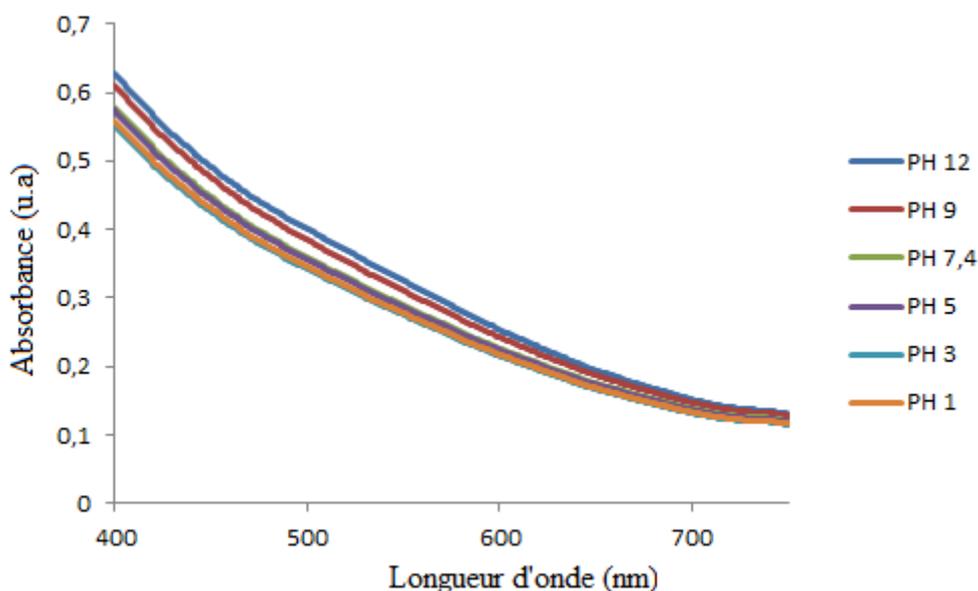


Figure 80: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] à différents pH.

Les spectres UV-visible ainsi obtenus montrent un faible écart entre les courbes enregistrées pour des pH compris entre 1 et 11. Cela signifie que les suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] sont stables sur une large gamme de pH dont le pH physiologique (7,4). Cette stabilité colloïdale des nanoparticules d'or est confirmée par la mesure du potentiel zêta à différents pH (entre 1 et 11). La mesure du potentiel zêta en fonction du pH a permis de tracer une courbe qui montre que les nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] présentent une charge positive pour des pH inférieurs à 3 (Figure 81). Cette charge positive observée à ($\text{pH} < 3$) est due à la protonation des fonctions amine tertiaire. Pour des pH supérieurs à 3, le potentiel zêta est de plus en plus négatif au fur à mesure que le pH augmente. Nous en déduisons que les nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] sont chargées négativement. Cette charge négative résulte de la déprotonation des fonctions $-\text{COOH}$ en COO^- et des groupements ammonium $-\text{NH}_3^+$ en NH_2 .

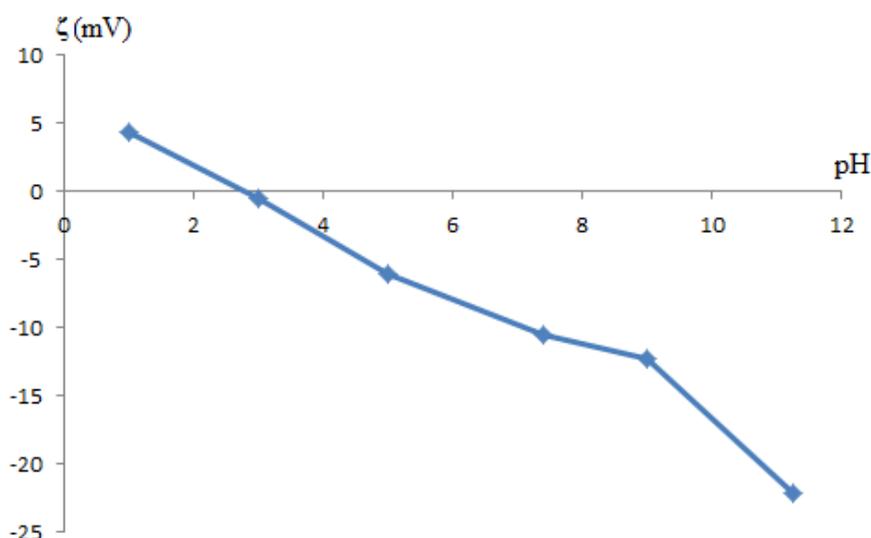


Figure 81 : Courbe représentant le potentiel zêta en fonction du pH d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA].

La comparaison entre les valeurs du potentiel zêta des nanoparticules d'or Au@ $(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA})_y$ (couche mixte avec deux macrocycliques différents) et des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] (couche comportant un seul type de molécule mais avec deux macrocycliques différents) met en évidence que les valeurs absolues sont plus faibles dans le cas de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] (-10 mV vs -35,46 mV à pH 7,4). Cette différence pourrait être suffisante pour influencer le comportement biologique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA].

La stabilité colloïdale dans le temps est un paramètre prédictif de l'évolution des nanoparticules. Cette stabilité colloïdale dépend de plusieurs paramètres, tels que le milieu de dispersion, le pH, la charge de surface, l'équilibre des interactions attractives et répulsives qui s'exercent entre les particules. Afin d'évaluer l'influence du temps de stockage, nous avons réalisé une étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA], dans le temps, en milieu physiologique (NaCl/Hepes, pH 7,4) et en milieu aqueux en présence des ions gadolinium et cuivre (II). L'évaluation a été réalisée sur la base des spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] enregistrés régulièrement pendant trois mois (Figure 82).

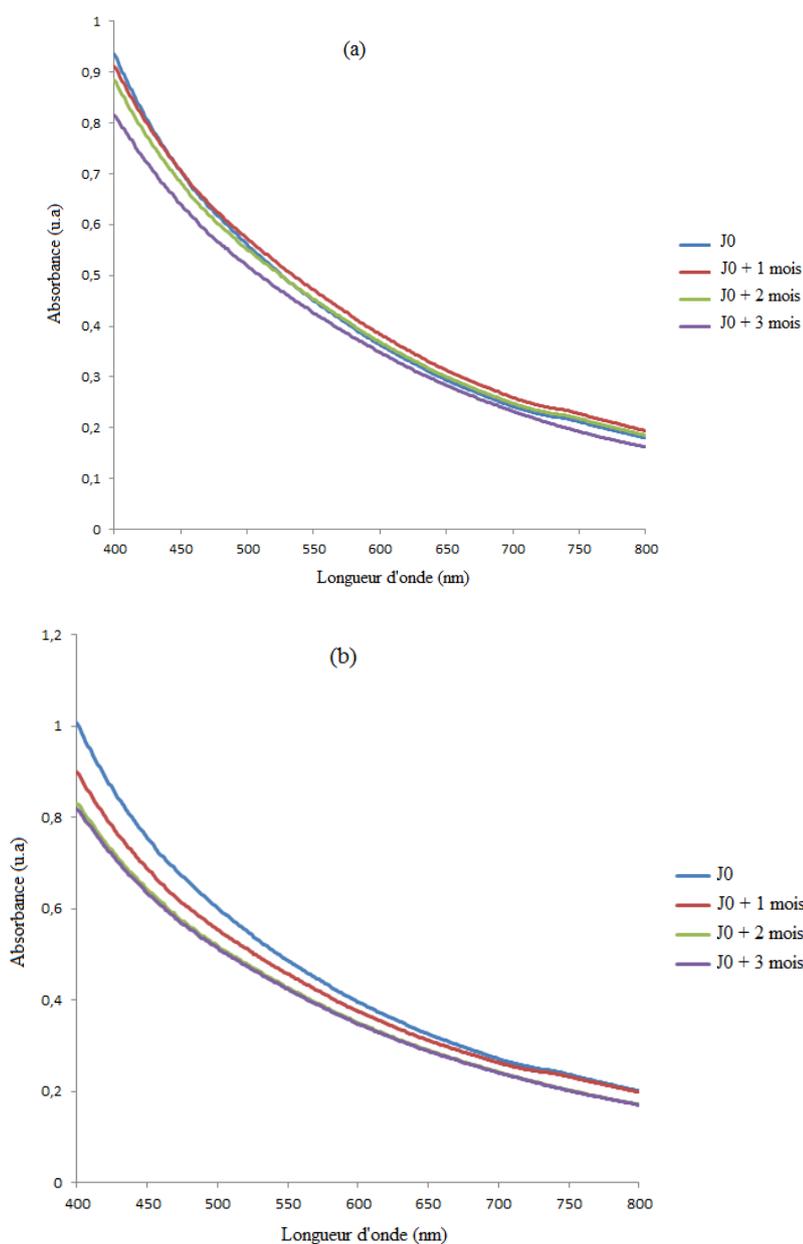


Figure 82: Spectres UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA] en milieu aqueux (a) et en milieu NaCl/hepes (b).

Les spectres UV-visibles de la suspension colloïdale, enregistrés en milieu physiologique (145 mM NaCl, 10 mM Hepes) en milieu aqueux après marquage par des ions d'intérêt (Gd^{3+} et Cu^{2+}) présentent en fonction du temps des différences d'absorption très faibles. De plus, on ne constate aucune modification de la bande de plasmon dans les deux spectres, en présence de l'ion gadolinium et de l'ion cuivre (II). Cela indique que les nanoparticules d'or

Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(Cu)] sont stables en milieu physiologique et en milieu aqueux (Figure 82).

2.3.3.4. Le radiomarquage des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-Lys-NODAGA] par les ions cuivre-64

La radiochromatogramme obtenu après élution du mélange d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA] et d'une solution de cuivre-64 ne présente qu'un seul pic au niveau de la zone de dépôt des nanoparticules d'or (Figure 83). Comme discuté dans le cas du radiomarquage des nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_x(TANODAGA)_y, l'allure d'un tel radiochromatogramme est caractéristique d'un radiomarquage réussi des nanoparticules. En plus, d'une pureté radiochimique élevée (supérieur à 98% d'après l'analyse du radiochromatogramme de la figure 80), les nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(⁶⁴Cu))_y et Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] sont caractérisées par une excellente stabilité radiochimiques (Figure 84) dans du sérum de veau fœtal et au contact avec un chélateur compétiteur (EDTA). Malgré son fort pouvoir complexant, l'ajout EDTA à une suspension de nanoparticule d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] n'a pas induit une forte décomplexation du cuivre-64 présent dans la couche organique des nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)]. La comparaison des courbes représentant la proportion de cuivre-64 dans la couche organique en fonction du temps révèle que les ions cuivre (II) sont mieux retenus dans la couche mixte Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(⁶⁴Cu))_y que dans la couche monomoléculaire Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)]. Cette différence qui reste très faible, résulte probablement d'un encombrement stérique plus important lorsque les deux macrocycles sont portés par la même molécule. Cependant le taux de décomplexation de cuivre-64 reste très faible dans le cas le moins favorable des nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)]. Les particules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] sont donc adaptées pour les applications *in vivo*.

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	13.4	31.0	20.7	0.009	163380.0	163380.0	96.92	98.72
Rgn 2	36.3	55.6	45.1	0.314	1447.0	1447.0	0.86	0.87
Rgn 3	90.8	104.9	96.7	0.959	673.0	673.0	0.40	0.41
3 Peaks					165500.0	165500.0	98.18	100.00

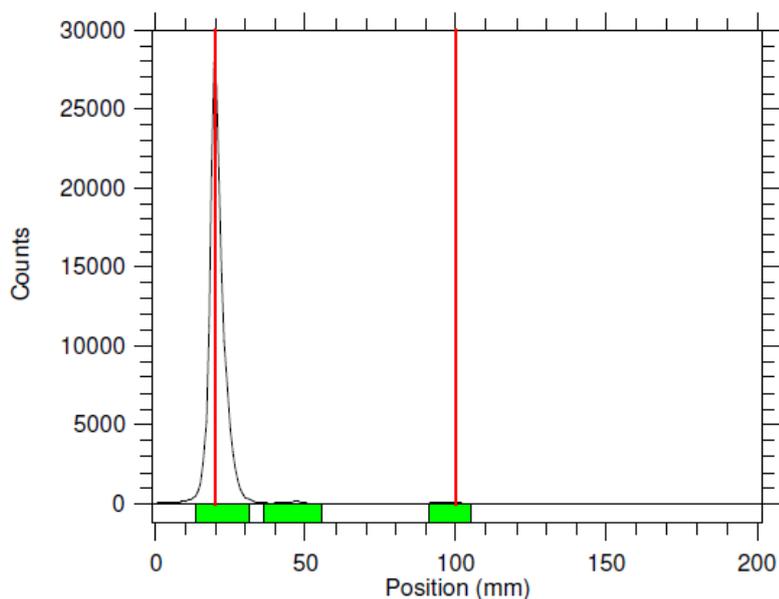


Figure 83: Radiochromatogramme après élution d'une suspension de nanoparticules radiomarquées Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA] par le cuivre-64

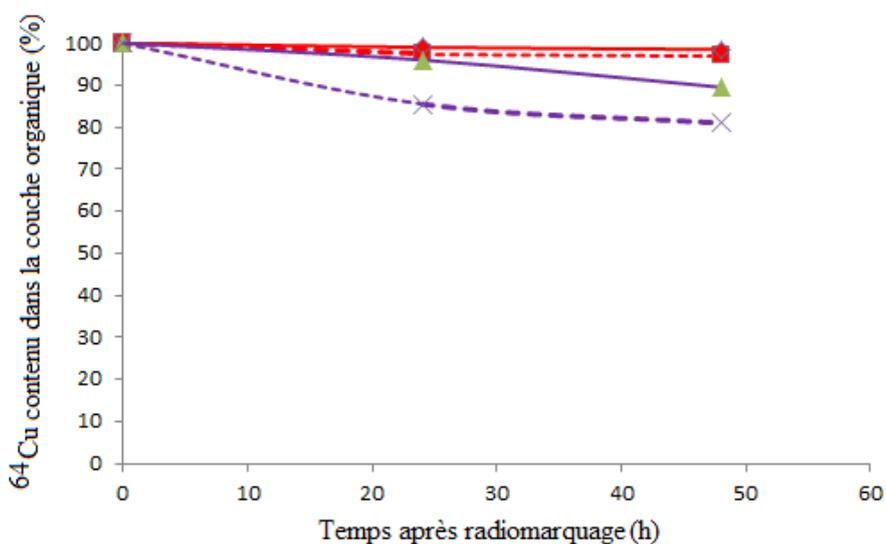


Figure 84: Etude de la stabilité du radiomarquage de nanoparticules (Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(^{64}Cu)] (courbe violet avec triangle vert) et Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA($^{64}\text{Cu}^{2+}$))_y (courbe rouge avec losange rouge) dans du sérum de veau fœtal (trait plein) et en solution aqueuse contenant un complexant compétiteur EDTA (trait pointillé).

2.3.3.5. Etude de la biodistribution

Les nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(Cu²⁺)] présentent en termes de taille des caractéristiques similaires à celles des nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(⁶⁴Cu²⁺))_y recouvertes par une couche mixte de chélateurs de même nature que les sites de complexation de la plateforme moléculaire (DOTAGA et NODAGA). Pour cette raison, nous avons pu étudier la biodistribution *in vivo* des nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] doublement marquées à la fois par les ions Gd³⁺ et les ions ⁶⁴Cu²⁺. La combinaison de deux techniques est très attrayante pour la localisation et le suivi de nanoparticules d'or dans l'organisme de l'animal. L'étude de biodistribution *in vivo* a été réalisée sur des souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée. Ainsi, les nanoparticules d'or radiomarquées Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] après injection intraveineuse ont été réparties dans les différents organes de l'animal. Cette répartition des nanoparticules d'or a été suivie par imagerie simultanée IRM/TEP.

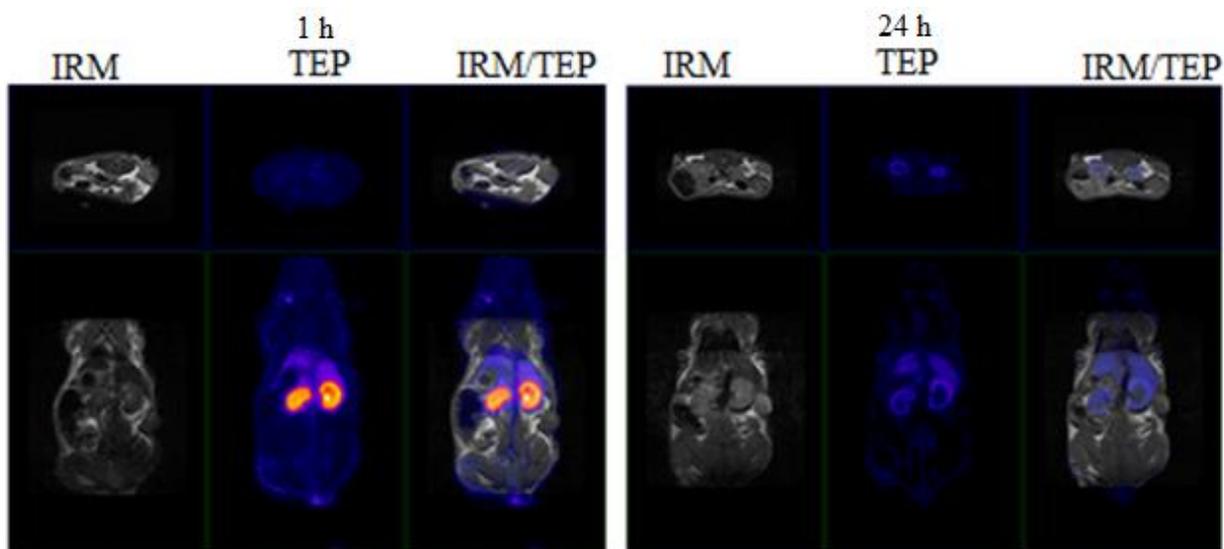


Figure 85: Les images IRM, TEP et fusion d'images IRM/TEP obtenues 1h puis 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)].

L'acquisition des images a été réalisée à deux temps, 1h et 24h après l'injection (Figure 85). Les images en IRM montrent un rehaussement de contraste positif 1h après l'injection. Ce rehaussement localisé dans les reins et la vessie laisse supposer une accumulation de nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] dans ces organes. Cette présence de nanoparticule d'or, dans les reins et la vessie est confirmée par les images TEP acquises en même temps que l'IRM (Figure 85). Grâce à la complémentarité de deux modalités d'imagerie IRM/TEP qui permet une détection simultanée nous observons une superposition parfaite du rehaussement de contraste de l'IRM et de la radioactivité (TEP) (Figure 85). Cette observation, similaire à celle réalisée à partir du même animal et de la même injection avec les nanoparticules Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(⁶⁴Cu))_y, confirme le potentiel de ce type de nanoparticule d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] comme agent d'imagerie bimodale IRM/TEP.

La radioactivité et le contraste positif sont beaucoup moins intenses 24h après injection de l'agent d'imagerie bimodale Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(⁶⁴Cu)]. Le faible rehaussement de contraste en IRM dans les reins et la vessie concorde bien avec la diminution de la radioactivité observée dans les mêmes organes (les reins et la vessie) comme le confirme la fusion des images IRM/TEP et le comptage gamma post-mortem (Figure 86). Toutes ces observations confirment que les nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-Lys-NODAGA(Cu²⁺)] sont éliminées progressivement de l'organisme par la voie rénale. Grâce aux images fournies par l'IRM et la TEP, nous constatons la présence des nanoparticules dans les reins et la vessie 24 h après l'injection avec une légère accumulation hépatique.

En outre cette présence des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)] dans les reins et la vessie et la faible accumulation dans le foie sont confirmées par le comptage gamma et l'analyse ICP des organes des animaux sacrifiés 1 h et 24h après l'injection intraveineuse. L'analyse ICP montre que la présence de l'élément or est principalement présente dans les reins (Figures 86 et 87). Cette quantité d'or diminue entre 1h et 24h après l'injection intraveineuse comme le montre l'examen des images IRM/TEP et les analyses post-mortem (comptage gamma et ICP) (Figures 86 et 87). La similitude entre les deux graphes

est caractéristique de la colocalisation de la radioactivité et des nanoparticules d'or. Nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas de relargage des ions $^{64}\text{Cu}^{2+}$.

Le comportement des nanoparticules $\text{Au@TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}(^{64}\text{Cu})]$ est similaire à celui observé avec les nanoparticules $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA}(^{64}\text{Cu}))_y$ recouvertes par une couche mixte de deux chélateurs différents. Il est important de souligner que, dans les deux cas, aucun relargage des ions cuivre-64 ni aucune accumulation indésirable n'ont été décelés. Ce qui indique le potentiel de ces nanoparticules d'or en tant qu'agent d'imagerie bimodale pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.

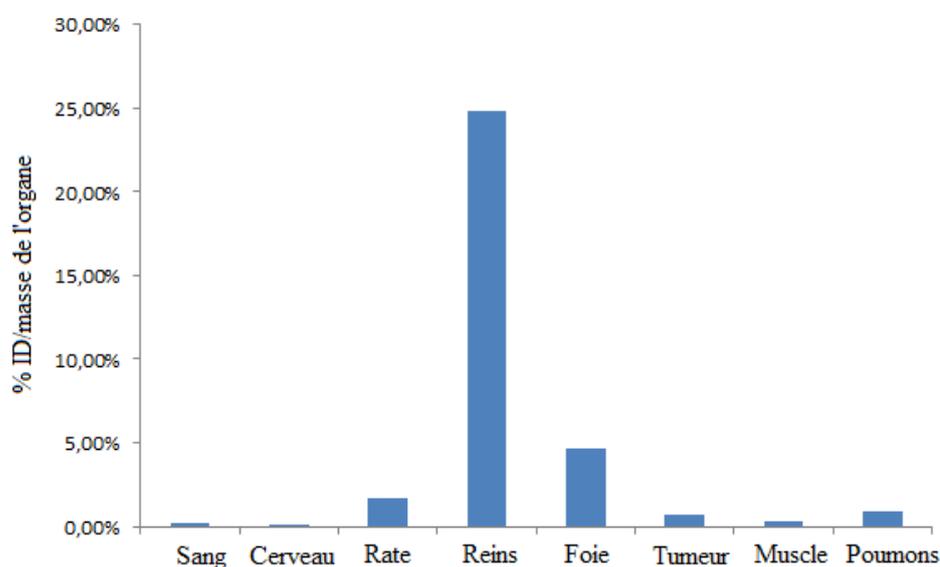


Figure 86: Mesure post-mortem de la radioactivité par le comptage gamma des organes des souris sacrifiées 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules $\text{Au@TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}(^{64}\text{Cu})]$.

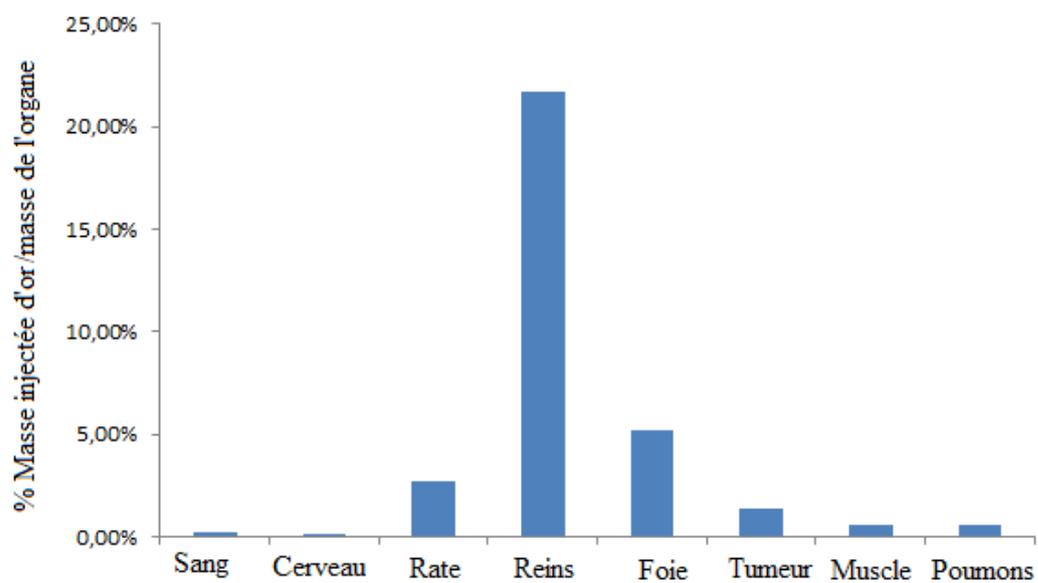


Figure 87: Dosage ICP de l'or contenue dans les différents organes de la souris 24h après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA(⁶⁴Cu)].

2.4. Conclusion

Dans l'optique de réaliser l'imagerie simultanée IRM/TEP, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes par deux chélateurs différents en réduisant le sel d'or en présence soit d'un mélange de deux types de molécules portant chacune un site de complexation différent (couche mixte :



$\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TANODAGA}({}^{64}\text{Cu}))_y$ ($x/y=2$ ou 10)), soit d'un seul type de molécules portant deux sites de complexation différents ($\text{Au@TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}({}^{64}\text{Cu})]$). Ces nanoparticules peuvent être co-marquées par les ions Gd^{3+} et des ions radioactifs émetteurs de positons (${}^{64}\text{Cu}^{2+}(\text{NODAGA})$ et ${}^{89}\text{Zr}^{4+}(\text{DFO})$). Grâce à cette composition de la couche organique, il a été possible de suivre la biodistribution simultanément par IRM et TEP. Les nanoparticules $\text{Au@TA}[\text{DOTAGA}(\text{Gd})\text{-lys-NODAGA}({}^{64}\text{Cu})]$ et $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TANODAGA}({}^{64}\text{Cu}))_y$ sont caractérisées par un comportement sain : elles circulent librement avant d'être éliminées par la voie rénale. En revanche, les nanoparticules $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_x(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ avec le rapport molaire (TADFO/TADOTAGA) le plus élevé ($x/y=2$) ont tendance à s'accumuler de façon indésirable dans le foie. Ce comportement peut s'expliquer par le caractère hydrophobe de TADFO. Lorsqu'on diminue la proportion de la DFO en synthétisant des nanoparticules d'or $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{10y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ c'est-à-dire avec un rapport molaire (TADFO/TADOTAGA) plus faible, on constate une accumulation progressive des nanoparticules $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{10y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ dans les reins et la vessie contrairement à ce qui a été observé avec les nanoparticules $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{2y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$. De plus, on a constaté une plus faible accumulation dans le foie et dans la rate. Après leur circulation *in vivo*, les nanoparticules $\text{Au@}(\text{TADOTAGA}(\text{Gd}))_{10y}(\text{TADFO}({}^{89}\text{Zr}))_y$ ont été éliminées rapidement par la voie rénale en raison de leur petite taille.

Une alternative à l'utilisation du ligand DFO afin d'améliorer le comportement *in vivo* de la sonde bimodale est en cours d'investigation. Récemment, Pandya *et al.* ont démontré que le ligand macrocyclique DOTA complexait mieux l'ion zirconium que le ligand DFO. Cependant la proposition de Pandya *et al.* de

remplacer DFO par DOTA ne nous parait pas convaincante car le radiomarquage des nanoparticules Au@TADOTAGA par zirconium-89 a été un échec. Nous sommes en revanche très attentifs au sujet des travaux visant à proposer des chélateurs hydrophiles de zirconium-89.

Références bibliographiques

- [120] S. Roux *et al.*, « Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol », *Langmuir*, vol. 21, n° 6, p. 2526-2536, mars 2005.
- [121] V. Thakare Sudam, « Multifunctional platforms for cancer theranosis », thesis, Bourgogne Franche-Comté, 2018.
- [122] I. Turcu *et al.*, « Lipoic Acid Gold Nanoparticles Functionalized with Organic Compounds as Bioactive Materials », *Nanomaterials*, vol. 7, n° 2, févr. 2017.
- [123] E. Pensa *et al.*, « The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, n° 8, p. 1183-1192, août 2012.
- [124] M. K. Corbierre et R. B. Lennox, « Preparation of Thiol-Capped Gold Nanoparticles by Chemical Reduction of Soluble Au(I)–Thiolates », *Chem. Mater.*, vol. 17, n° 23, p. 5691-5696, nov. 2005.
- [125] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et C. Kiely, « Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles », *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 0, n° 16, p. 1655-1656, janv. 1995.
- [126] G. Laurent, « Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles pour la radiothérapie guidée par imagerie. », thesis, Besançon, 2014.
- [127] S. Ganesh, P. Velavendan, N. K. Pandey, U. Kamachi Mudali, et R. Natarajan, « Spectrophotometric determination of zirconium with Chrome Azurol s in aqueous streams of nuclear fuel reprocessing », *Proc. DAE-BRNS Fifth Symp. Nucl. Anal. Chem.*, 2014.
- [128] C. ALRIC, *Synthese et caracterisation de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour la radiotherapie guidée par imagerie.* .
- [129] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, et M. A. Iatì, « Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review », *J. Phys. Condens. Matter Inst. Phys. J.*, vol. 29, n° 20, p. 203002, mai 2017.
- [130] C. Alric *et al.*, « The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance », *Nanoscale*, vol. 5, n° 13, p. 5930-5939, juill. 2013.
- [131] G. Laurent *et al.*, « Minor changes in the macrocyclic ligands but major consequences on the efficiency of gold nanoparticles designed for radiosensitization », *Nanoscale*, vol. 8, n° 23, p. 12054-12065, juin 2016.
- [132] D. N. Pandya *et al.*, « Zirconium tetraazamacrocyclic complexes display extraordinary stability and provide a new strategy for zirconium-89-based radiopharmaceutical development », *Chem. Sci.*, vol. 8, n° 3, p. 2309-2314, mars 2017.

Chapitre 3

La synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour le ciblage actif

Table des matières

Chapitre 3 : La synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour le ciblage actif

3.1. Réflexion sur le ciblage des nanoparticules d'or	200
3.2. Synthèses et caractérisation des nanoparticules d'or	203
3.2.1. Synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-EuK]	203
3.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NH ₂].....	204
3.2.3. Synthèse de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-Lys-NH ₂].....	205
3.2.4. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte composée de (TA[DOTAGA]) et (TA[NODAGA-lys-NH ₂])	205
3.3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules d'or	207
3.3.1. Microscope électronique à transmission (MET)	207
3.3.2. Spectrophotométrie UV-visible.....	207
3.3.3. Potentiel zêta.....	207
3.3.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	207
3.3.5. Etude de stabilité colloïdale à différents pH	208
3.4. Résultats et Discussion	208
3.4.1. Au@TA[DOTAGA-lys-EuK].....	208
3.4.2. Au@TA[DOTAGA-lys-NH ₂]	212
3.4.3. Au@[TANODAGA-lys-NH ₂].....	216
3.4.4. Au@(TADOTAGA) _{20y} (TANODAGA-Lys-NH ₂) _y	219
3.5. Conclusion	223
Références bibliographiques	224
Conclusion générale	225

La synthèse de nanoparticules d'or multifonctionnelles pour le ciblage actif

3.1. Réflexion sur le ciblage des nanoparticules d'or

La radiothérapie fait partie de l'arsenal thérapeutique pour traiter, seule ou en combinaison avec la chirurgie et/ou la chimiothérapie, les tumeurs solides [1]. Elle repose sur l'emploi de rayonnements ionisants (rayons X ou gamma) dont l'absorption exerce un effet cytotoxique. Comme la composition chimique des cellules normales et des cellules cancéreuses est similaire, les différences d'absorption sont trop faibles pour garantir un traitement sélectif des tumeurs. En d'autres termes, la dose de rayonnement est trop cytotoxique pour préserver les tissus sains traversés. La radiothérapie s'accompagne souvent d'effets secondaires délétères [2]. Afin de circonscrire les effets de la radiothérapie à la zone tumorale plusieurs pistes sont en cours d'exploration. Elles reposent sur la nature du rayonnement (proton et hadronthérapie), sur la balistique et sur la radiosensibilisation [3]. Cette dernière consiste à modifier la composition chimique des tumeurs solides pour induire une absorption plus forte dans la zone à traiter que dans les tissus sains qui doivent être préservés. Comme les éléments à numéro atomique (Z) élevé présentent une propension à absorber les photons X, il a été proposé d'utiliser les nanoparticules d'or ($Z(\text{Au})=79$) pour rehausser les effets de la dose du rayonnement ionisant [4]. Afin de garantir une meilleure sélectivité du traitement de tumeurs solides par radiothérapie, il est indispensable de contrôler la biodistribution des agents radiosensibilisants. L'avantage des nanoparticules radiosensibilisantes est qu'elles bénéficient d'un meilleur contrôle de la biodistribution que les molécules radiosensibilisantes. Cela se traduit par une accumulation d'un plus grand nombre d'éléments radiosensibilisants et par une rétention plus durable lorsque les éléments radiosensibilisants sont transportés par les nanoparticules. On parle alors de ciblage passif qui repose sur le controversé effet EPR [5]. Afin de renforcer la différence entre tumeur et tissu sain, le ciblage actif des nanoparticules a été au centre de nombreuses études visant à augmenter le

nombre des nanoparticules dans la tumeur et leur temps de rétention. Le ciblage actif repose à la fois sur l'effet EPR et sur l'interaction préférentielle des nanoparticules avec les cellules cancéreuses qui sont caractérisées par la surexpression de certains récepteurs membranaires.

Un des moyens pour améliorer le ciblage des tumeurs consiste à modifier la chimie de surface des nanoparticules d'or. Elles peuvent être fonctionnalisées par des biomolécules qui présentent une forte affinité pour les cellules cancéreuses. L'introduction de groupements fonctionnels sur les nanoparticules d'or développées dans le cadre de mes travaux de thèse est possible du fait de la disponibilité importante des groupements acide carboxylique portés par les chélateurs. Mais cette stratégie est déconseillée car elle est susceptible d'altérer le pouvoir complexant des chélateurs. Afin de fonctionnaliser les nanoparticules par des groupes de ciblage tout en préservant le pouvoir complexant des chélateurs, nous proposons deux stratégies originales.

La première stratégie consiste à synthétiser une plateforme moléculaire portant à la fois un chélateur macrocyclique de type DOTAGA et le groupe de ciblage. Afin de valider ce concept, nous avons choisi le peptide EuK comme groupe de ciblage de PSMA (EuK pour acide glutamique-urée-Lysine et PSMA pour l'antigène membranaire spécifique de la prostate). Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr Franck Denat (PD2A, ICMUB), la plateforme TA[DOTAGA-Lys-EuK] a été synthétisée pour la première fois par Vivek Thakare dont la thèse était consacrée au développement de chélateurs multifonctionnels pour la synthèse de nanoparticules radiosensibilisantes conçues pour la radiothérapie guidée par l'imagerie (AGulx[®], nanoparticules d'or). Cette plateforme est construite autour de la lysine dont les deux fonctions amine primaire et la fonction acide carboxylique assurent le greffage de l'acide thioctique, du macrocycle DOTAGA et du groupe de ciblage actif EuK (Figure 88).

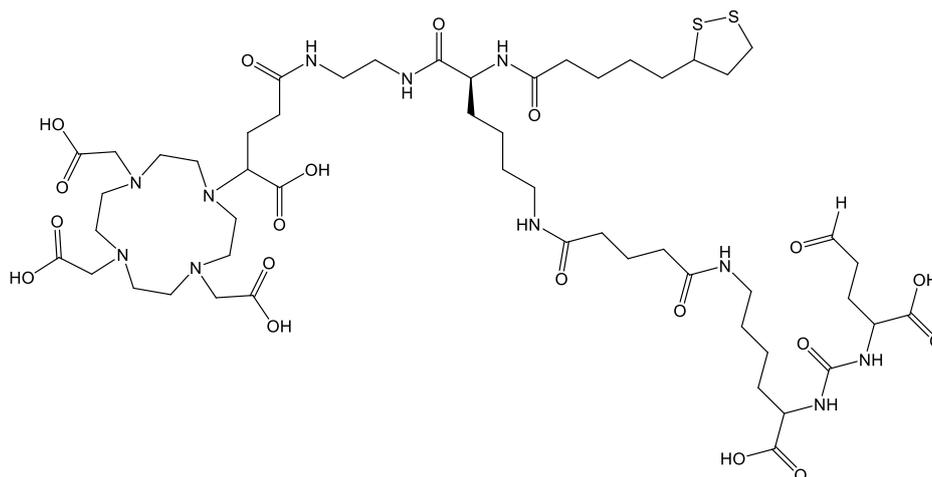


Figure 88 : Schéma du chélateur TADOTAGA-Lys-EuK

Les deux atomes de soufre de l'acide thioctique garantissent l'immobilisation de la plateforme TA[DOTAGA-Lys-EuK] sur les nanoparticules d'or au cours de leur synthèse alors que le macrocycle DOTAGA a été choisi pour former des complexes stables avec les ions gadolinium et indium-111 et permettre ainsi le suivi des nanoparticules d'or par IRM et SPECT. Le peptide EuK est un groupe de ciblage dirigé contre l'antigène membranaire spécifique (PSMA) surexprimé dans le cas de certaines tumeurs de la prostate [6]. Il constitue donc une cible idéale pour la détection et le traitement ciblé des tumeurs. Ainsi les nanoparticules d'or recouvertes par la plateforme TA[DOTAGA-Lys-EuK] pourraient être intéressantes pour un meilleur ciblage des tumeurs de la prostate qui pourra être suivi par IRM ou par SPECT.

La seconde stratégie consiste à recouvrir à la surface de nanoparticules d'or par des plateformes moléculaires TA[DOTAGA-lys-NH₂] et TA[NODAGA-lys-NH₂]. Comme dans le cas de la plateformes TA[DOTAGA-lys-EuK], ces deux plateformes moléculaires sont construites autour de la lysine. Une des deux fonctions amine primaire et la fonction acide carboxylique sont utilisées pour greffer l'acide thioctique (TA) (pour l'immobilisation de la plateforme sur les cœurs d'or en cours de synthèse) et le macrocycle NODAGA (pour la TEP) ou DOTAGA pour l'IRM et/ou la SPECT. La fonction amine restante constituera un site réactif pour la post-fonctionnalisation des nanoparticules par différentes molécules dont différents agents de ciblage (peptides, anticorps) (Figure 89).

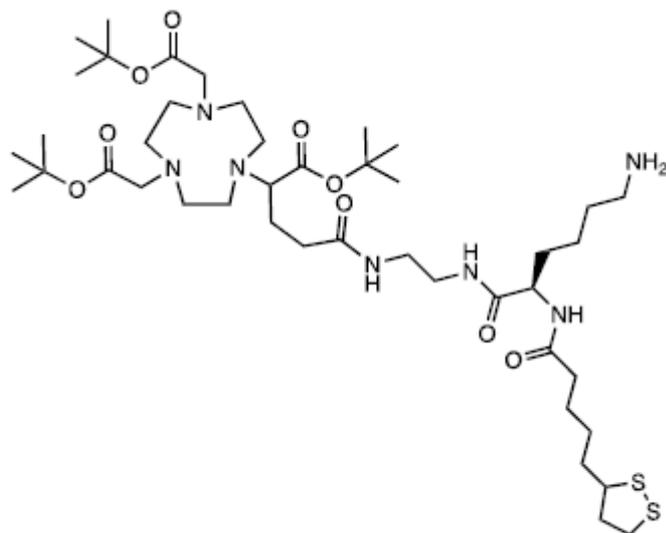


Figure 89 : Schéma du chélateur TANODAGA-Lys-NH₂

Avant de valider le concept de ciblage actif des nanoparticules d'or, nous avons cherché à établir des protocoles de synthèse fiable et reproductibles. Ce chapitre rassemble donc les principaux résultats obtenus pour les nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK], Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] Au@TA[NODAGA-lys-NH₂], Au@(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH₂]).

3.2. Synthèses et caractérisation des nanoparticules d'or

3.2.1. Synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-EuK]

Dans un ballon monocol de 50 mL, le sel d'or H₂AuCl₄.3H₂O (19 mg ; 4,87.10⁻⁵ mol) est dissous dans du méthanol (6 mL). La solution de couleur jaune est ensuite placée sous agitation magnétique. Dans un flacon, la plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-EuK] (65 mg ; 5,2.10⁻⁵ mol) est dissoute dans l'eau ultrapure (3,8 ml). Après dissolution, la solution aqueuse de TA[DOTAGA-lys-EuK] est ajoutée au contenu du ballon sous agitation. La coloration du mélange réactionnel passe du jaune à l'orange vif. Enfin, le réducteur, une solution aqueuse de

tétrahydruroborate de sodium NaBH_4 (20 mg ; $5,28 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 1 mL d'eau ultrapure), est ajouté par fractions (0,5 mL puis progressivement) au mélange réactionnel. L'addition de la solution de NaBH_4 s'accompagne de l'apparition d'une coloration noire et d'un dégagement gazeux. La coloration noire indique la réduction de Au^{3+} en $\text{Au}(0)$. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure.

Après la synthèse, les nanoparticules d'or $\text{Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]}$ ont été purifiées par dialyse pendant 48 heures (MCWO 6-8 kDa). Le bain de dialyse est remplacé 3 fois par jour toutes les quatre heures pendant 48 heures. Les nanoparticules d'or purifiées ont été ensuite concentrées à un volume final de ~1 mL de suspension par centrifugation dans des tubes Vivaspin® de 10 kDa.

3.2.2. Synthèse des nanoparticules d'or $\text{Au@TA[DOTAGA-Lys-NH}_2\text{]}$

Dans un ballon monocol de 50 mL, le sel d'or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (24 mg ; $6,09 \cdot 10^{-5}$ mol) est dissous dans du méthanol (7,5 mL). La solution de coloration jaune clair est ensuite placée sous agitation magnétique. En parallèle, dans un flacon, la plateforme moléculaire $\text{TA[DOTAGA-lys-NH}_2\text{]}$ (50 mg ; $5,99 \cdot 10^{-5}$ mol) est dissoute dans l'eau ultrapure (3 mL). Ensuite la solution aqueuse de TADOTAGA-Lys-NH_2 est ajoutée au contenu du ballon sous agitation. Il en résulte un changement de couleur, du jaune à l'orange vif. Le milieu réactionnel a été acidifié avec l'acide acétique (1 mL) pour éviter l'agglomération des nanoparticules d'or. Une solution aqueuse de tétrahydruroborate de sodium NaBH_4 (23 mg ; $3,99 \cdot 10^{-4}$ mol) dans l'eau ultrapure (3 mL) est ajoutée au mélange réactionnel par fractions (0,5 mL puis progressivement). La coloration de la solution vire instantanément au noir avec un dégagement gazeux. Par la suite, le mélange est placé sous agitation magnétique pendant environ une heure.

Après la synthèse, les nanoparticules ($\text{Au@TADOTAGA-lys-NH}_2$) ainsi obtenues ont été d'abord purifiées par dialyse (seuil de coupure du boudin compris entre 6 et 8 kDa). Le bain de la dialyse est remplacé 3 fois par jour toutes les quatre heures pendant 48 heures pour se débarrasser des résidus organiques et inorganiques. Les nanoparticules d'or sont ensuite concentrées à 10 g Au/L (~1 ml de suspension) par centrifugation dans des tubes Vivaspin® de 10 kDa.

3.2.3. Synthèse de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-Lys-NH₂]

Dans un ballon monocol de 50 ml, le sel d'or H₂AuCl₄.3H₂O (26,2 mg ; 6,65.10⁻⁵ mol) est dissous dans le méthanol (8,21 mL). La solution de coloration jaune clair est ensuite placée sous agitation magnétique. Une solution aqueuse du chélateur trifonctionnel TA[NODAGA-lys-NH₂] (49 mg ; 6,67.10⁻⁵ mol dans 5,4 mL d'eau ultrapure) est ajoutée au contenu du ballon sous agitation. Il en résulte un changement de couleur du jaune à l'orange vif. Ensuite, le milieu réactionnel est acidifié par ajout d'acide acétique (1 mL) pour éviter l'agglomération des nanoparticules d'or. Enfin, le réducteur tétrahydroborate de sodium NaBH₄ (25 mg ; 6,6.10⁻⁴ mol) dissous dans d'eau ultrapure (2 mL) est ajouté au mélange réactionnel par fractions (1 mL puis progressivement). La coloration de la solution vire instantanément au noir avec un dégagement gazeux. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure.

Après la synthèse, les nanoparticules (Au@TANODAGA-lys-NH₂) ont été purifiées par dialyse (MWCO : 6-8 kDa) pendant 48 heures. Le bain de la dialyse est remplacé 3 fois par jour toutes les quatre heures pendant 48 heures. Les nanoparticules d'or purifiées ont été ensuite concentrées à 10 g Au/L (~1 mL de suspension) par centrifugation dans des tubes Vivaspin[®] de 10 kDa.

3.2.4. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte composée de (TA[DOTAGA]) et (TA[NODAGA-lys-NH₂])

Les nanoparticules Au@(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH₂]) recouvertes par une couche mixte de chélateurs organiques (TADOTAGA) et (TANODAGA-lys-NH₂) ont été synthétisées en s'inspirant des protocoles établis pour les nanoparticules d'or Au@(TADOTAGA)(TADFO) et Au@(TADOTAGA)(TANODAGA) développées dans le cadre de la thèse (Voir chapitre 2).

Une solution aqueuse de TADOTAGA (0,288 g ; $4,07 \cdot 10^{-4}$ mol de TADOTAGA dissous dans 20 mL d'eau ultrapure) et une solution aqueuse de TANODAGA-Lys-NH₂ (82,4 mg ; $1,12 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 3 mL d'eau ultrapure) sont ajoutées successivement dans un ballon monocol de 250 mL contenant une solution méthanolique de sel d'or H₂AuCl₄.3H₂O (0,192 g ; $4,869 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans un volume de 60 mL de méthanol) sous agitation magnétique. La couleur de la solution de sel d'or est jaune clair avant l'ajout des chélateurs. Un changement de couleur se produit après l'addition des chélateurs organiques : la coloration du milieu vire à l'orange vif. Ensuite, le milieu réactionnel a été acidifié en ajoutant de l'acide acétique (1 mL) pour éviter l'agglomération des nanoparticules d'or. Une solution aqueuse de NaBH₄ (0,2 g ; $5,28 \cdot 10^{-3}$ mol dans 13 mL d'eau ultrapure) est ajouté sous agitation par fractions (6 mL puis progressivement) au mélange de sel d'or et de chélateurs. L'ajout de la solution aqueuse de NaBH₄ au mélange réactionnel se traduit par l'apparition d'une coloration noire. Cette coloration noire accompagnée d'un dégagement gazeux est attribuée à la formation de nanoparticules d'or. Le mélange réactionnel ainsi obtenu est laissé sous agitation magnétique pendant environ une heure.

Les nanoparticules Au@(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH₂]) ainsi synthétisées ont été purifiées dans un premier temps par dialyse (MWCO : 6-8 kDa) pendant 48 heures. Le bain de la dialyse est remplacé 3 fois par jour toutes les quatre heures pendant 48 heures. Les nanoparticules d'or ainsi purifiées ont été ensuite concentrées à 10 g Au/L par centrifugation dans des tubes Vivaspin[®] de 10 kDa.

3.3. Caractérisations physico-chimiques des nanoparticules d'or

3.3.1. Microscope électronique à transmission (MET)

Une goutte des différentes suspensions colloïdales préalablement diluées (5 μL ; 0,10 g Au/L) a été déposée sur une grille en cuivre recouverte de carbone. Le dépôt séché à la température ambiante a été ensuite introduit dans le microscope électronique à transmission (JEOL 2100F, 200kV). Les clichés TEM ont été ensuite analysés pour déterminer le diamètre du cœur des nanoparticules d'or.

3.3.2. Spectrophotométrie UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des échantillons ont été réalisés à partir de suspensions colloïdales de nanoparticules d'or de concentration 1 mM en or ($[\text{Au}] = 1 \text{ mM}$ en or soit 0,20 g Au/L). Les spectres ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD 210, dans la gamme de longueur d'onde allant de 400 à 800 nm.

3.3.3. Potentiel zêta

Les mesures du potentiel zêta ont été réalisées à partir de suspensions colloïdales de nanoparticules d'or de concentration $[\text{Au}] = 1 \text{ mM}$ (soit 0,20 g Au/L) contenant du chlorure de sodium ($[\text{NaCl}] = 10^{-2} \text{ M}$). Le pH des différentes suspensions colloïdales a été ajusté par l'ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium ($[\text{NaOH}] = 1 \text{ M}$) ou une solution d'acide chlorhydrique ($[\text{HCl}] = 1 \text{ M}$). La mesure du potentiel zêta a été réalisée à l'aide d'un zétamètre (Nanosizer ZS de Malvern Instruments) équipé d'un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm et relié à un ordinateur.

3.3.4. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La mesure du diamètre hydrodynamique (D_h) a été effectuée à partir de suspensions colloïdales de nanoparticules d'or ajustées à pH 7,4. La mesure réalisée avec l'appareil Nanosizer ZS (Malvern Instruments) a été répétée 3 fois.

3.3.5. Etude de stabilité colloïdale à différents pH

L'étude de la stabilité colloïdale à différents pH a été réalisée à partir de suspensions colloïdales à 1,25 mM en or (0,25 g Au/L) dont le pH a été ajusté par ajout d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (1M) ou d'acide chlorhydrique (1M). L'absorbance des suspensions a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible de type SPECORD 210 à différents pH sur une gamme de longueurs d'onde comprise entre 400 et 800 nm.

3.4. Résultats et Discussion

3.4.1. Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]

Le fait que les propriétés optiques des nanoparticules d'or soient sensibles à leur taille, leur forme et leur environnement confère un réel intérêt à la spectrophotométrie UV-visible pour caractériser les suspensions de nanoparticules d'or (Figure 90).

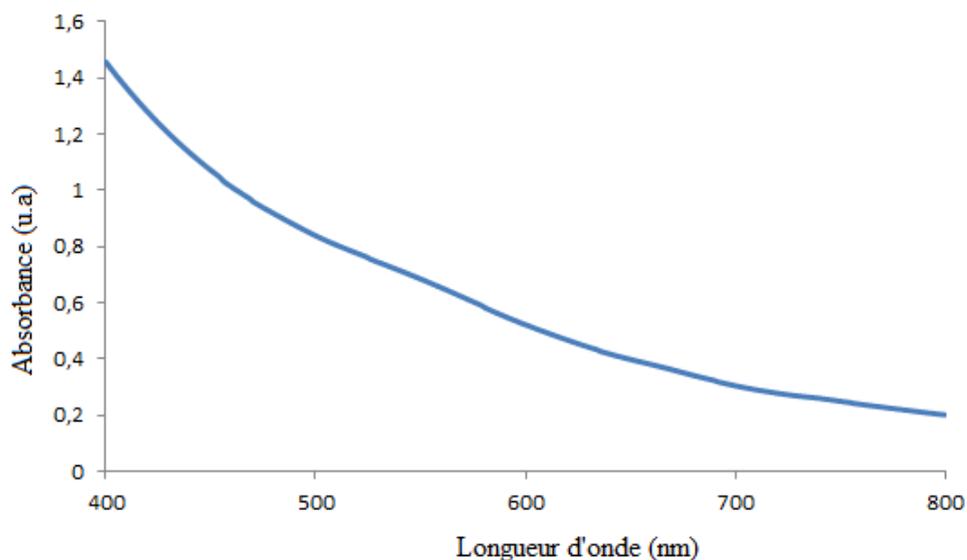


Figure 90 : Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]

Le spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] enregistré après la synthèse et la purification des nanoparticules présente une faible bande d'absorption 520 nm entre 500 et 600 nm (Figure 90). La faible absorbance au voisinage de 520 nm indique que la taille des cœurs d'or des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] est inférieure ou égale à 3 nm.

Ce résultat concorde avec ceux obtenus pour les différents types de nanoparticules d'or synthétisées avec un protocole similaire (Chapitre 2). Afin de collecter des informations précises sur la taille et la forme des nanoparticules, nous avons réalisé une série de clichés TEM à partir d'un dépôt d'une goutte de la suspension colloïdale Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] (Figure 91).

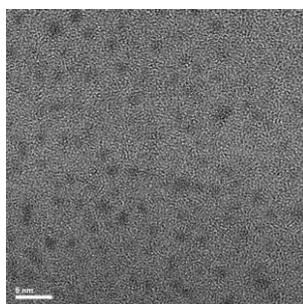


Figure 91: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]

L'analyse des images acquises par MET montre que les nanoparticules d'or sont d'apparence sphérique. Elles présentent une distribution de taille étroite. Le diamètre moyen des cœurs d'or des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] est de $2,20 \text{ nm} \pm 0,20 \text{ nm}$. Cette information confirme l'estimation de la taille des cœurs d'or déduite des spectres UV-visible des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]. En outre, nous avons mesuré le diamètre hydrodynamique afin de s'assurer que la taille totale ne dépasse pas la valeur limite (inférieur à 10 nm) au-delà de laquelle l'élimination rénale n'est plus observée.

Malgré l'encombrement de la plateforme moléculaire TA[DOTAGA-lys-EuK], le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or recouvertes par ce chélateur trifonctionnel reste inférieure à 10 nm ($D_h = 6,85 \text{ nm} \pm 0,35 \text{ nm}$).

L'enregistrement des spectres UV-visibles à différents pH a été ensuite réalisé pour déterminer la stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] (Figure 92).

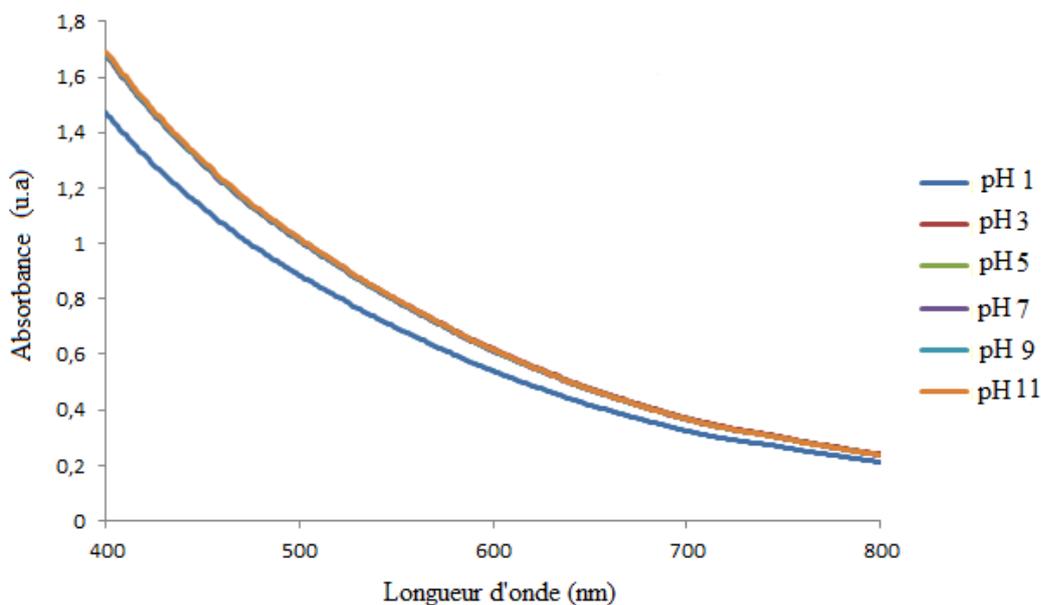


Figure 92 : Spectre UV-visible des suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] à différents pH.

Comme nous l'avons montré dans le cas des nanoparticules d'or décrites dans le chapitre 2, la spectrophotométrie UV-visible est particulièrement bien adaptée pour évaluer la stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules d'or. En effet, la sensibilité des propriétés optiques des nanoparticules d'or au changement de forme, de taille et d'environnement induit des modifications du spectre lorsque les nanoparticules d'or s'agglomèrent et/ou précipitent. À l'exception de la courbe bleue (pH 1), les courbes enregistrées à différents pH sont superposées (Figure 92). Cette observation indique que les suspensions de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-EuK], sont stables sur une large gamme de pH comprise entre pH 3 et pH 11.

La stabilité colloïdale des suspensions de Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] peut s'expliquer par l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH (Figure 93). Lorsque le pH est inférieur à 2, le potentiel zêta est positif alors qu'il est de plus en plus négatif pour les pH supérieurs à 2.

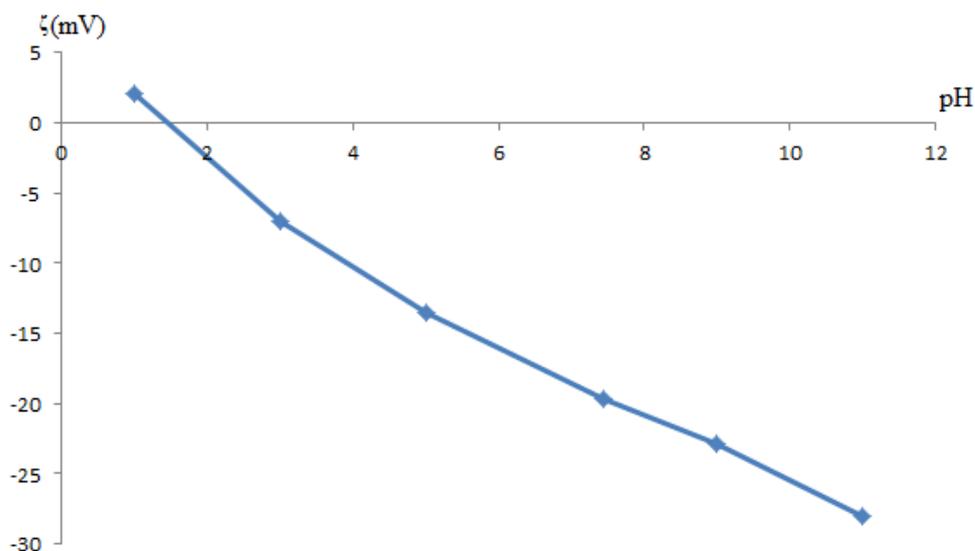


Figure 93: Courbe du potentiel zêta en fonction du pH pour des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK]

La présence des charges à la surface des nanoparticules d'or résulte de la présence des fonctions amine et acide carboxylique portées par les chélateurs organiques DOTAGA. Pour un pH inférieur à 2, la charge positive est due à la protonation des amines tertiaires et des carboxylates tandis que pour un pH supérieur à 2, la charge négative résulte de la déprotonation des fonctions acide carboxylique et ammonium. La valeur du potentiel zêta à pH 7,4 est de l'ordre de -20 mV.

Malgré la complexité du chélateur trifonctionnel TA[DOTAGA-lys-EuK] il comporte un macrocycle pour la complexation des ions d'intérêt pour l'imagerie (Gd^{3+} pour l'IRM, $^{111}In^{3+}$ pour la SPECT), une fonction d'ancrage (les deux atomes de soufre endocyclique du résidu acide thiooctique) et un groupe de ciblage actif dirigé contre PSMA, tous greffés sur la lysine il a été possible, comme dans le cas du chélateur trifonctionnel (TA[DOTAGA-lys-NODAGA]) de synthétiser des nanoparticules d'or dont les caractéristiques sont compatibles avec une application *in vivo*. Les suspensions des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] présentent une excellente stabilité colloïdale sur une large gamme de pH centrée sur le pH physiologique. En outre, le diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules est suffisamment petit pour permettre une élimination rénale qui constitue un prérequis indispensable pour une utilisation *in vivo* de ces nanoparticules.

3.4.2. Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂]

Les premières tentatives de synthétiser les nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-Lys-NH₂] ont échoué alors que nous avons appliqué les protocoles qui ont conduit à l'obtention des nanoparticules d'or recouvertes par des couches organiques composées d'un seul type de chélateurs macrocycliques bi ou trifonctionnels ou d'un mélange de différents chélateurs (couche mixte). La différence entre TA[DOTAGA-lys-NH₂] et les chélateurs avec lesquels des nanoparticules d'or ont pu être produites selon des caractéristiques adaptées aux applications *in vivo* réside dans la présence d'une fonction amine primaire. La plateforme moléculaire TA[DOTAGA-Lys-NH₂] a été conçue comme les plateformes TA[DOTAGA-lys-NODAGA] et TA[DOTAGA-lys-EuK] autour de la lysine mais une des deux fonctions amine primaire n'a pas été modifiée. Cette fonction amine primaire a été laissée intacte afin de servir de site de greffage pour la post-fonctionnalisation des nanoparticules d'or. L'intérêt de cette stratégie de post-fonctionnalisation est de préserver le pouvoir complexant des chélateurs. En effet, elle repose sur le fait que les molécules fonctionnelles seront greffées sur la fonction amine alors que dans le cas des nanoparticules d'or recouvertes par les chélateurs macrocycliques (TADOTAGA, TANODAGA) ou linéaires (DTDTPA) dépourvus de fonction amine primaire, la postfonctionnalisation exploite les fonctions COOH des chélateurs avec le risque d'amoinrir leur pouvoir complexant (Figure 94).

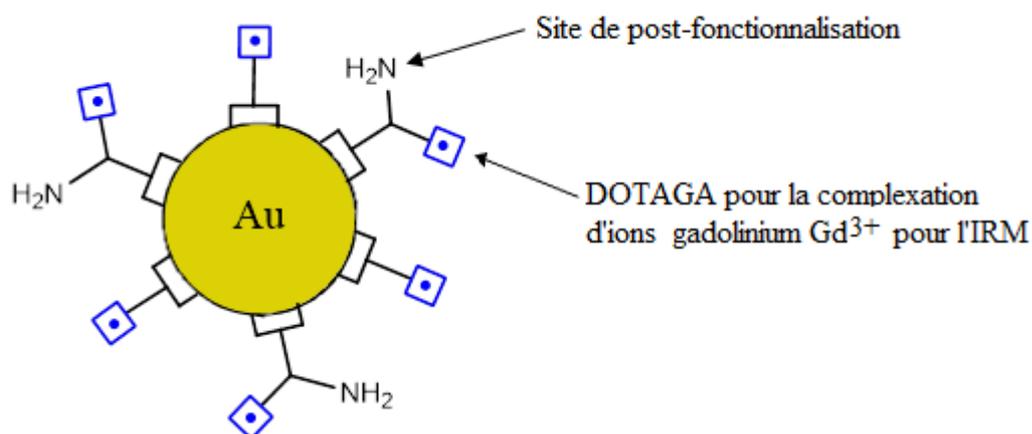


Figure 94: Schéma de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] recouverte par un chélateur trifonctionnel avec une fonction amine primaire.

Le rôle de la fonction amine primaire de TA[DOTAGA-lys-NH₂] est donc essentiel pour adapter finement les propriétés des nanoparticules d'or recouvertes de chélateurs. Cependant la fonction amine a été identifiée comme la source probable de l'échec de la synthèse des nanoparticules d'or en présence TA[DOTAGA-lys-NH₂]. Le caractère nucléophile de cette fonction a été exploité pour immobiliser des molécules à la surface des nanoparticules d'or. Bien que l'azote possède moins d'affinité pour les surfaces d'or métallique que le soufre, il existe une compétition préjudiciable entre les atomes de soufre du site de greffage de TA[DOTAGA-lys-NH₂] et l'atome d'azote de la fonction amine. Afin de limiter cette compétition, nous avons choisi de diminuer le caractère nucléophile de l'atome d'azote en ajoutant de l'acide dans le milieu de synthèse. Cette astuce de synthèse qui a probablement conduit à la conversion de la fonction amine primaire en cation ammonium s'est révélée bénéfique car en acidifiant le milieu réactionnel, nous avons réussi à obtenir des nanoparticules d'or. Après purification, la suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] est analysée par spectrophotométrie UV-visible (Figure 95).

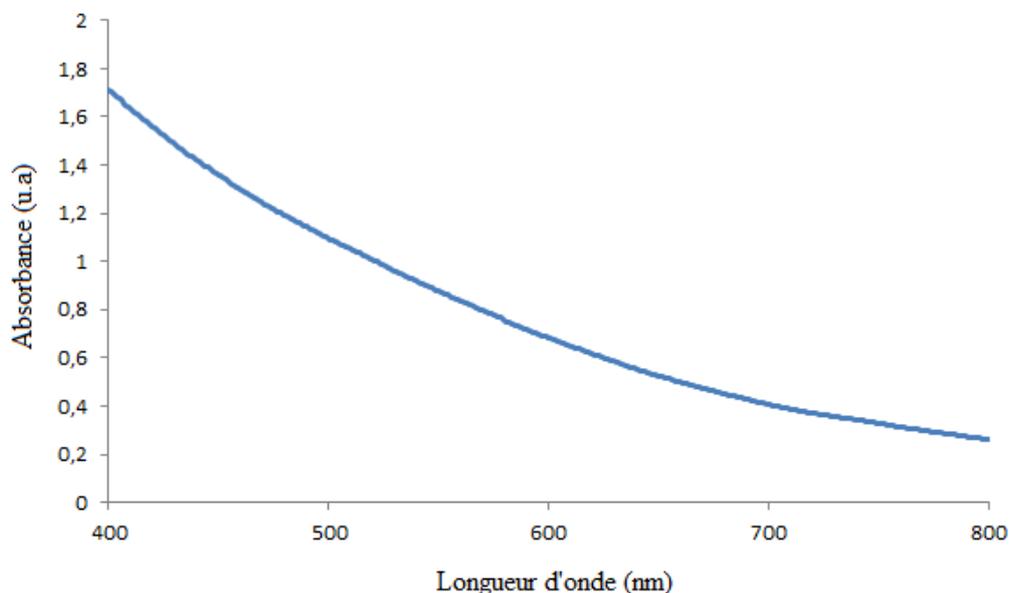


Figure 95: Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂]

Le spectre UV-Visible de la suspension de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] se caractérise par l'absence d'une bande plasmon au voisinage de 520 nm.

Cela implique que le cœur d'or des nanoparticules d'or synthétisées possède un diamètre de l'ordre de 2 à 3 nm.

L'examen des clichés MET révèle une distribution assez homogène de l'échantillon de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] (Figure 96). La moyenne en taille calculée sur une série de 99 mesures indique une valeur de 2,37 nm ± 0,20 nm.

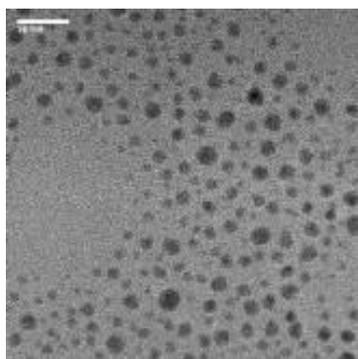


Figure 96: Cliché MET de nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂]

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] a également été déterminé en utilisant la suspension colloïdale à pH (7,4) qui nous a servi à mesurer le potentiel zêta. Le résultat de la mesure par DLS indique que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] est de 5,26 nm ± 0,25 nm.

Malgré la présence de la fonction amine primaire dont la charge positive à pH < 8 peut diminuer la charge négative généralement observée pour les nanoparticules d'or recouvertes par les chélateurs de type DOTAGA (cf Chapitre 2, figure 66), les suspensions des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] sont stables pour des pH supérieurs à 3. Comme le montre la figure 97, les spectres UV visibles sont identiques de pH 3 à 11. Seul le spectre enregistré à pH 1 est légèrement différent, il présente sur la même gamme de longueurs d'onde une absorbance plus faible.

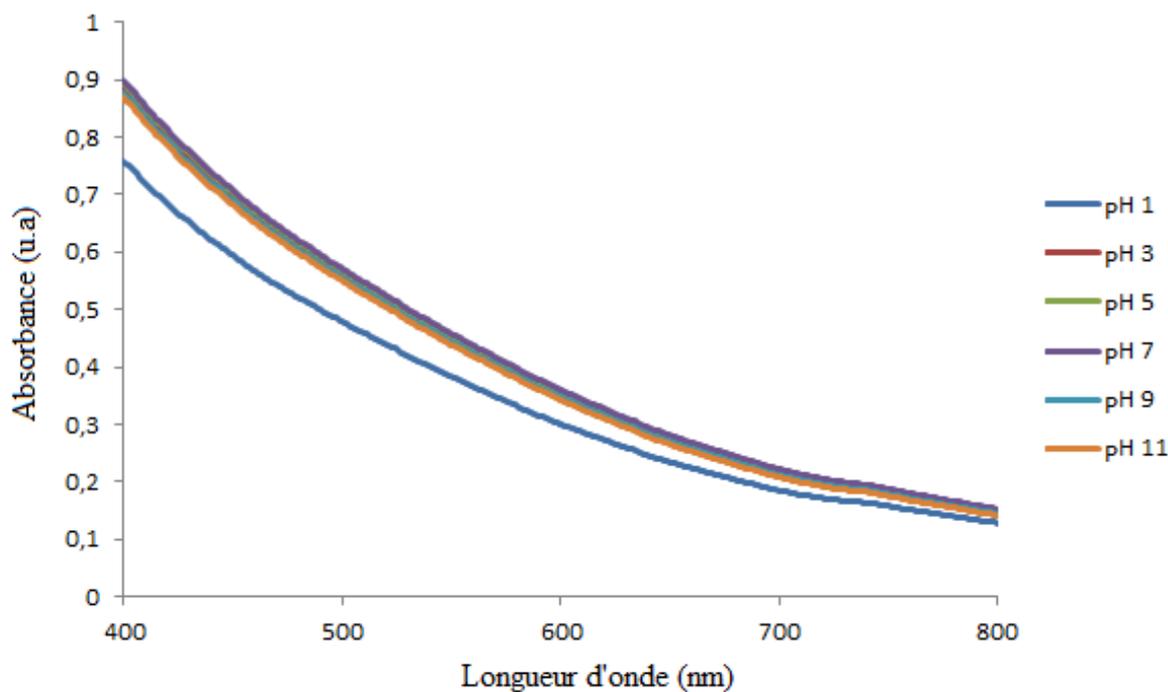


Figure 97: Spectres UV-visible de suspensions de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] à différents pH

Cependant cette baisse d'absorbance n'est pas associée à une précipitation de la suspension colloïdale Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂]. L'examen visuel de la suspension colloïdale à pH 1 ne montre pas de sédimentation des nanoparticules. La modification du spectre à pH 1 illustre probablement une agglomération des nanoparticules. D'après les spectres de la figure 96, nous pouvons conclure qu'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] est stable dans la gamme de pH.

La mesure du potentiel zêta des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] en fonction du pH a permis de tracer une courbe dont l'allure est similaire à celles décrites précédemment. A pH < 4, la charge positive est prédominante à la surface des nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂], tandis que pour pH > 4, les nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] présentent une charge négative (Figure 98).

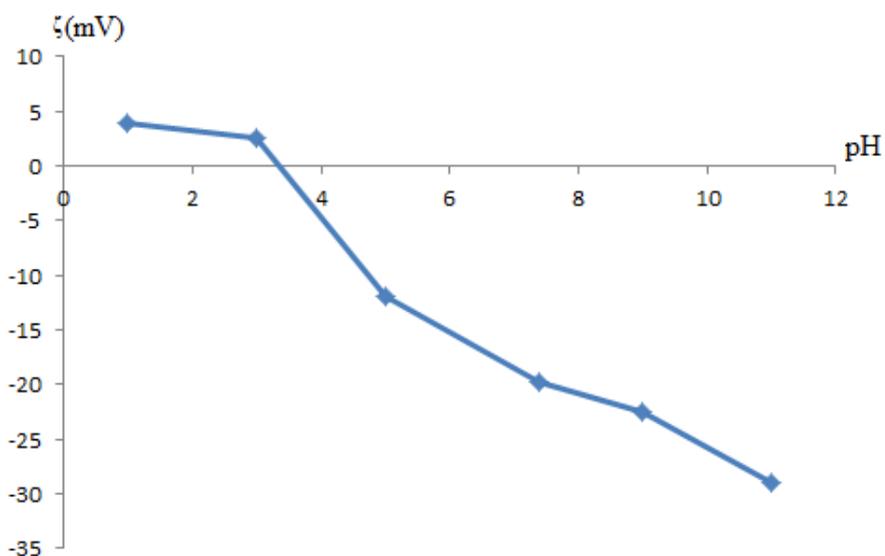


Figure 98: Potentiel zêta des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂] à différents pH

La présence de charges positives à la surface de nanoparticules d'or (pH<4) est attribuée à la protonation des amines tertiaires et du groupement (NH₂) du chélateur organique (TA[DOTAGA-lys-NH₂]). Pour pH supérieur à 4, la présence de charges négatives résulte de la déprotonation des fonctions acide carboxylique et ammonium.

3.4.3. Au@[TANODAGA-lys-NH₂]

Comme l'ont montré les travaux de Gautier Laurent, les macrocycles TADOTAGA assurent l'immobilisation des ions gadolinium (IRM) et indium-111 (TEMP) mais ne garantissent pas un radiomarquage durable des nanoparticules d'or par le cuivre-64. Ce constat constitue d'ailleurs le point de départ de mes travaux de thèse (cf Chapitre 1). Afin de disposer d'une plateforme moléculaire qui permette à la fois l'immobilisation du cuivre-64 et une postfonctionnalisation des nanoparticules d'or sans altération du pouvoir complexant, la molécule TA[NODAGA-lys-NH₂] a été synthétisée par Vivek Thakare puis Alix Deshotel. En s'inspirant du protocole de synthèse des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂], nous avons utilisé ce chélateur trifonctionnel pour préparer de nouvelles nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] (Figure 99).

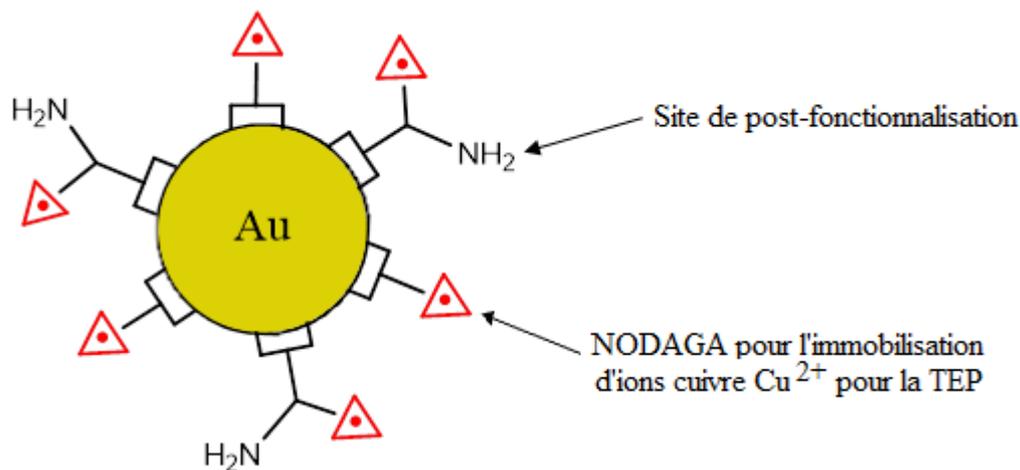


Figure 99: Schéma de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] recouverte par un chélateur trifonctionnel TA[NODAGA-Lys-NH₂] présentant une fonction amine primaire.

La réduction du sel d'or par NaBH₄ en présence de TA[NODAGA-lys-NH₂] a conduit à la formation de nanoparticules d'or purifiées par dialyse puis par ultrafiltration. Le spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] indique la présence d'une bande plasmon centrée à 520 nm (Figure 100). Bien qu'elle soit faible, la bande plasmon est plus forte que celle observée pour les nanoparticules d'or synthétisées au cours de cette thèse avec différents chélateurs. Une telle différence suggère que les cœurs d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] présentent un diamètre supérieur et/ou une dispersion en taille plus large.

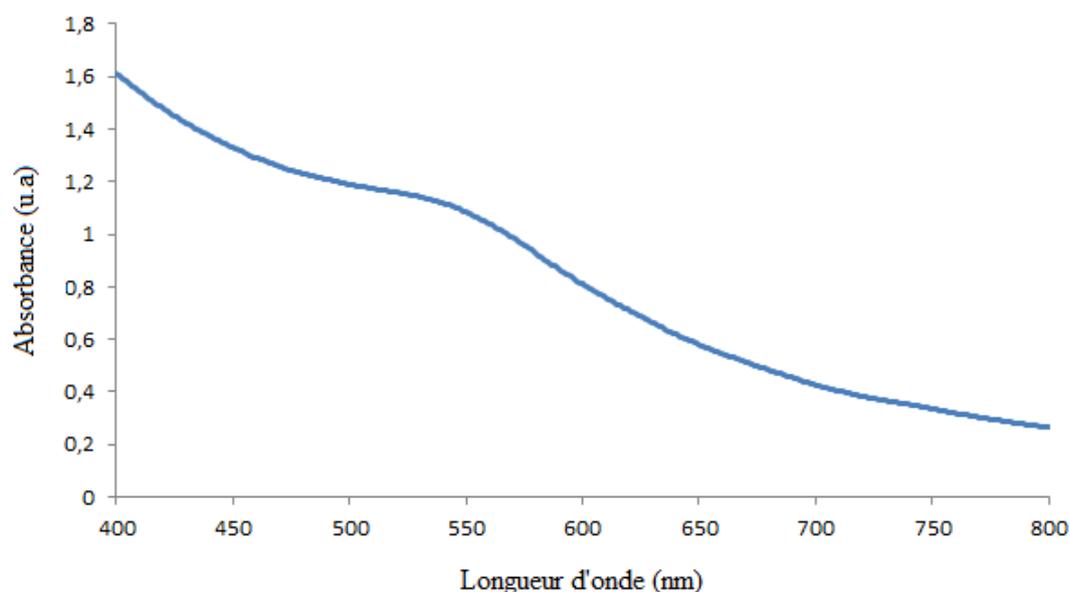


Figure 100: Spectre UV-visible d'une suspension des nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂]

Cependant l'analyse des clichés de MET ne met pas en évidence une augmentation du diamètre des cœurs d'or ni un élargissement de la distribution en taille (Figure 101). En effet, la taille moyenne calculée à partir de 90 mesures est de $2,3 \text{ nm} \pm 0,25 \text{ nm}$.

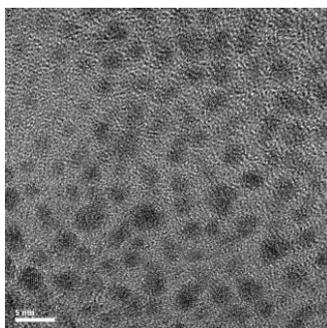


Figure 101 : Cliché MET des nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂]

3.4.4. Au@(**TADOTAGA**)_{20y}(**TANODAGA-Lys-NH₂**)_y

Le chélateur trifonctionnel TA[NODAGA-lys-NH₂] est très intéressant pour le développement des nanoparticules d'or comme nanosondes pour l'imagerie TEP. Le macrocycle NODAGA permet d'immobiliser les ions cuivre-64 et la fonction amine primaire élargit la gamme d'utilisation des nanoparticules d'or Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] car elle permet d'ajouter par postfonctionnalisation des propriétés complémentaires comme le ciblage actif. Cependant la TEP étant une technique d'imagerie tellement sensible, il n'est pas nécessaire d'avoir une grande quantité de chélateur NODAGA. Pour cette raison, nous avons exploré la possibilité de synthétiser des nanoparticules d'or avec une couche mixte de chélateurs bifonctionnels TADOTAGA et de chélateurs trifonctionnels TA[NODAGA-lys-NH₂] (Figure 102). Nous avons montré dans le cadre de cette thèse qu'il était effectivement possible de préparer des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche mixte de chélateurs bifonctionnels (TADOTAGA+TANODAGA ou TADFO, chapitre 2). De plus ces nanoparticules présentent un potentiel prometteur pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.

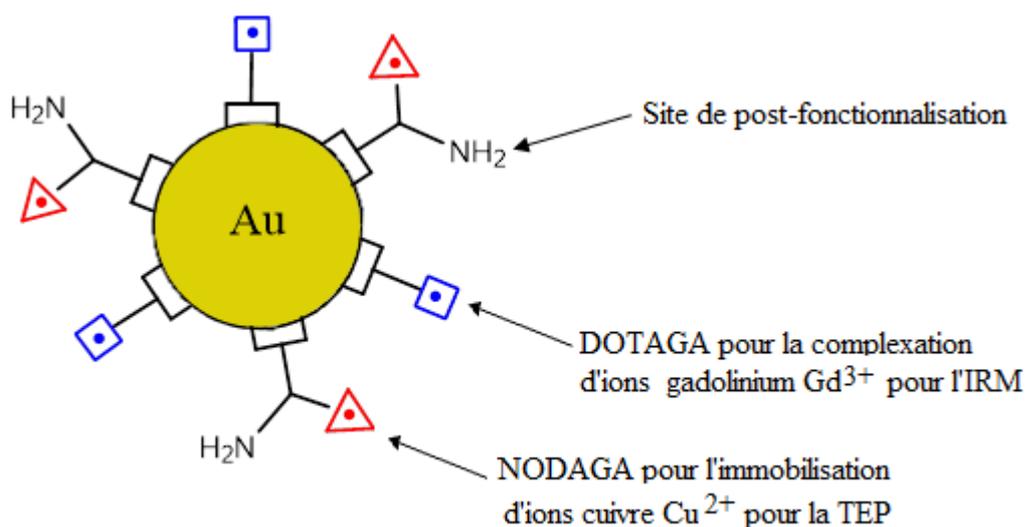


Figure 102 : Schéma de nanoparticules d'or Au@(**TADOTAGA**)_{20y}(**TANODAGA-Lys-NH₂**)_y) recouvertes par une couche mixte de différents chélateurs dont un chélateur trifonctionnel possédant une fonction amine primaire.

La production des nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs TADOTAGA et TA[NODAGA-lys-NH₂] présentera l'avantage d'immobiliser à la fois les ions gadolinium pour l'IRM, les ions cuivre-64 pour la TEP et de greffer,

par exemple, un peptide pour le ciblage actif. En d'autres termes, ce type de nanoparticules posséderait les caractéristiques pour l'imagerie simultanée IRM/TEP et ciblée.

L'ajout de NaBH_4 au mélange constitué par le sel d'or (HAuCl_4) et les deux chélateurs (TADOTAGA et TA[NODAGA-lys-NH₂]) produit une suspension noire qui est caractéristique de la formation des nanoparticules d'or par la méthode de Brust. Après purification par dialyse et ultrafiltration, les suspensions de nanoparticules d'or ont été caractérisées par UV-visible, TEM et par le potentiel zêta. Le spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{20y}\text{(TANODAGA-lys-NH}_2\text{)}_y$ présente l'allure caractéristique des suspensions composées de nanoparticules d'or dont le diamètre du cœur est inférieur à 3 nm : la bande plasmon n'est pas visible (Figure 103).

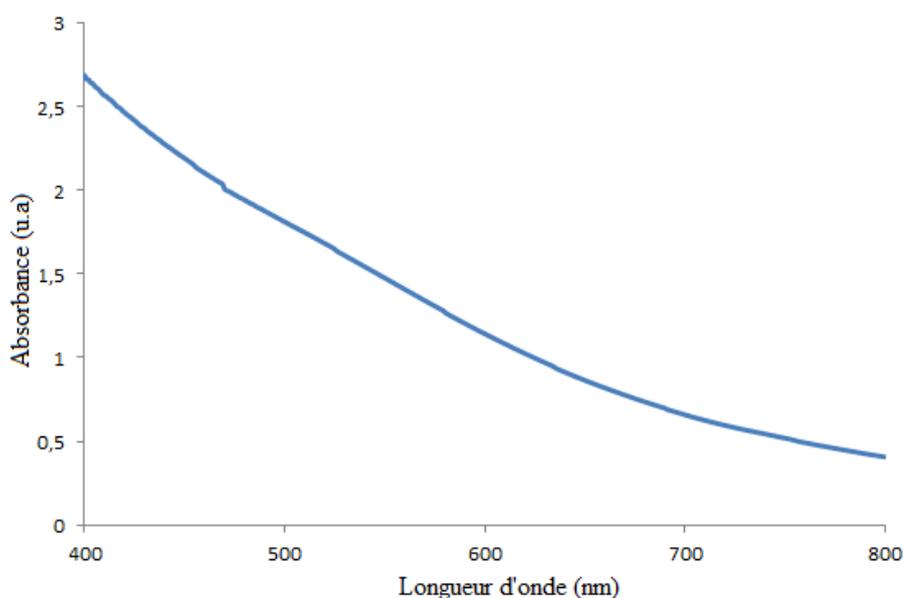


Figure 103: Spectre UV-visible d'une suspension de nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{20y}\text{(TANODAGA-lys-NH}_2\text{)}_y$

La MET apporte une confirmation à cette observation. La taille des cœurs révélée par l'analyse des clichés MET est de $2,36 \text{ nm} \pm 0,10 \text{ nm}$ (moyenne calculée à partir de 100 mesures sur clichés) (Figure 104).

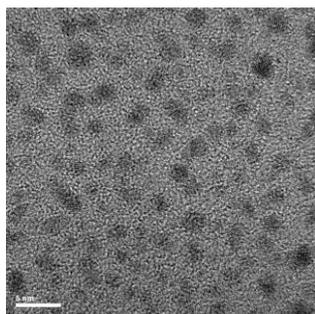


Figure 104: Cliché de MET des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{20y} (\text{TANODAGA-lys-NH}_2)_y$

La mesure du diamètre hydrodynamique atteste de la petite taille des nanoparticules d'or et de l'absence d'agglomération dans les suspensions aqueuses ($D_h = 7,23 \text{ nm} \pm 0,30 \text{ nm}$).

La stabilité colloïdale de ces nanoparticules est observée sur une large gamme de pH comme l'atteste la série de spectres d'absorption UV-visible enregistrés de pH 1 à 11 (Figure 105). Tous les spectres sont identiques et parfaitement superposés. L'absence de modification des spectres sur cette large gamme de pH suggère que ces suspensions ne présentent pas d'agglomération et sont donc très stables.

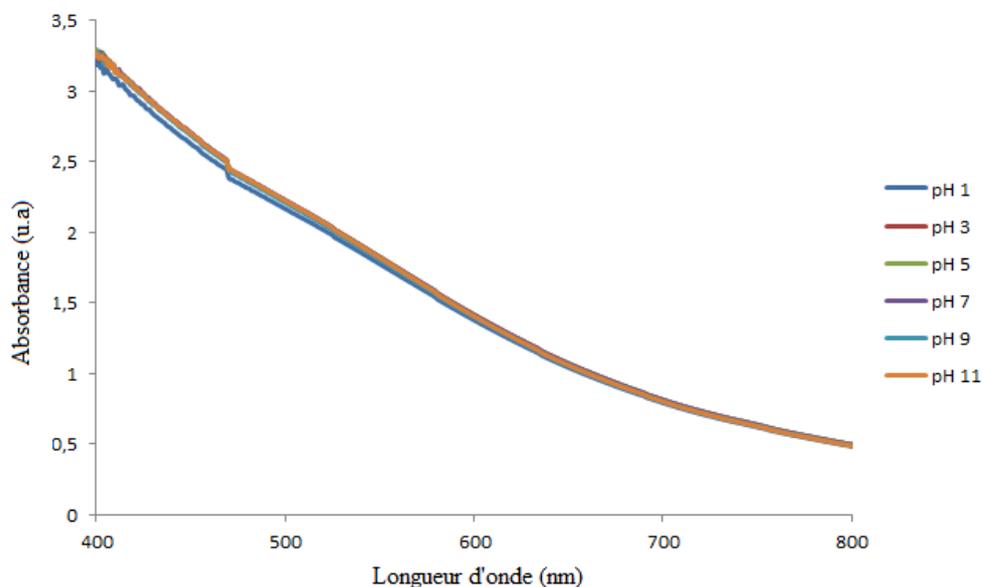


Figure 105: Spectres UV-visible de suspensions des nanoparticules d'or $\text{Au} @ (\text{TADOTAGA})_{20y} (\text{TANODAGA-lys-NH}_2)_y$ à différents pH.

Cette stabilité s'explique par la présence de charges positives (pour pH inférieur à 4) et négatives (pour pH supérieur à 4) à la surface des nanoparticules d'or (Figure 106).

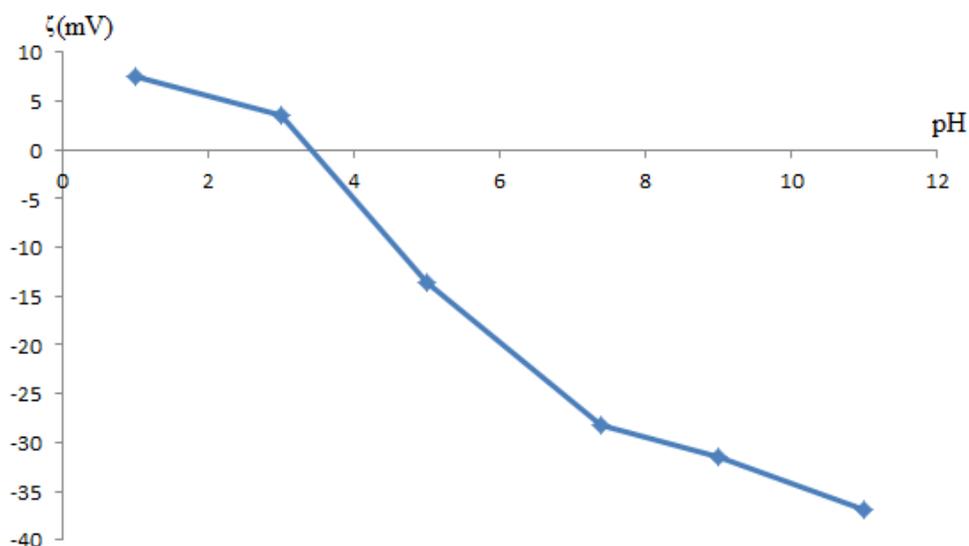


Figure 106: Potentiel zêta des nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{20\text{y}}\text{(TANODAGA-lys-NH}_2\text{)}_{\text{y}}$ à différents pH.

Comme cela a déjà été évoqué dans le cas des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des chélateurs de type DOTAGA et NODAGA, les charges positives résultent de la protonation des amines tertiaires des chélateurs et de l'amine primaire du chélateur trifonctionnel et les charges négatives sont celles des groupements carboxylates formées par la déprotonation des fonctions acide carboxylique. Nous pouvons noter que les suspensions aqueuses de $\text{Au}@\text{(TADOTAGA)}_{20\text{y}}\text{(TANODAGA-lys-NH}_2\text{)}_{\text{y}}$ sont caractérisées par un potentiel zêta très négatif à pH physiologique ($\zeta = -28,2$ mV à pH 7,4). Ces suspensions paraissent donc bien adaptées pour une application *in vivo*.

Si nous avons pu montrer qu'il était possible de synthétiser des nanoparticules d'or en partant d'un mélange de deux chélateurs (TADOTAGA et TA[NODAGA-lys-NH₂]), nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de ces deux types de molécules à la surface des nanoparticules d'or. Le moyen le plus simple pour révéler la présence des deux chélateurs consisterait à radiomarquer par le cuivre-64 les nanoparticules d'or $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_{20\text{y}}\text{(TANODAGA-lys-NH}_2\text{)}_{\text{y}}$.

3.5. Conclusion

Les plateformes moléculaires trifonctionnelles constituées d'une fonction d'ancrage (dérivé de l'acide thiooctique), d'un macrocycle pour immobiliser des ions d'intérêt pour l'imagerie (Gd^{3+} pour l'IRM, $^{111}In^{3+}$ pour la TEMP, $^{64}Cu^{2+}$, $^{68}Ga^{3+}$ pour la TEP) et d'une autre fonction pour l'imagerie bimodale simultanée (macrocycle), le ciblage actif (peptide EuK) ou pour la post-fonctionnalisation ($-NH_2$) sont extrêmement attrayantes pour préparer des nanoparticules d'or multifonctionnelles. L'exemple de TA[DOTAGA-lys-NODAGA] (Chapitre 2) a confirmé le potentiel de cette stratégie. La réduction d'un sel d'or en présence de TA[DOTAGA-lys-NODAGA] a fourni des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] qui après double marquage par les ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$ ont pu être suivies simultanément par IRM et par TEP sans relargage du cuivre. Le remplacement de TA[DOTAGA-lys-NODAGA] par TA[DOTAGA-lys-EuK], TA[DOTAGA-lys- NH_2], TA[NODAGA-lys- NH_2] ou un mélange de TADOTAGA et de TA[NODAGA-lys- NH_2] a permis la synthèse de nanoparticules d'or dont les caractérisations sont très proches de celles de Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA] : diamètre du cœur compris entre 2 et 3 nm, diamètre hydrodynamique inférieur à 10 nm, stabilité colloïdale à pH physiologique. Contrairement aux nanoparticules Au@TA[DOTAGA-lys-NODAGA], ces différentes nanoparticules d'or recouvertes par les plateformes moléculaires comportant un site d'ancrage, un macrocycle et un peptide pour le ciblage actif ou une fonction réactive (amine primaire $-NH_2$) pour le greffage post-synthétique d'un groupe de ciblage n'ont pas été testées *in vivo*. Cependant leurs caractéristiques semblent d'après les exemples décrites dans le chapitre 2 parfaitement adaptées pour des applications *in vivo*.

Références bibliographiques

- [1] H. H. W. Chen et M. T. Kuo, « Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges », *Oncotarget*, vol. 8, n° 37, p. 62742-62758, juin 2017.
- [2] J. Wang, H. Wang, et H. Qian, « Biological effects of radiation on cancer cells », *Mil. Med. Res.*, vol. 5, juin 2018.
- [3] Y. Liu *et al.*, « Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells », *Theranostics*, vol. 8, n° 7, p. 1824-1849, févr. 2018.
- [4] S. Shrestha, L. N. Cooper, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, et M. P. Antosh, « Gold Nanoparticles for Radiation Enhancement in Vivo », *Jacobs J. Radiat. Oncol.*, vol. 3, n° 1, avr. 2016.
- [5] Y. Nakamura, A. Mochida, P. L. Choyke, et H. Kobayashi, « Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? », *Bioconjug. Chem.*, vol. 27, n° 10, p. 2225-2238, oct. 2016.
- [6] K. G. Kallur *et al.*, « Clinical Utility of Gallium-68 PSMA PET/CT Scan for Prostate Cancer », *Indian J. Nucl. Med. IJNM Off. J. Soc. Nucl. Med. India*, vol. 32, n° 2, p. 110-117, 2017.

Conclusion générale

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la suite logique des travaux antérieurs de l'équipe NCM de l'institut UTINAM. Les travaux réalisés par Dr G. Laurent dans le cadre de sa thèse étaient consacrés à la synthèse de nanoparticules d'or (Au@TADOTAGA) pour des applications en radiothérapie guidée par imagerie. Le double marquage par les ions Gd^{3+} et $^{64}Cu^{2+}$ a ouvert la voie à l'imagerie simultanée IRM/TEP. Malgré les résultats encourageants obtenus avec ce type de nanoparticules, la TEP a mis en évidence un relargage massif de cuivre-64 après injection intraveineuse. Ce comportement est inadapté car il nuit à la fiabilité des données collectées par imagerie. Cette première expérience d'imagerie simultanée IRM/TEP a cependant été essentielle car elle a initié une réflexion sur l'architecture des nanoparticules d'or pour un suivi par imagerie IRM/TEP simultanée. Comme il n'y a pas de ligand universel, il a été proposé en concertation avec l'équipe du Pr Franck Denat (ICMUB) d'élaborer des nanoparticules d'or combinant l'IRM et la TEP en s'appuyant sur deux stratégies. La première stratégie consistait à réduire le sel d'or en présence de deux chélateurs différents, portant chacun un site d'ancrage (dérivé de l'acide thioctique comportant deux atomes de soufre pour assurer une immobilisation solide et durable de ces chélateurs à la surface des nanoparticules d'or) et un site de complexation des ions d'intérêt. Le choix du chélateur et du site de complexation dépend de la nature de l'application souhaitée. Nous avons ainsi développé deux couches mixtes de chélateurs différents pour l'imagerie IRM/TEP simultanée. La première couche mixte est composée du dérivé macrocyclique TADOTAGA pour immobiliser l'ion gadolinium pour l'IRM et du dérivé macrocyclique TANODAGA pour l'immobilisation des ions cuivre-64 pour la TEP tandis que dans la deuxième couche mixte, le dérivé macrocyclique TADOTAGA complexant l'ion gadolinium pour l'IRM a été associé à la molécule TADFO pour l'immobilisation des ions zirconium-89 pour la TEP.

La deuxième stratégie consistait à synthétiser des nanoparticules d'or recouvertes par des plateformes moléculaires TA[DOTAGA-lys-NODAGA] comportant un site d'ancrage (dérivé de l'acide thioctique) et deux macrocycles différents,

DOTAGA pour l'immobilisation des ions Gd^{3+} (IRM) et NODAGA pour le radiomarquage par les ions $^{64}Cu^{2+}$ (TEP).

Les différentes caractérisations physico-chimiques effectuées après synthèse ont montré que les nanoparticules d'or recouvertes par une couche mixte de chélateurs $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$, $Au@(TADOTAGA)_{10y}(TADFO)_y$ et $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y$ et par une couche unique de molécules comportant deux macrocycles différents $Au@TA[DOTAGA\text{-lys}\text{-NODAGA}]$ présentaient des caractéristiques semblables. Toutes ces nanoparticules possèdent un diamètre inférieur à 10 nm, un potentiel zêta négatif pour $pH > 4$ et une excellente stabilité colloïdale à pH physiologique (supérieure à au moins 3 mois). Malgré ces caractéristiques semblables, il a été constaté que la biodistribution après injection intraveineuse des nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_x(TADFO)_y$ avec ($x/y = 10$ et 2) était différente de celle des nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TANODAGA)_y$ et $Au@TA[DOTAGA\text{-Lys}\text{-NODAGA}]$. Au lieu d'observer une élimination rénale rapide, nous avons constaté d'après les images acquises par IRM/TEP simultanée, une forte accumulation des nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_{2y}(TADFO)_y$ dans le foie et les poumons. Ces observations ont également été confirmées par les analyses ICP des organes sacrifiés et le comptage gamma post-mortem réalisé 1h et 24h après l'injection intraveineuse. En augmentant le rapport molaire (x/y de 2 à 10), c'est-à-dire en diminuant la quantité de TADFO par rapport à TADOTAGA, le comportement des nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA)_{10y}(TADFO)_y$ après injection intraveineuse s'est révélé plus adapté à une application médicale. Une élimination rénale rapide et une moindre accumulation dans le foie, la rate et les poumons ont été observées. Le profil de la biodistribution des nanoparticules $Au@(TADOTAGA)_{10y}(TADFO)_y$ se rapproche de celui des nanoparticules ($Au@TADOTAGA(Gd \text{ ou } In)$) lorsque la quantité de TADFO diminue.

Pour les deux autres types de nanoparticules ($Au@TA[DOTAGA(Gd)\text{-lys}\text{-NODAGA}(^{64}Cu)]$ et $Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(^{64}Cu))_y$), la fusion des images acquises par IRM/TEP simultanée ont montré que les nanoparticules après injection intraveineuse circulaient librement sans accumulation indésirable dans les organes sains avant d'être éliminées par voie rénale. La présence des nanoparticules d'or $Au@(TADOTAGA(Gd))_{2y}(TANODAGA(^{64}Cu))_y$ et $Au@TA[DOTAGA(Gd)\text{-lys}\text{-NODAGA}(^{64}Cu)]$ dans les reins et la vessie ont été

confirmées par le comptage gamma et l'analyse ICP des organes des animaux sacrifiés 1h et 24h après l'injection intraveineuse. De plus, aucun relargage des ions cuivre-64 ni aucune accumulation indésirable n'ont été détectés avec ces deux types de nanoparticules $\text{Au}@\text{(TADOTAGA(Gd))}_2\text{(TANODAGA}^{64}\text{Cu)}_y$ et $\text{Au}@\text{TA[DOTAGA(Gd)-lys-NODAGA}^{64}\text{Cu]}$. Cela révèle le potentiel de ces nanoparticules d'or en tant qu'agent d'imagerie bimodale pour l'imagerie simultanée IRM/TEP.

Nous avons montré dans le cadre de cette thèse qu'il était possible de concevoir des sondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP à partir de cœurs d'or qui pourtant ne possèdent aucun des caractères requis pour l'IRM et pour la TEP. La synthèse en présence d'un mélange de chélateurs ou d'un seul type de molécules mais possédant deux sites de complexation différents a permis l'immobilisation sur la même nanoparticule d'ions gadolinium et d'ions émetteurs de positon (β^+) ($^{64}\text{Cu}^{2+}$, $^{89}\text{Zr}^{4+}$). La présence de ces ions confère à l'objet final un comportement à la fois d'agent de contraste pour l'IRM et de radiotracer pour la TEP. Ce suivi simultané par IRM et TEP est extrêmement intéressant dans le cadre du développement d'agents théranostiques dont l'activité thérapeutique peut être générée à la demande. Il offre une plus grande fiabilité des résultats collectés lors des études de biodistribution et de pharmacocinétique avec un nombre plus restreint d'animaux.

Parmi les molécules développées pour assurer un suivi des nanoparticules d'or par IRM/TEP, la plateforme $\text{TA[DOTAGA-lys-NODAGA]}$ est très prometteuse car les nanoparticules d'or dont la couche organique est composée de cette molécule trifonctionnelle présente le comportement le plus sain après injection intraveineuse (faible accumulation dans les tissus sains, élimination par voie rénale). Cette plateforme moléculaire a également retenu notre attention car la voie de synthèse qui a conduit à cette molécule peut être adaptée pour produire une large gamme de molécules trifonctionnelles. Ainsi nous avons pu synthétiser des nanoparticules d'or ($\text{Au}@\text{TA[DOTAGA-lys-NH}_2]$, $\text{Au}@\text{TA[NODAGA-lys-NH}_2]$ et $\text{Au}@\text{(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH}_2])$ comportant à leur surface des macrocycles de type DOTAGA ou NODAGA et des sites réactifs (fonctions amine primaire) pour la post-fonctionnalisation qui permet d'élargir la gamme d'application de ces nanoparticules d'or. Nous avons ainsi envisagé le greffage de groupes de ciblage afin de rendre l'accumulation des nanoparticules d'or dans les

zones d'intérêt plus sélective. L'intérêt de cette stratégie de synthèse réside dans la préservation des caractéristiques des macrocycles qui ne seront pas modifiés par le greffage des groupes de ciblage contrairement à la post-fonctionnalisation des nanoparticules Au@TADOTAGA. Afin d'éviter l'étape de post-fonctionnalisation, le groupe de ciblage peut être introduit dans la plateforme moléculaire avant la synthèse des nanoparticules d'or. Une telle stratégie a été validée avec TA[DOTAGA-lys-EuK] la réduction de sels d'or en sa présence a fourni des nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK] qui rassemblent à leur surface des sites de complexation des ions Gd^{3+} (DOTAGA) pour l'IRM et un peptide pour le ciblage de PSMA surexprimé dans le cas de certains cancers de la prostate.

Les caractérisations physico-chimiques de ces nanoparticules d'or Au@TA[DOTAGA-lys-EuK], Au@TA[DOTAGA-lys-NH₂], Au@TA[NODAGA-lys-NH₂] et Au@(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH₂]) ont montré que ces nanoparticules présentaient des caractéristiques physico-chimiques très proches ($2,2 \leq \varnothing_{MET} \leq 2,37$ nm; $5,26 \leq D_h \leq 7,23$ nm). En outre, les spectres UV-visible ont révélé que les nanoparticules d'or étaient stables sur une large gamme de pH et notamment en milieu physiologique (pH 7,4) par le biais de la répulsion électrostatique entre nanoparticules d'or qui d'après les mesures de potentiel zêta sont chargées négativement pour pH > 4.

Leur petite taille et leur stabilité colloïdale en milieu physiologique sont des atouts pour une application in vivo car elles sont adaptées à une élimination par la voie rénale qui constitue un prérequis pour l'injection intraveineuse de nanoparticules non-biodégradables. Chacune des particules recouvertes par une plateforme moléculaire trifonctionnelle ou par une couche mixte constituée d'un chélateur bifonctionnel et d'une plateforme trifonctionnelle possède au moins un type de chélateur (deux dans le cas des nanoparticules recouvertes d'une couche mixte Au@(TA[DOTAGA])(TA[NODAGA-lys-NH₂])). Il est alors possible d'immobiliser des ions d'intérêt pour l'IRM (DOTAGA(Gd)), la SPECT (DOTAGA(In)), la TEP (NODAGA⁶⁴(Cu ou ⁶⁸Ga)) ou pour l'imagerie IRM/TEP simultanée (couche mixte). En plus de ces caractéristiques attrayantes, la présence de la plateforme moléculaire trifonctionnelle (TA[DOTAGA-lys-EuK], TA[DOTAGA-lys-NH₂] et TA[NODAGA-lys-NH₂]) à la surface des nanoparticules permet d'introduire directement (TA[DOTAGA-lys-EuK]) ou

indirectement (c'est-à-dire après post-fonctionnalisation) un groupement pour le ciblage actif des zones d'intérêt (tumeur, plaques d'athérosclérose, plaques amyloïdes...).

Les nanoparticules d'or fonctionnalisées par une plateforme moléculaire trifonctionnelle (site de greffage, un ou deux macrocycles pour l'imagerie et/ou un groupement pour le ciblage actif) présente un fort potentiel pour exploiter les propriétés radiosensibilisantes des nanoparticules d'or. Cependant il reste à approfondir nos connaissances sur le comportement de ces nanoparticules après administration. En particulier, un meilleur contrôle de la pharmacocinétique et de la biodistribution constitue une priorité afin d'avancer vers l'application clinique de ces nanoparticules en tant qu'agent radiosensibilisant pour la radiothérapie guidée par l'imagerie (projet BIONANOCAR (I-site BFC)) ou en tant que nanosondes pour l'imagerie simultanée IRM/TEP mise au service de la détection précoce de plaques vulnérables d'athérosclérose (projet ANR CARGOLD).

Afin d'atteindre ces objectifs plusieurs voies sont en cours d'exploration :

- ✓ Greffage sur ou encapsulation dans des transporteurs biodégradables caractérisés par des temps de résidence vasculaire longs.
- ✓ Insertion de chaînes de PEG entre le site de greffage et les macrocycles.
- ✓ Post-fonctionnalisation ou utilisation de plateformes moléculaires avec des groupes de ciblage pour un ciblage actif.