



HAL
open science

Ciblage moléculaire de l'athérosclérose par des nanoparticules fonctionnalisées avec des anticorps humains : développement et applications d'un protocole d'IRM paramétrique chez le petit animal

Samuel Bonnet

► **To cite this version:**

Samuel Bonnet. Ciblage moléculaire de l'athérosclérose par des nanoparticules fonctionnalisées avec des anticorps humains : développement et applications d'un protocole d'IRM paramétrique chez le petit animal. Ingénierie biomédicale. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0436 . tel-03186294

HAL Id: tel-03186294

<https://theses.hal.science/tel-03186294>

Submitted on 31 Mar 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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences et Vie de la Santé

SPÉCIALITÉ : Bioimagerie

Par Samuel BONNET

**Ciblage moléculaire de l'athérosclérose par des nanoparticules
fonctionnalisées avec des anticorps humains : développement et
applications d'un protocole d'IRM paramétrique chez le petit animal**

Sous la direction de :

Gisèle CLOFENT-SANCHEZ et de Stéphane MORNET

Soutenue le 20 Décembre 2019

Membres du jury :

Mme BURTEA Carmen, Professeur Chargé de cours, Laboratoire de RMN et d'Imagerie Moléculaire, Mons	Rapporteur
Mme BERNARD Monique, DR CNRS, CRMBM, Marseille	Rapporteur
Mme SIGOVAN Monica, CR, Créatis, Lyon	Examineur
M. MIRAUX Sylvain, DR CNRS, CRMSB, Bordeaux	Président
Mme CLOFENT-SANCHEZ Gisèle, DR CNRS, CRMSB, Bordeaux	Directeur de thèse
M. MORNET Stéphane, DR CNRS, ICMCB, Bordeaux	Directeur de thèse
M. FRANCONI Jean-Michel, PU, Bordeaux	Invité

« ... la connaissance est une navigation dans un océan d'incertitudes à travers des archipels de certitudes. »

Edgard Morin – *Les sept savoirs nécessaires à l'éducation du futur* (1999)

« La connaissance progresse en intégrant en elle l'incertitude, non en l'exorcisant. »

Edgar Morin – *La Méthode* (1977)

Remerciements

Une thèse est une expérience à la fois scientifique mais aussi humaine. Cette section est pour moi l'occasion de remercier toutes celles et ceux qui m'ont soutenu dans mon travail.

Je voudrais remercier en premier lieu mes rapporteurs d'avoir accepté et pris le temps d'examiner mon manuscrit. Merci également à tous les membres du jury de leur intérêt pour ces travaux.

Un immense merci à mes deux encadrants, Gisèle Clofent-Sanchez et Stéphane Mornet, pour leur patience et leur soutien sans faille durant toutes ces années :

Merci pour vos nombreux conseils, votre grande disponibilité et générosité. Je pense ne jamais pouvoir vous remercier assez pour la bienveillance et l'aide précieuse que vous m'avez apporté durant tout ce travail, et en particulier durant la dernière ligne droite. Je reste admiratif de la confiance aveugle que vous avez su m'accorder en toute circonstance : alors même que mon travail s'éloignait progressivement de vos domaines d'expertises, vous m'avez toujours soutenu. Merci à vous deux d'avoir su accepter (voire comprendre) mon attirance pour l'IRM, la programmation et le traitement d'image, mais surtout mon obstination pour la maîtrise de la qualité des données. Vous avez chacun su endosser le rôle de directeur de thèse avec brio dans un sujet aussi complexe et multidisciplinaire que celui-ci. Merci à vous deux pour m'avoir donné assez de liberté pour gérer moi-même mon travail, tout en sachant m'aiguiller lorsque j'en avais besoin. Une mention spéciale, ou plutôt un grand bravo, pour votre exceptionnelle capacité à garder votre sang-froid face à quelqu'un de « têtue » ;-)

Parce qu'une thèse ne se fait jamais seul, je souhaite adresser mes prochains remerciements à toute l'équipe « Athérosclérose » du RMSB. Merci à Jeanny pour son soutien précieux durant toute ma thèse, travailler avec toi a été un vrai plaisir ! J'ai particulièrement apprécié ton efficacité et ta vision de la recherche. Merci aussi à Marie-Jo pour ton aide et ta bonne humeur communicative qui suffit à elle seule pour me laisser un excellent souvenir du labo. À Florence pour ces conseils pertinents. À Stéphane, merci pour ton aide, conseils et ton expertise avec les souris ainsi qu'à toutes les discussions diverses et variées qui me redonnaient une bouffée d'oxygène entre deux manips à l'IRM (et même pendant) ! À Coraline, merci pour ta patience, ton écoute et ta gentillesse, tu as su être présente lorsque j'en avais besoin. Et encore merci pour m'avoir accueilli si souvent au sein de ton bureau (des plaintes ?? ^^). Je te souhaite plein de courage jusqu'à la fin de ta thèse et pour la suite !! Enfin, je tiens à remercier vivement Cyril, sans qui ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est actuellement. Tu m'as formé à l'IRM et initié

à la programmation / traitement d'images, et avec du recul, il faut dire que c'était pas gagné ! Malgré tout, tu as réussi à me donner le goût pour ces domaines, je pense que tu peux en être fier ;-). Tu as été un pilier fort durant ma thèse et je tenais simplement à te remercier pour tout l'investissement personnel dont tu as fait preuve durant ta présence au labo.

Je voudrais adresser plus généralement des remerciements aux personnes du RMSB qui ont participé de près ou de loin à la bonne mise en œuvre de ma thèse. Merci au directeur Sylvain Miraux de m'avoir accueilli au sein du laboratoire durant ces trois ans. Je tiens aussi à remercier chaleureusement les RMNistes du labo qui m'ont accompagné : Jean-Michel Franconi, Philippe Massot, Aurélien Trotier, Marc Biran, et William Lefrancois pour leur expertise et leur vision plus externe au projet qui m'ont permis de creuser certaines idées durant ce travail. Un merci tout particulier à Jean-Michel et Aurélien pour les moments d'échanges fructueux durant ma dernière année de thèse et à William pour tes conseils *anti-stress* ;-). Aux informaticiens Henri Valeins et Karine Viaud, merci pour votre patience, vos sourires et toutes ces discussions intéressantes sur Python, la domotique ou autres... vous avez aussi participé indirectement à éveiller mon goût pour la programmation !

C'est avec émotions que j'aimerais dédier ces lignes à toute l'équipe de docs/post-docs du RMSB sans laquelle ma thèse aurait été totalement différente et surement moins drôle à vivre. Il faut dire qu'on a été nombreux à se côtoyer et je garderai en mémoire une ambiance saine, conviviale et fraternelle comme j'en ai rarement rencontré auparavant dans un laboratoire. Pour toutes ces raisons je tiens à remercier vivement chacune et chacun d'entre vous : Aimé, Thibaut, Coraline, Ursule, Colleen, Stéphane, Iñaki, Natacha, Laurence et Hélène.

Des remerciements spéciaux pour mes deux potos Jordy et Angélique :

- Jordy je t'ai toujours connu tel l'électron libre de la bande. Sans trop savoir pourquoi ni comment on s'est vite retrouvé (et je cite ta thèse) « comme deux dealers dans une cellule de sécu ou deux militaires dans un congrès de gauchistes, nous avons su aboutir à l'atteinte des objectifs du projet sans couper de virages ». Blague à part, mais t'as été le premier avec qui j'ai bien déliré et je voulais juste te remercier pour tous les moments forts passés ensemble, que ce soit au labo ou au Milo's ;-)
- Angélique merci à toi pour tous ces bons fous rires qui me rendront nostalgiques après mon départ. Voisine de bureau, compère de la première heure quand il s'agissait de manger (espèce de voleuse...) ou juste de péter un câble, on en a fait des heures à rallonges durant ces trois ans ! Merci pour tout ce que tu m'as apporté, merci aussi de

m'avoir soutenu/supporté dans les moments durs. Pour tous ces dabs qui vont me manquer, il ne me reste qu'une chose à dire, à la revoyure...*NEGA* ! ;-)

Parce qu'une part importante de mon travail s'est aussi effectuée au sein de l'ICMCB, j'ai évidemment une pensée amicale pour les principaux doctorants chimistes avec qui j'ai pu interagir : Clément, Elham, Hervé, Alex, Maxime, Maria. Merci à tous pour votre sympathie et ces bons moments passés ensemble. J'aimerais particulièrement remercier Clément et Elham pour leur aide dans mes manips, vous m'avez été d'un grand soutien au cours de ma thèse. Merci pour votre patience, votre disponibilité et pour votre accueil toujours chaleureux dans le « labo bio » !!

Then I would like to give a massive thank you guys to all the Melbourne team. To Christoph Hagemeyer and Michael de Veer for their trust and kindness. To all the team for being so friendly, helpful and patient : Karen, Be'eri, Ting, Shweta, Edwina, Akshita, Rania, Jackie, Natasha, Ole-Jakob. Thanks to Shweta for your patience while you taught me a lot about antibodies grafting. To Be'eri, my labtrip wouldn't have been so cool without your presence in the team. A massive thank you for your kindness and your good advises, I wish you all the best for your projects ! Thanks also to Gang Zeng for the labwork with the MRI. Thanks also to all the students and the group leaders of the ACBD for the parties into the College Lawn ! *Off-science* : I would like to thank Mark for all the climbing and mountaineering sessions shared with you during my Australian trip. Hope to see you soon (maybe one day in Chamonix !) ;-)

À mes amis de fac : Sofiane, Clément, Joaquim, les deux Maxime, Nguyen, Florian, Phan... Loin des yeux mais pas du cœur ! La réussite de cette thèse tient aussi en partie grâce à vous et votre soutien permanent depuis qu'on se connaît. À toutes les bières du Gainz' et les futures. Encore merci pour tout les mecs !

À ma famille. Je ne remercierai jamais assez mes proches d'avoir toujours su croire en moi et pour leurs encouragements même dans les moments de doutes. Merci à mes parents et ma sœur pour leur total soutien durant ces longues années d'études. Merci à eux d'avoir pu me donner toutes les chances de poursuivre ce que je souhaitais entreprendre, je vous dois d'être ce que je suis aujourd'hui.

Je souhaite enfin remercier celle qui a sûrement vécu ma thèse/mon stress aussi intensément que moi (si ce n'est parfois pire), au rythme des appels téléphoniques souvent tard le soir... Merci à Adélie pour ton soutien indéfectible et pour tout l'amour que tu me portes au quotidien. Une page se tourne enfin ! À nos années de vie à distance et tous les projets communs à venir.

Introduction	1
A. Les maladies cardiovasculaires :	1
1. Généralités :	1
B. Problématique :	3
C. Physiopathologie de l'athérosclérose	4
1. Formation de la plaque d'athérome :	4
a. Lésions non-pathologiques :	5
b. Lésions progressives (parfois symptomatiques) :	6
c. Lésions pathologiques (souvent symptomatiques) :	6
D. Diagnostic de la plaque d'athérome :	8
1. Evaluation des risques :	8
2. Prise en charge :	8
E. Imagerie de la plaque d'athérome :	9
1. Imagerie intravasculaire (invasive) :	9
a. Angio-scanner (Rayons X) :	9
b. Imagerie intravasculaire par ultra-sons (IVUS) :	9
c. Tomographie de cohérence optique (OCT) :	10
d. Imagerie de fluorescence proche infrarouge (NIRF) :	10
2. Imagerie non invasive de la plaque d'athérome :	11
a. Echographie :	12
b. Tomographie moléculaire par fluorescence (FMT) :	12
c. Computed Tomography (CT) :	12
d. Tomographie par émission monophotonique (TEMP) :	13
e. Tomographie par Emission de Positons (TEP) :	13
f. Imagerie par résonance magnétique (IRM) :	14
F. Notions d'IRM relatives au projet :	15
1. Phénomène de relaxation nucléaire :	15
2. Temps de relaxation T_1 et T_2 :	17
3. Temps de relaxation T_2^* :	17
4. Les agents de contraste :	18
G. Imagerie Moléculaire : ciblage de micro et de nano-objets	21
1. Imagerie moléculaire par IRM : Du ciblage passif vers le ciblage actif	22
a. Ciblage passif :	22
b. Ciblage actif :	23
H. Méthodes de greffage des anticorps	26
1. Thiol-Maleimide :	26
2. Greffage site-spécifique :	27
3. Sortase :	27
I. Evaluation de l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque d'athérome :	29
1. Imagerie qualitative (ou semi-quantitative) :	29
2. Imagerie quantitative du T_2^* :	30
J. Objectifs de cette thèse :	36
K. REFERENCES :	37

A. Production de l'agent de contraste ciblant : _____ **45**

1.	Nanoparticules multimodales :	45
a.	Supra-particules Colloïdales (SPC) :	45
i.	Synthèse des particules :	45
b.	Nanoflowers (NF) :	46
i.	Synthèse des particules :	46
ii.	Protocole synthèse des NF	47
iii.	Protocole d'encapsulation des NF par une couche de silice bi-fluorescente	48
	Modification de surface des NF avec l'acide citrique pour les stabiliser en milieu hydro-alcoolique basique :	48
	Synthèse des organosilanes fluorescents avec la Cy 7.5 et la Cy3 :	48
	Encapsulation des NF dans une couche de silice bi-fluorescente :	48
c.	Nanoparticules 2 nm (NP) :	49
iv.	Synthèse des particules :	49
d.	Modification de surface	50
	Protocole de modification de surface des SPC et des NF avec l'EDPS :	50
e.	PEGylation	51
f.	Préparation à la fonctionnalisation des SPC :	51
	Conjugaison de séquence d'acides aminés GGG sur les SPC@SiO ₂ :DF-PEG4k-NH ₂	51
g.	Caractérisation physico-chimique des particules :	53
i.	Mesures de taille :	53
ii.	Dosage de concentration :	55
iii.	Relaxométrie :	55
2.	Fragments d'anticorps recombinants (scFv) :	59
a.	H2.1-LPETG :	59
i.	Production :	59
ii.	Purification :	60
iii.	Caractérisation :	60
b.	SCE5-LPETG :	61
3.	Greffage des anticorps sur les particules	62
a.	Greffage site-spécifique (Melbourne) :	62
i.	Protocole de greffage :	62
ii.	Gels d'électrophorèse SDS-PAGE :	64
iii.	Cytométrie en flux :	64
	Étude de fixation non spécifique :	64
	Étude de fixation spécifique :	65
b.	Greffage avec fonctions ester de NHS – amines primaire (Bordeaux) :	66
i.	Protocole de greffage : (du SCE5 sur les nanoflowers uniquement)	66
ii.	Gels d'électrophorèse SDS-PAGE :	67
iii.	Étude de l'activité des Nanoflowers fonctionnalisés :	67
	Culture cellulaire :	67
	Cytométrie en Flux :	68

B. Acquisition des données IRM et méthode de post-traitement d'images : _____ **69**

1.	Modèle animal :	69
2.	Protocole d'imagerie	69
a.	Objectif :	69
b.	Généralités :	69

c.	Acquisition des données :	70
i.	Instrumentation :	70
ii.	Procédure d'acquisition :	71
iii.	Paramètres des séquences utilisées :	73
iv.	Séquence Multi-échos de gradients :	74
Principe :		74
Modules activés :		74
d.	Post-traitement des données :	79
i.	Reconstruction d'images :	79
ii.	Re-fenêtrage des images :	80
iii.	Correction de mouvement des images durant les temps d'écho :	80
iv.	Segmentation de la plaque d'athérome	82
v.	Mesure quantitative du T2* des voxels segmentés	85
a)	Méthode d'ajustement (fit) monoexponentiel classique :	85
b)	Méthode d'ajustement (fit) corrigé :	88
vi.	Temps de post-traitement :	94
3.	Évaluation et validation du protocole d'imagerie	95
a.	Généralités	95
b.	Démarche d'évaluation :	98
i.	Définir :	98
A)	Généralités	98
B)	Identification des facteurs d'incertitudes	98
C)	Développement d'un protocole expérimental	98
ii.	Mesurer :	100
A)	Protocole expérimental mis en œuvre	100
B)	Segmentation intra et inter-opérateur	102
C)	Temps de commutation des gradients	102
D)	Synthèse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (incertitude-type composée)	102
E)	Performance et robustesse de chaque méthode	102
iii.	Analyser :	104
A)	Étude quantitative de facteurs (effets principaux et effets d'interaction)	104
iv.	Innover et améliorer :	105
v.	Contrôler :	105
4.	Injection d'USPIO :	106
C.	REFERENCES :	108

Résultats **110**

A.	Production de l'agent de contraste ciblant :	110
1.	Nanoparticules multimodales	110
a.	Caractérisation des particules :	110
i.	Relaxométrie :	110
A)	SPC :	110
B)	Nanoflowers:	112
2.	Fragments d'anticorps recombinants (scFv)	113
a.	H2.1-LPETG	113
i.	Purification	113
ii.	Immunohistochimie	114
3.	Greffage des anticorps sur les particules	115
a.	Greffage site-spécifique (Melbourne)	115

i.	Mise au point _____	115
ii.	Etude de fixation non spécifique _____	117
iii.	Etude de fixation spécifique _____	119
b.	Greffage avec fonction NHS-amines primaires (Bordeaux) _____	121
i.	Mise au point _____	121
ii.	Etude de fixation spécifique des nanoflowers (NF) greffées avec le SCE5 _____	123
iii.	Rendements de greffages _____	125
B.	Acquisition des données IRM et méthode de post-traitement d'images : _____	126
1.	Evaluation et validation du protocole d'imagerie : _____	126
a.	DEFINITION DU PROCESSUS A EVALUER _____	127
i.	Généralités : _____	128
ii.	Identification des facteurs d'incertitudes : _____	130
iii.	Développement et mise en œuvre d'un protocole expérimental : _____	133
	ANALYSE DES CAUSES _____	133
	SYNTHESE DE L'ANALYSE _____	143
	CAHIER DES CHARGES ETABLI _____	144
b.	MESURES _____	146
i.	Protocole d'évaluation mis en œuvre : _____	147
ii.	Segmentations inter et intra-opérateur : _____	148
iii.	Temps de commutation des gradients : _____	149
iv.	Synthèse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (appelée incertitude-type composée) : 151	
v.	Performance et robustesse de chaque méthode : _____	153
c.	ANALYSE _____	157
i.	Etude quantitative de facteurs (effets principaux et effets d'interactions) : _____	158
	Effets principaux : _____	159
	Effets d'interaction : _____	161
2.	Injection in-vivo de particules (preuve de concept) : _____	162
a.	Nanoparticules de 2 nm _____	162
b.	Nanoflowers OH ou SCE5 _____	164
C.	REFERENCES : _____	167
	Discussion et perspectives : _____	168
A.	Nanoparticules d'oxyde de fer : _____	169
B.	Production des scFv et fonctionnalisation des USPIOs : _____	171
1.	Production des scFv : _____	171
2.	Greffage site-spécifique (Melbourne) : _____	172
3.	Greffage via la méthode ester de NHS-amines : _____	172
C.	Protocole d'imagerie : _____	174
D.	Cinétique d'accumulation des USPIOs au sein de la plaque : _____	177
E.	REFERENCES : _____	179
ANNEXES	_____	182

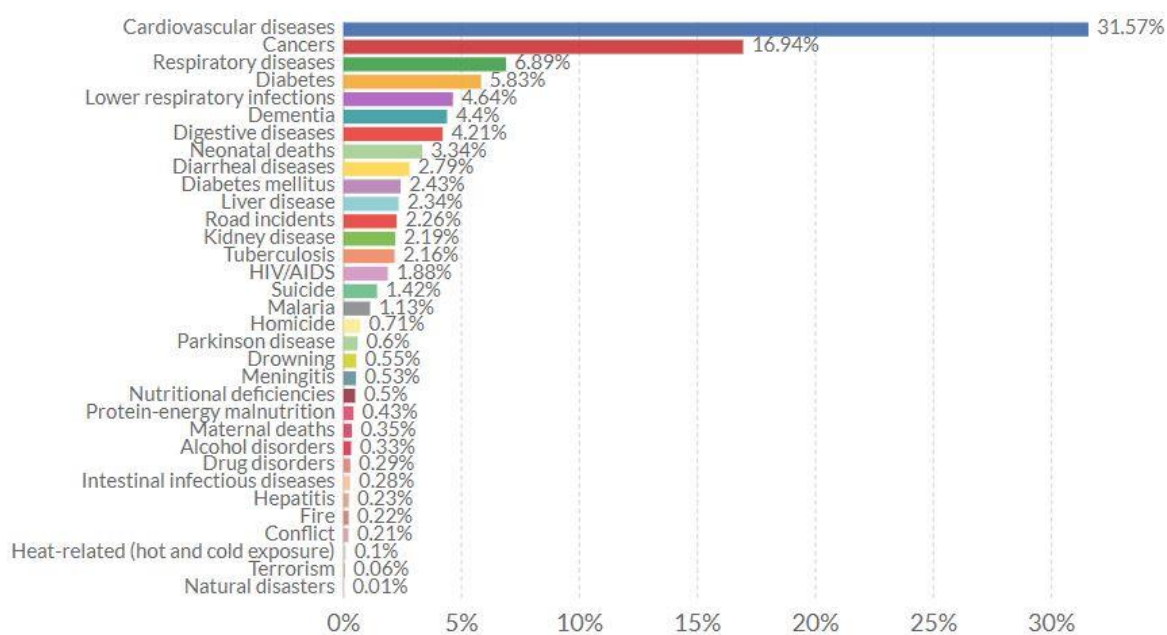
Introduction

A. Les maladies cardiovasculaires :

1. Généralités :

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, « les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, qui comprend les cardiopathies coronariennes (infarctus), les maladies cérébro-vasculaires (accidents vasculaires cérébraux), les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales, les malformations cardiaques congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires. »

Leurs estimations officielles ont fait état de 17,9 millions de personnes décédées des causes directes liées aux maladies cardio-vasculaires en 2016, soit environ 31% de la mortalité globale dans le monde (Figure 1).



Source: IHME, Global Burden of Disease

Figure 1: Taux de mortalités représentés par causes dans le monde en 2016. Les données font référence aux causes spécifiques de mortalité. Ces causes sont à distinguer des facteurs de risques comme la pollution de l'air, le régime alimentaire ou tout autre facteur lié au mode de vie. Chaque taux de mortalité est représenté en pourcentage de morts totales. Figure issue de l'Institute for Health Metric and Evaluation, <https://ourworldindata.org/causes-of-death>

La maladie coronarienne représente à elle seule, près de la moitié de la mortalité cardiovasculaire. Une des causes principales de maladie coronarienne est l'athérosclérose. Cette pathologie peut induire un défaut de vascularisation artérielle du myocarde et du cerveau. La diminution du flux sanguin est causée par à un épaissement pathologique de la paroi interne de l'aorte (plaque d'athérome sténosante) ou à un thrombus (plaque d'athérome rompue). L'obstruction de la lumière du vaisseau et la rupture de la plaque d'athérome sont à l'origine d'incidents dramatiques comme les infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC).

B. Problématique :

La plaque d'athérome peut être très vulnérable à certains endroits, c'est pourquoi la recherche s'est beaucoup orientée vers la compréhension des mécanismes conduisant à la fragilisation d'une plaque et à sa rupture. Les avancées scientifiques en matière d'imagerie médicale permettent d'élargir progressivement le champ de connaissance lié à ces mécanismes. Dans ce projet, l'objectif principal a été de proposer une méthode d'imagerie paramétrique par IRM tenant compte de plusieurs facteurs pouvant impacter l'analyse quantitative de la plaque d'athérome chez le petit animal.

Les travaux menés au cours de cette thèse portent sur le développement d'outils d'imagerie permettant la caractérisation pré-clinique de la plaque d'athérome chez le petit animal (protocole d'imagerie, agents de contraste ciblant). Le projet s'est placé à l'interface entre des domaines faisant appel à des notions de biologie, de chimie et d'imagerie médicale.

Dans cette première partie, les phénomènes biologiques liés à l'athérosclérose et les moyens mis en œuvre pour détecter son évolution seront introduits. La physiopathologie de l'athérosclérose sera présentée ainsi que des processus biologiques impliqués dans l'initiation et l'évolution de la maladie. L'attention sera ensuite portée sur les méthodes d'imagerie invasive et non invasive qui sont actuellement utilisées en clinique et en recherche.

La suite de l'introduction abordera plus en détail les principales notions d'IRM qui seront utilisées au cours de ce travail, notamment la notion de T2* et d'agents de contraste superparamagnétique (USPIOs). Le concept d'imagerie moléculaire appliquée aux USPIOs (ciblage passif et actif) sera présenté et une brève partie sera dédiée à l'explication des différentes voies de greffage d'anticorps sur des particules.

L'introduction se terminera par une revue succincte de la littérature traitant des différentes méthodes permettant d'évaluer l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque d'athérome.

Les objectifs de ce projet seront finalement résumés à la fin de l'introduction.

C. Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique de la paroi artérielle. Cette pathologie est associée au vieillissement ainsi qu'à d'autres facteurs de risques tels que tabagisme, l'obésité, la sédentarité et l'abus d'alcool, l'hypertension, le diabète ou encore l'hyperlipidémie. ([https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) consulté en 10/2019)

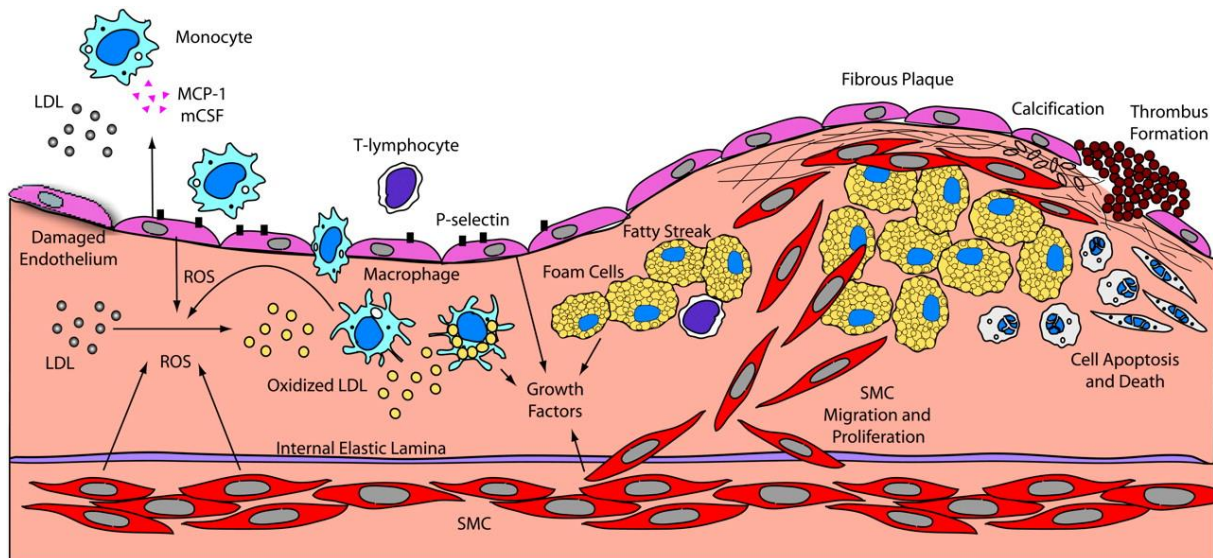
Cette maladie chronique est cliniquement silencieuse pendant une grande partie de sa progression, et pouvant être responsable de complications soudaines. Les patients atteints d'athérosclérose souffrent généralement de céphalées, vertiges, d'essoufflement et d'angine de poitrine.

La maladie se caractérise par des dépôts de plaques principalement composées de lipides et de cellules inflammatoires au niveau de la paroi internes des artères. Le volume de la plaque évolue de façon croissante avec le temps et peut perturber localement le flux sanguin (phénomène de sténose partielle). Cependant les plus graves complications de l'athérosclérose sont liées à la vulnérabilité de la plaque. En effet la plaque peut se rompre à tout moment et entraîner la formation de caillot (thrombus) bloquant par la suite le flux sanguin dans les artères. Cet événement est généralement à l'origine d'accidents vasculaires graves voire mortels, comme l'infarctus du myocarde ou l'AVC.

1. Formation de la plaque d'athérome :

La formation de la plaque d'athérome dépend de l'équilibre entre les apports alimentaires en cholestérol, son taux circulant et son élimination.

Le cholestérol présent dans les lipoprotéines circulantes de type LDL (LDL-c) peut s'accumuler de façon locale, créant des lésions non pathologiques, progressives puis symptomatiques.



**Figure 2: Développement de l'athérosclérose. Figure issue de Madamanchi et al.,
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. (1)**

a. Lésions non-pathologiques :

Dès l'enfance ou l'adolescence, des lésions superficielles non-pathologiques de la paroi des artères se développent sous l'influence du stress hémodynamique local présent au niveau des zones de jonction des artères.

Plus tardivement, des lipoprotéines de bas poids moléculaire (LDL) s'accumulent à la surface de l'endothélium vasculaire provoquant le recrutement, l'activation et la différenciation des monocytes en macrophages. Les LDL sont oxydés progressivement durant leur métabolisation. Ces LDL oxydés sont eux-mêmes reconnus par les récepteurs scavengers des macrophages qui tentent de les éliminer par phagocytose. (2) L'excès de cholestérol dans les macrophages induit leur dégénérescence, ce qui aboutit à la formation de cellules spumeuses. Les cellules endothéliales activées expriment la P-selectine à leur surface. La P-selectine active le recrutement de nouveaux monocytes et provoque dans un même temps l'accumulation sub-endothéliale des cellules spumeuses (3). Les plaquettes expriment aussi des récepteurs d'adhésion tels que la P-selectine ou l' α IIb β 3. Ces récepteurs jouent un rôle dans la liaison des LDL oxydés et dans le recrutement de leucocytes au niveau de la paroi endothéliale (4, 5). Des lésions en formation appelées « stries spumeuses » sont alors en phase de développement.

b. Lésions progressives (parfois symptomatiques) :

La pathologie progresse ensuite de façon chronique, engendrée par la combinaison d'un surplus sanguin de LDL et d'une augmentation de l'activation du système inflammatoire au sein de la paroi vasculaire.

Les LDL s'accumulent dans le cytoplasme des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, ainsi que dans la matrice extra-cellulaire de la plaque. L'accumulation des LDL dans cet environnement provoque une réaction inflammatoire marquée par la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires par les cellules musculaires et les macrophages. Cette production de cytokines intensifie le recrutement de monocytes, lymphocytes B et T, polynucléaires neutrophiles, granulocytes et de cellules dendritiques au sein de la paroi artérielle. Ce recrutement peut être favorisé par la formation de complexes avec les plaquettes (6, 7). Les cellules musculaires lisses migrent alors dans une matrice riche en protéoglycane, ce qui entraîne un épaissement pathologique de la paroi artérielle. Dans un même temps, les cellules spumeuses continuent de s'accumuler de façon croissante.

La matrice extracellulaire (protéoglycane), sécrétée par les cellules musculaires lisses, contribue à l'accumulation extracellulaire des lipides. Les lipides extracellulaires peuvent se regrouper au sein de foyers lipidiques qui entraînent alors des nécroses cellulaires. Le tissu nécrotique et les lipides oxydés forment ensemble des foyers nécrotiques riches en lipides dans l'intima des artères. L'architecture initiale de l'intima est progressivement dégradée. Un tissu fibreux est construit au-dessus du foyer nécrotique par les cellules musculaires lisses, au niveau de la lumière artérielle. Ces remodelages tissulaires forment alors une « chape fibreuse » (4). L'ensemble [stries spumeuses + chape fibreuse] est appelé « plaque d'athérome ».

c. Lésions pathologiques (souvent symptomatiques) :

Une chape fibreuse fine (TFCA : Thin-cap fibro-atheroma) est généralement rencontrée chez les patients de plus de 55 ans. Cette chape fibreuse fine est typique des plaques d'athérome à risque de rupture : elle est le résultat d'un affaiblissement local par l'activité d'enzymes protéolytiques. Le nombre de foyers nécrotiques est à ce stade devenu tellement important, que de larges zones hypoxiques sont présentes. Une néovascularisation locale apparaît alors en réaction compensatoire au phénomène d'ischémie rencontré. Cette zone de néovascularisation est communément appelée « vasa vasorum » (8). Le vasa vasorum facilite l'infiltration locale de cellules immunitaires. De plus des zones hémorragiques intra-plaque peuvent apparaître car le vasa vasorum est un réseau fragile de néo-vaisseaux sanguins. Ces foyers hémorragiques

induisent l'accumulation d'érythrocytes, de cholestérol libre et d'hémoglobine. Ces accumulations peuvent provoquer des déstabilisations de la plaque, qui peut alors rompre. (9, 10)

Lorsque le cœur lipidique thrombogénique est exposé à la lumière artérielle, les plaquettes et la cascade de coagulation s'activent. Ceci provoque un thrombus massif qui peut s'étendre dans la lumière artérielle et peut être la cause principale d'événements potentiellement mortels comme des syndromes coronariens aigus (infarctus du myocarde) ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC).

De façon alternative, la chape fibreuse rompue peut se résorber progressivement par reformation d'un tissu fibreux et rester totalement asymptomatique. Lorsque cet événement a lieu, plusieurs couches de tissus cicatriciels épaississent la paroi vasculaire : le risque principal est alors une sténose de la lumière artérielle. Une sténose importante réduit l'apport d'oxygène nécessaire au bon fonctionnement de certains tissus (phénomène d'ischémie). Lorsque ce phénomène a lieu au niveau des artères coronaires, des symptômes de type crises d'angor peuvent apparaître de façon chronique. Cette pathologie doit alors être surveillée régulièrement et peut parfois nécessiter une reperfusion par voie chirurgicale (4, 11).

Un processus de calcification a lieu tout au long de ces étapes. Ces calcifications rigidifient les artères et sont des facteurs participants au risque de thrombose.

D. Diagnostic de la plaque d'athérome :

1. Evaluation des risques :

L'évaluation de risque d'être atteint de maladies cardiovasculaires peut être effectuée pour un individu, sur les bases de données épidémiologiques fournissant une évaluation du risque cardiovasculaires à 10 ans. Les facteurs de risques individuels sont pondérés afin de calculer un score de risque. Cette approche permet de classer les personnes au sein de groupes de faible (< 10 %), intermédiaire (< 20 %) et de haut risque cardiovasculaire.

Il existe deux types de scores :

- Le score de Framingham (12) (le plus utilisé dans le monde) permet d'évaluer le risque coronarien global (événements mortels ou non) à 10 ans. Il tient compte de l'âge, du sexe, du taux de cholestérol total, du taux de HDL, de l'existence d'un diabète, du tabagisme, et de la pression artérielle systolique). Un score supérieur à 20% est considéré comme étant un haut risque cardio-vasculaire.
- Le score SCORE (13) (pour Systemic Coronary Risk Estimation) est une alternative européenne qui tient compte, en plus des autres facteurs, des disparités géographiques des patients. Ce score permet d'évaluer le risque de décès d'origine cardio-vasculaire à 10 ans. Un score supérieur à 15% est considéré comme étant un très haut risque cardio-vasculaire.

2. Prise en charge :

L'évaluation initiale des risques cardiovasculaires chez les patients prédisposés est basée sur les scores décrits précédemment et reste la première étape permettant d'établir un diagnostic. Lorsque le niveau de risque est élevé, la prise en charge de l'athérosclérose passe, en première intention, par des mesures hygiéno-diététiques. Des bilans lipidiques réguliers permettent la surveillance de l'évolution de la maladie. Un traitement hypocholestérolémiant est indiqué lorsque les mesures hygiéno-diététiques ne suffisent pas à stabiliser les constantes biologiques après 6 mois. Le traitement de dernière intention est la chirurgie, une exérèse de la plaque afin de permettre la revascularisation du ou des organes ischémiés.

Il a été vu que la surveillance de l'athérosclérose peut se faire par des analyses biologiques en première intention. Cependant, les techniques d'imagerie médicales sont aussi très souvent

employées pour appuyer le premier diagnostic et effectuer un suivi longitudinal du degré de sténose de (ou des) plaque(s) d'athérome.

Ces techniques seront détaillées dans la partie qui suit.

E. Imagerie de la plaque d'athérome :

1. Imagerie intravasculaire (invasive) :

L'imagerie intravasculaire a contribué à une meilleure compréhension de l'athérosclérose chez l'homme ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies applicables en clinique (14). Ces modalités d'imagerie sont des techniques invasives qui impliquent nécessairement l'introduction d'un cathéter à l'intérieur du réseau vasculaire. L'imagerie intravasculaire permet d'observer le volume de plaque, la présence de chape fibreuse, le remodelage tissulaire et le foyer nécrotique riche en lipides. Ces techniques chirurgicales, non sans risques, ne sont utilisées en bloc opératoire que sur des patients présentant un stade avancé d'athérosclérose (après un premier épisode ischémique par exemple).

a. Angio-scanner (Rayons X) :

L'angio-scanner est une technique qui requiert l'injection in-situ d'un agent de contraste radio-opaque, généralement à base d'iode, tout en monitorant le réseau vasculaire sous rayon X. Cette technique reste la référence pour déterminer le degré de sévérité d'obstruction d'une coronaire et est particulièrement adaptée pour observer la revascularisation (15). Bien que cette modalité d'imagerie puisse mettre en évidence des zones ischémiées, des résultats décevants concernant le bénéfice de prévention des infarctus du myocarde ou la prolongation de l'espérance de vie des patients ont été rapportés (16). De plus, cette technique n'est informative que sur la sténose luminale, et deux tiers des syndrome coronariens aigus sont dus à des zones de remodelage tissulaires non visibles en angiographie (17).

b. Imagerie intravasculaire par ultra-sons (IVUS) :

L'imagerie intravasculaire par ultra-sons (IVUS) a été l'une des premières techniques utilisées pour analyser les détails morphologiques de la plaque et, à moindre échelle, sa composition (18). L'IVUS est une technique employant le principe de l'échographie, qui repose sur le

différentiel de fréquence entre des ondes réfléchies in-situ, et qui permet de visualiser des images en direct. La résolution spatiale de l'IVUS se situe globalement autour de 100-200 μm , même si des résolutions plus faibles ont déjà été atteintes en modifiant la fréquence du transducteur électro-acoustique (19). Son excellent pouvoir de pénétration (4-8 mm) comparé aux autres modalités d'imagerie intravasculaire en a fait une technique très adaptée pour déterminer la morphologie des parois artérielles (20), du volume de plaque (21) et des calcifications (22). Des études longitudinales chez l'homme ont montré que la morphologie de la plaque se modifiait au cours des mois : la chape fibreuse fine (TFCA) se transforme en chape fibreuse épaisse ou en plaque fibreuse, présumément de façon secondaire à une rupture de plaque ou après résorption (23, 24).

c. Tomographie de cohérence optique (OCT) :

L'OCT est une technique invasive basée sur un principe proche de celui de l'IVUS, excepté qu'au lieu d'utiliser des ondes sonores, il est ici question de rayonnements proche infrarouge transmis in-situ (25). Le pouvoir de pénétration de cette modalité d'imagerie est moyen (2-3 mm) mais cette technique génère des images à très hautes résolutions spatiales (10-15 μm) des artères coronaires. Une injection de solution saline est nécessaire pour éliminer le sang durant l'acquisition des images. La résolution élevée et le fort contraste généré entre chaque constituant des tissus permettent une évaluation détaillée des structures, tout en étant capable de pénétrer au sein des tissus très calcifiés. Ceci fait de l'OCT un outil prometteur pour le diagnostic intravasculaire, même si le pouvoir de pénétration moyen (comparé à l'IVUS) fournit moins d'informations sur le volume de plaque (26). En clinique, cette méthode a été utilisée pour confirmer la nature dynamique de la maladie athérosclérotique. Il a été démontré que les plaques à chape fibreuse fine (TFCA), à différentes étapes de développement, étaient fortement prévalentes chez les patients atteints de maladie coronarienne. (27).

d. Imagerie de fluorescence proche infrarouge (NIRF) :

Le NIRF est une modalité d'imagerie émergente ayant pour objectif d'améliorer la compréhension de la biologie interne de la plaque. L'imagerie de fluorescence infrarouge est caractérisée par l'émission de rayonnements de longueurs d'ondes comprises dans les fenêtres 700-900 nm pour le NIR-I et 1000-1700 nm pour le NIR-II (28). Ces rayonnements de basse énergie aux longueurs d'ondes élevées présentent l'avantage d'améliorer le pouvoir de pénétration (grâce à une absorption photons-tissus moindre comparé à des longueurs d'onde

plus faibles) et de réduire la fluorescence endogène détectable (auto-fluorescence). En somme, cette technique apporte une amélioration du rapport signal/bruit, ce qui peut être un avantage certain pour l'imagerie moléculaire.

2. Imagerie non invasive de la plaque d'athérome :

L'imagerie non-invasive ne nécessite pas d'hospitalisation du patient et présente moins de risques que les méthodes détaillées précédemment. Les méthodes non-invasives peuvent permettre un suivi longitudinal de la maladie qui assure une amélioration de la prise en charge de chaque patient, dans un but de prévention contre d'éventuelles complications. L'échographie, l'imagerie nucléaire et l'IRM sont des exemples de techniques non-invasives qui sont souvent utilisées pour évaluer l'athérosclérose *in vivo*. Les principales modalités d'imagerie et leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 1.

		Echographie	Computarized Tomography (CT)	Tomographie par émission monophotonique (TEMP)	Tomographie par Emission de Positons (TEP)	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)
Radiations utilisées		Ultrasons	Rayons X	Basse énergie : Rayons γ	Haute énergie : Rayons γ	Ondes radiofréquences
Résolution spatiale		250 – 500 μm	50-200 μm	1-2 mm	1-2 mm	25 – 100 μm
Résolution temporelle		Temps réel	Minutes	Minutes	10s à minutes	Minutes à heure
Sensibilité		Non évaluée	Non évaluée	$10^{-10} - 10^{-11}$ M	$10^{-11} - 10^{-12}$ M	$10^{-3} - 10^{-5}$ M
Quantité d'agent de contraste utilisé		Microgramme à nanogrammes	-	Nanogrammes	Nanogrammes	Microgramme à nanogrammes
Résumé	+	Imagerie anatomique en temps réel, Faible coût	Très adapté pour l'imagerie des os et des tumeurs	Nombre de radiotraceurs élevés	Sensible, quantitatif	Résolution spatiale la plus élevée, imagerie anatomique et fonctionnelle
	-	Résolution spatiale moyenne	Rayonnements ionisants, moins adapté pour les tissus mous	Rayonnements ionisants, faible résolution spatiale	Rayonnements ionisants, cyclotron nécessaire, faible résolution spatiale	Sensibilité basse, faible résolution temporelle

Tableau 1: Comparaison des différentes modalités d'imageries non-invasives. Tableau adapté de la thèse de M. Larivière (2016) (29)

a. Echographie :

Le principe de fonctionnement a déjà été expliqué brièvement dans la partie IVUS. Cette technique peut être utilisée de façon non-invasive pour évaluer le degré de sténose induit par la plaque d'athérome au niveau des artères carotides. Les principaux avantages de cette technique sont le faible coût de l'examen, l'absence de rayons ionisants et la capacité d'effectuer des images en temps réel. Cependant, la résolution spatiale moyenne et la procédure d'examen (opérateur dépendant) rendent parfois difficiles l'interprétation des résultats pour un suivi longitudinal (30).

b. Tomographie moléculaire par fluorescence (FMT) :

Cette modalité d'imagerie est basée sur les propriétés des rayonnements proche infrarouge (NIRF) et peut être utilisée de manière non-invasive chez le petit animal. L'utilisation couplée du FMT avec d'autres modalités d'imageries à fortes résolutions spatiales permet d'effectuer des études de co-localisation des marqueurs multimodaux injectés grâce à leurs signaux respectifs émis (31).

c. Computed Tomography (CT) :

Le CT-scan est une méthode radiographique utilisant des rayons X et qui génère des images 3D à partir d'une multitude de coupes en 2D. Le contraste est basé sur les différences de densité propres à chaque tissu. En imagerie cardio-vasculaire, le CT-scan est principalement utilisée pour évaluer la calcification de la plaque des artères coronaires (30). Une modalité récente, le CT-scan multi-détecteurs à contraste amélioré (MDCT), peut aider à caractériser différents composants des plaques athérosclérotiques (plaques lipidiques, fibreuses et calcifiées), bien que l'absence générale de contraste des tissus mous rende la visualisation des détails difficile. En plus de la nécessité d'exposition aux rayonnements ionisants pour effectuer des images, cela rend cette modalité inappropriée pour le dépistage et le suivi des patients non symptomatiques (30). Elle est toutefois largement utilisée en combinaison avec d'autres méthodes telles que la tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou la tomographie par émission de positrons (TEP), pour associer des informations anatomiques et métaboliques.

d. Tomographie par émission monophotonique (TEMP) :

La TEMP est une technique qui nécessite l'injection d'un traceur radioactif qui émet des rayons γ . La détection des rayonnements est assurée par une gamma-caméra qui tourne autour du patient. Le signal acquis provenant de l'activité radioactive du marqueur au sein de l'organisme est visible après reconstruction tomographique de cartographies en 3D. La distribution du traceur dans l'organisme est alors mise en évidence. Les principaux avantages de cette technique sont la gamme étendue de radiopharmaceutiques disponibles et sa sensibilité. Comme le scan-CT, le principal inconvénient est la nécessité d'utiliser des rayonnements ionisants. Cette modalité reste donc peu appropriée pour un suivi longitudinal chez les patients non-symptomatiques. Elle est également peu résolutive.

e. Tomographie par Emission de Positons (TEP) :

La TEP est une technique qui, comme le TEMP, nécessite l'injection d'un radiotracer. A la différence du TEMP, le radiotracer est ici un agent émetteur de positons (émetteur β^+). Ces positons, en interagissant avec les électrons du milieu, donnent naissance à une paire de photons γ qui sont détectés simultanément par des gamma-caméras encerclant le patient. C'est cette détection simultanée qui permet de localiser la source du rayonnement dans l'organisme et d'évaluer la biodistribution de l'agent injecté.

La TEP est la méthode d'imagerie non invasive la plus couramment utilisée pour détecter des processus physiologiques et pathologiques in vivo avec des radionucléides tels que le ^{11}C , le ^{13}N , le ^{15}O et le ^{18}F . Sa sensibilité et sa résolution sont respectivement de l'ordre du picomolaire et du millimètre. Le traceur le plus couramment utilisé est le [^{18}F] -2-désoxy-2-fluoro-d-glucose (^{18}F -FDG). C'est un analogue du glucose émetteur β^+ qui a été initialement utilisé comme marqueur métabolique dans le diagnostic du cancer. Son mécanisme d'action repose sur le cycle de métabolisation du glucose endogène. Lors de l'internalisation via des transporteurs de glucose, le FDG subit une phosphorylation par l'hexokinase en FDG-6-phosphate. Cependant, à la différence du glucose-6-phosphate, le FDG-6-phosphate ne subit pas de métabolisme supplémentaire et s'accumule de manière irréversible dans la cellule, créant ainsi un contraste au niveau des zones métaboliquement actives. Outre l'absorption du glucose (32-36), de nombreuses autres voies métaboliques ont été étudiées dans le cadre de l'athérosclérose : métabolisme du mannose (37), calcification (38-42), prolifération (43), activité protéasique (44-46).

f. Imagerie par résonance magnétique (IRM) :

L'IRM est une technique basée sur la captation du signal de résonance magnétique des protons des atomes (généralement d'hydrogène) qui se comportent individuellement comme des aimants lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique externe B_0 . Le vecteur d'aimantation de chaque proton s'oriente dans la direction de B_0 . Les protons, sous la contrainte directionnelle imposée par le champ magnétique, acquiert un mouvement de précession. Lorsqu'une impulsion d'onde de radiofréquence (à la fréquence de Larmor) est générée, les spins adoptent une composante orthogonale par rapport à B_0 . Le signal capté en IRM est alors issu du phénomène de relaxation nucléaire des spins, qui apparait dès la fin de l'impulsion RF.

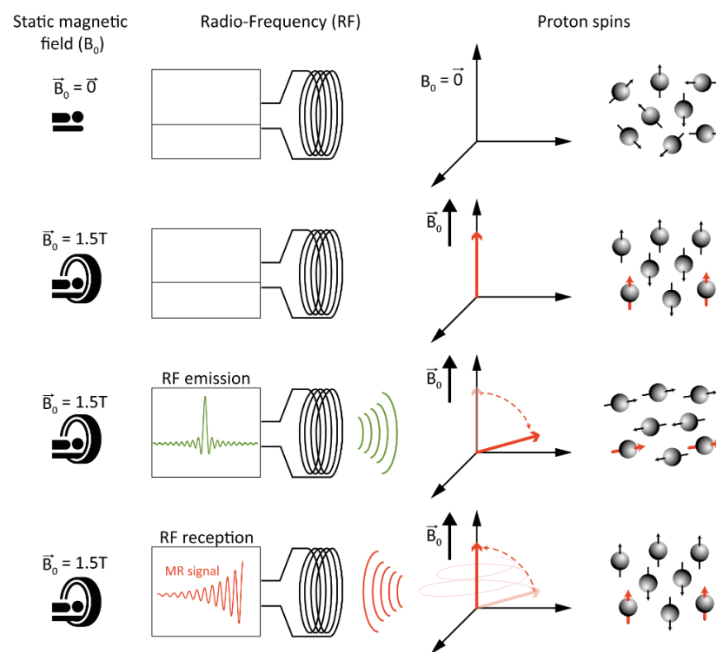


Figure 3: Principe de base de l'IRM. Figure issue de Larivière M. (2016) (29)

Une des plus grandes forces de l'IRM est la possibilité d'adapter différents protocoles d'imagerie (en fonction des paramètres de séquences choisis) afin d'améliorer le contraste. L'IRM est une modalité d'imagerie qui, comparée aux autres techniques, présente une excellente résolution spatiale. Cette technique d'imagerie est particulièrement appropriée pour l'étude *in vivo* de gros vaisseaux tels que l'aorte, les artères carotides ou fémorales (47). Les principaux inconvénients de l'IRM sont en revanche sa sensibilité et sa résolution temporelle. Le problème de sensibilité peut en revanche être résolu artificiellement grâce à l'utilisation d'agents de contraste. Il convient de noter ici que, contrairement à la tomodensitométrie ou à la TEMP et TEP, l'IRM fournit une imagerie sans rayonnement ionisant, ce qui la rend très appropriée pour des études cliniques répétitives / longitudinales. Pour toutes ces raisons, l'IRM est la technique d'imagerie qui a été utilisée durant ces travaux.

F. Notions d'IRM relatives au projet :

1. Phénomène de relaxation nucléaire :

En IRM, le phénomène de relaxation nucléaire fait référence à la façon dont varie le signal de résonance magnétique durant le temps. Il a été vu précédemment qu'une aimantation apparaissait suite à l'interaction d'un ensemble de spin avec un champ B_0 . Cette aimantation M peut être séparée en deux composantes : une composante longitudinale M_z (parallèle à B_0), et une composante transversale M_{xy} (perpendiculaire à B_0). La composante transversale M_{xy} adopte un mouvement de précession autour de l'axe z avec une vitesse angulaire ω_0 (aussi appelée pulsation de Larmor) proportionnelle à l'intensité du champ magnétique B_0 . La vitesse de précession peut être calculée selon l'égalité $\omega_0 = \gamma B_0$, γ correspondant au rapport gyromagnétique du proton. Le signal capté fait suite à une impulsion d'onde RF à la fréquence de Larmor, qui permet de basculer l'aimantation M de façon orthogonale par rapport à B_0 . La détection du signal est alors assurée par une antenne de réception. Il est important de souligner que la sensibilité de détection décroît avec la distance à l'antenne.

Après perturbation du système par l'impulsion RF, le signal capté suit un processus de retour à l'équilibre des spins nucléaires appelé « relaxation nucléaire » (avec $M_z \rightarrow M_0$ et $M_{xy} \rightarrow 0$). L'évolution du signal dans le temps a été décrite par Felix Bloch en 1946 (48) :

$$\frac{dM_z}{dt} = - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}$$

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = - \frac{M_{xy}}{T_2}$$

Chaque composante (en l'absence de perturbation supplémentaires) revient à l'équilibre selon les équations :

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right) + M_z(0)e^{-\frac{t}{T_1}}$$

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-\frac{t}{T_2}}$$

Chaque phénomène de retour à l'équilibre est appelé respectivement « relaxation longitudinale » et « relaxation transversale » (Figure 4).

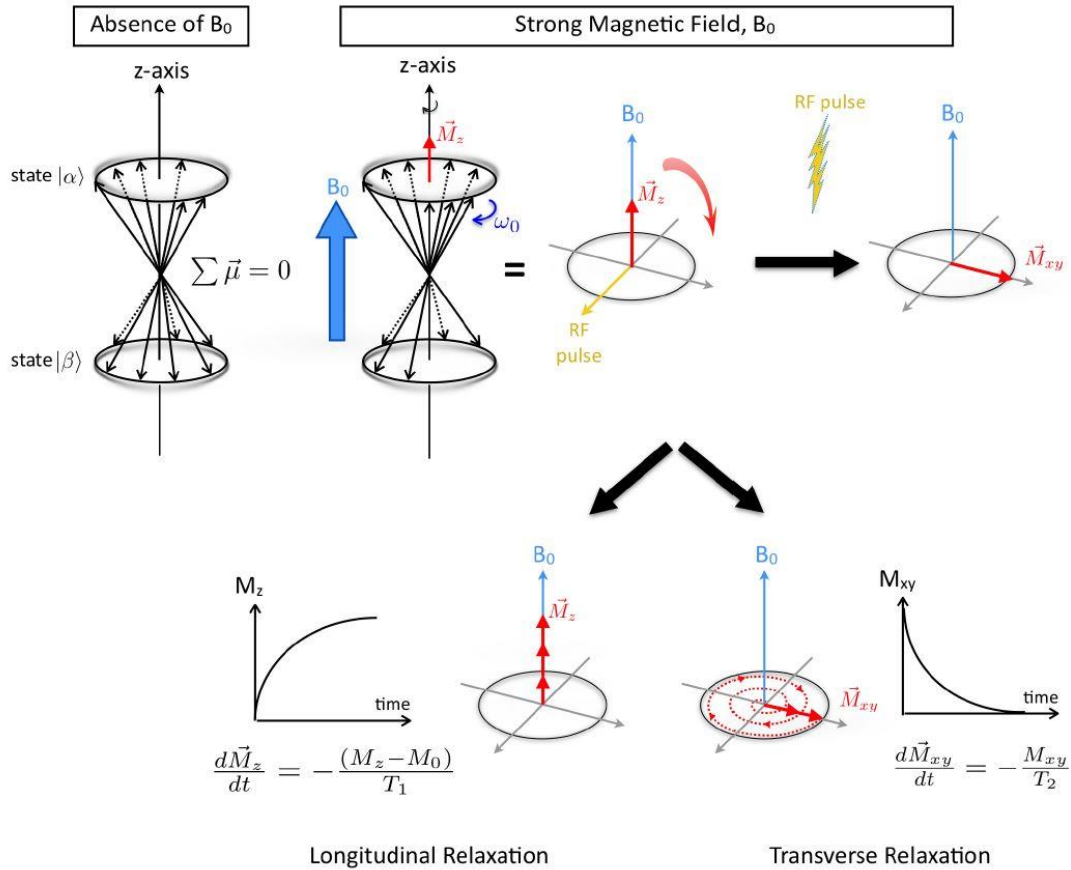


Figure 4: Principe du phénomène de relaxation nucléaire. Figure issue de Koonjoo N. (2015) (49)

Chaque phénomène de relaxation traduit un effet de restitution d'énergie du système de spins par interaction avec l'environnement (ou réseau) moléculaire entourant les protons.

La relaxation longitudinale est pour cette raison communément appelée « relaxation spin-réseau ». La relaxation transversale est en plus la conséquence d'une interaction des protons (spins) entre eux : on parle alors de « relaxation spin-spin ». Les spins se déphasent à des vitesses différentes. Les protons évoluent en effet dans des environnements physico-chimiques non constant (avec de l'agitation atomique et moléculaire) ce qui peut induire de légères

perturbations de leur vitesse de précession théorique. Les effets de déphasage (ou de perte de cohérence) relatifs à la relaxation transversale sont donc dus à des hétérogénéités de champ d'origines moléculaires. C'est ce phénomène de déphasage qui est directement responsable d'une disparition progressive du signal (signal de précession libre appelé autrement FID). L'aimantation transversale évolue selon une fonction exponentielle décroissante ayant pour constante de temps le T_2 .

2. Temps de relaxation T_1 et T_2 :

Le temps de relaxation longitudinal T_1 correspond au temps nécessaire pour observer 63% de repousse du signal par rapport à l'aimantation longitudinale M_z . Le temps de relaxation transverse T_2 correspond au temps nécessaire pour observer 63% de décroissance de l'aimantation transversale M_{xy} (il persiste alors 37% de l'aimantation M_{xy}). Chaque temps est généralement exprimé en millisecondes.

Les valeurs des temps de relaxation sont des caractéristiques propres à chaque tissu et peuvent être conditionnées par l'intensité de champ magnétique B_0 (notamment le T_2^* détaillé ci-après).

3. Temps de relaxation T_2^* :

Il a été vu que la relaxation T_2 était due à la perte de aimantation transversale (M_{xy}), elle-même liée aux interactions naturelles des protons à l'échelle atomique et moléculaire au niveau du tissu à imager. En réalité, la perte de M_{xy} se produit de façon beaucoup plus rapide que prévue. Ce phénomène est nommé relaxation T_2^* . La relaxation T_2^* résulte principalement des hétérogénéités du champ magnétique principal (B_0). Ces hétérogénéités peuvent être la conséquence :

- De défauts intrinsèques de champ magnétique liés à l'aimant

ou

- De distorsions de champ induites par des différences de susceptibilité magnétique entre deux tissus voire par la présence d'agents de contraste

Le T_2^* peut alors être considéré comme un T_2 « effectif » alors que le T_2 serait considéré comme le T_2 « naturel » du tissu imagé. Le T_2^* est toujours plus court que le T_2 . En tenant compte de la contribution des hétérogénéités de champ magnétique, le T_2^* peut être défini comme :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2i}}$$

Où $1/T_{2i} = \gamma\Delta B_0$ est la contribution du taux de relaxation attribuable aux hétérogénéités de champ B_0 au sein d'un voxel.

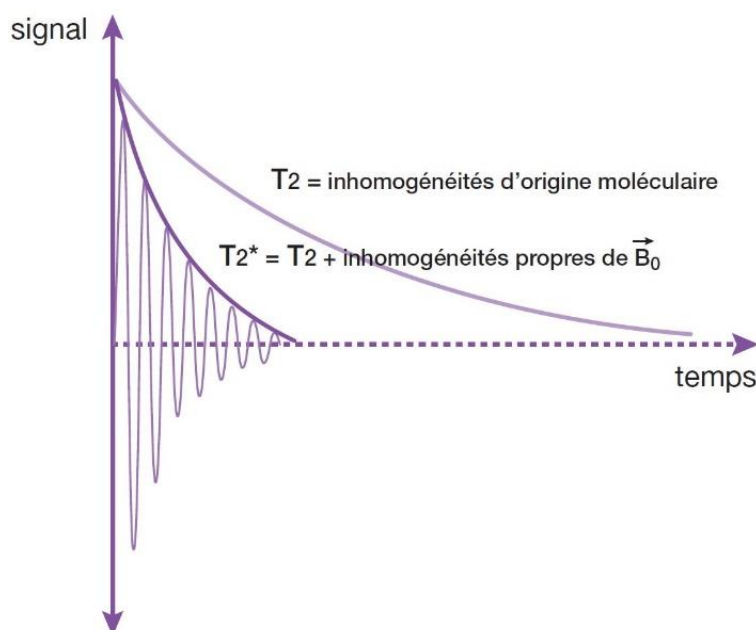


Figure 5: Principe de relaxation T_2^* : aux hétérogénéités de champs d'origine moléculaire (= relaxation T_2) s'ajoutent les hétérogénéités propres (constantes) du champ magnétique externe B_0 . Figure issue de (50)

4. Les agents de contraste :

Les agents de contraste utilisés en IRM sont définis par leurs capacités à diminuer les temps de relaxation T_1 , T_2 et T_2^* des tissus environnants. Ce potentiel de modification de temps de relaxation est une caractéristique propre à chaque agent de contraste qui est appelée « relaxivité » et qui est exprimée en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Pour une concentration fixée en agent de contraste, plus la relaxivité est élevée et plus le contraste généré est important. Il existe une relaxivité pour chaque temps de relaxation : r_1 pour T_1 , r_2 pour T_2 et r_2^* pour T_2^* . Ces relaxivités

sont calculées à partir de la mesure des taux de relaxation ($1/T$) qui sont proportionnels à la concentration (connue) en agent de contraste. Les relaxivités peuvent être calculées de la manière suivante :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1,0}} + r_1[C_{(agent\ de\ contraste)}]$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_{2,0}} + r_2[C_{(agent\ de\ contraste)}]$$

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_{2,0}^*} + r_2^*[C_{(agent\ de\ contraste)}]$$

Le ratio r_2/r_1 permet de déterminer pour quel type de contraste l'agent est le plus indiqué. Un faible rapport r_2/r_1 (compris entre 1 et 5) permet de considérer le produit comme agent de contraste T_1 . Un rapport r_2/r_1 plus élevé permet en revanche de considérer le produit comme agent de contraste T_2 .

Un agent de contraste dit « T_1 » permet de générer un contraste positif alors qu'un agent dit « T_2 » génère de façon prédominante un contraste négatif.

Les principaux types d'agents de contraste utilisés actuellement peuvent être catégorisés en deux groupes : les agents paramagnétiques et les agents superparamagnétiques.

Les agents paramagnétiques, tels que les chélates de gadolinium, sont des produits de contraste moléculaires qui ont un effet de diminution du T_1 prédominant qui permet de générer localement un hypersignal.

Les agents superparamagnétiques, tels que les nanoparticules d'oxyde de fer (USPIO), possèdent un rapport r_2/r_1 élevé qui leur permet de générer des contrastes négatifs. Leur effet T_2 prédominant est caractérisé par la capacité des particules à induire un déphasage des spins du plan transverse. Ce déphasage entraîne une destruction accélérée de l'aimantation transversale des tissus et engendre donc une diminution locale des valeurs de T_2 (ou de T_2^*).

USPIOs :

La relaxivité des agents de contraste superparamagnétiques est conditionnée par la taille des particules, leur cristallinité et leur chimie de surface (enrobage) (51-54).

La chimie de surface conditionne aussi la pharmacocinétique et la biodistribution des USPIOs. Une fixation de protéines plasmatiques à la surface des particules à lieu directement après leur

injection. Ce phénomène connu appelé « opsonisation » est responsable de l'internalisation cellulaire et de l'élimination plasmatique rapide des particules par le système réticulo-endothélial. L'élimination des particules après opsonisation se fait majoritairement au niveau d'organes comme le foie ou la rate. La chimie de surface des particules (agents d'enrobage, charge de surface, densité de greffage) a un effet direct sur leur biodistribution et leurs propriétés pharmacocinétiques (55-57).

Dans le cadre de l'imagerie de l'athérosclérose, une chimie de surface contrôlée des USPIOs est d'un intérêt primordial afin d'améliorer leur temps de circulation vasculaire de façon à augmenter les probabilités de ciblage des particules (passif ou actif) au niveau de la plaque.

Ce projet s'inscrit dans la continuité des travaux menés précédemment au sein de l'équipe (29, 31, 58). Le travail présenté ici s'est donc articulé uniquement autour de l'utilisation de particules d'oxyde de fer superparamagnétiques.

Les agents de contraste superparamagnétiques sont des outils pouvant être employés dans un contexte d'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome. Ce concept sera détaillé dans la partie suivante.

G. Imagerie Moléculaire : ciblage de micro et de nano-objets

Au-delà des simples caractéristiques structurelles des vaisseaux athérosclérotiques, le fait de pouvoir visualiser les processus biologiques cliniquement pertinents de la pathologie permettrait d'évaluer la plaque et sa propension à provoquer un événement cardiovasculaire aigu. Des méthodes d'imagerie clinique améliorées sont donc nécessaires pour mesurer directement l'activité de la maladie. C'est exactement ce que peuvent permettre les technologies d'imagerie moléculaire utilisant des traceurs moléculaires destinés à l'étude des processus pathologiques. Ces traceurs spécifiques sont conçus pour aller se fixer sur les sites où l'activité de la maladie est accrue, quel que soit le niveau d'évolution de la plaque (érodée ou rompue). Les stratégies d'imagerie usuelles visant à identifier la vulnérabilité individuelle des plaques dans les artères coronaires peuvent ne pas prédire de manière adéquate le risque d'événements cardiovasculaires aigus. L'évaluation globale de l'activité de la maladie dans l'arbre artériel conduira certainement à une meilleure prévision du risque.

L'imagerie moléculaire est apparue au début des années 2000 pour identifier les processus moléculaires et cellulaires dans des modèles animaux de diverses maladies (59). Initialement, les modalités d'imagerie moléculaire ont trouvé leur application dans les dispositifs d'imagerie optique (fluorescence) et nucléaire tels que la TEMP et la TEP. Plus récemment, l'échographie, la tomodensitométrie (CT-scan) et l'IRM, réputées comme techniques de diagnostic peu sensibles, ont été développées en modalités de ciblage moléculaire, ces techniques tirant profit de leur excellente résolution spatiale. Un certain nombre d'agents de contraste ciblés ont été conçus pour imager des biomarqueurs appropriés, connus pour être surexprimés dans l'athérome. La partie suivante est un bref résumé de la littérature existante sur l'imagerie de l'athérosclérose par IRM couplée à l'utilisation d'agents de contraste (principalement des USPIOs). Une revue plus complète de la littérature concernant les avancées récentes en imagerie moléculaire est visible en annexe n°11.

1. Imagerie moléculaire par IRM : Du ciblage passif vers le ciblage actif

Le processus d'inflammation est un mécanisme connu de l'athérogenèse, qui implique des cellules immunitaires innées et adaptatives telles que les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques, les leucocytes, ou les lymphocytes. Les cellules les plus représentées au sein de la plaque d'athérome sont les macrophages. Dans un objectif d'imagerie moléculaire, de nombreuses nanoparticules ont été conçues pour cibler ces acteurs centraux du développement de la plaque.

a. Ciblage passif :

En se basant sur les propriétés phagocytaires des monocytes, des nanoparticules dédiées à l'imagerie ont été développées et leur effet de ciblage passif a été testé lors d'études précliniques chez des lapins et des souris ApoE^{-/-}.

Briley-Saebo et al. ont montré que des USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide) à base de dextran (Feridex) de diamètre inférieur à 20 nm pouvaient être utilisés pour cibler de façon passive les macrophages intraplaques chez le lapin athéroscléreux (60). D'autres équipes ont démontré que des formulations lipidiques, plus souples, jusqu'à 200 nm de diamètre pouvaient pénétrer dans la plaque : par exemple, des micelles chargées de gadolinium (61), d'une taille pouvant atteindre 106 nm, pouvaient passer à travers un pore de 25 nm *in vitro*. Dans une autre étude, des liposomes d'un diamètre de 203 nm contenant du gadolinium ont été utilisés pour démontrer l'importance de la nature des phospholipides sur leur absorption par des macrophages *in vitro* (62). Ces deux agents ont été détectés par IRM au niveau des plaques athérosclérotiques chez les souris ApoE^{-/-}, suggérant le potentiel des nanoparticules lipidiques à passer au travers des fenestrations de l'endothélium vasculaire qui seraient liées aux lésions athéromateuses.

Une autre étude menée par Yancy et al. en 2005 a mis en évidence des différences de cinétiques d'accumulation de deux types d'USPIO (ferumoxtran-10 et ferumoxytol) au niveau de la plaque chez le lapin athéromateux (concentration injectée : 0.5 mM Fe/kg) (63). Cette étude a suggéré que le temps de circulation vasculaire des USPIOs était un paramètre critique conditionnant le phénomène d'accumulation des particules au niveau de la plaque d'athérome (et leur internalisation macrophagique). L'accumulation du ferumoxtran-10 dans la plaque aurait été cependant observée plus rapidement sur le même modèle animal (concentration injectée : 1 mM

Fe/kg) lors d'une autre étude menée par Sigovan et al. en 2009 (64-65). D'après l'expérience des auteurs avec cet agent de contraste il a été suggéré que des mécanismes de diffusion passive pourraient être impliqués dans l'accumulation du ferumoxtran-10 au sein de la plaque (65). L'importance de l'effet du revêtement des nanoparticules vis-à-vis de leur phagocytose par les macrophages a été soulignée dans une étude de 2013 menée par Tsuchiya et al. (66). Cette équipe a par exemple comparé l'accumulation *in vivo* de quatre types de particules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIO), à savoir des SPIO, des SPIO recouvertes de mannane (M-SPIO), des Ultrasmall SPIO (USPIO) et des USPIO recouvertes de mannane (M-USPIO) dans les lésions de lapins athéroscléreux. Les analyses histologiques et par imagerie ont montré que les particules de SPIO et USPIO recouvertes de mannane étaient plus facilement internalisées au niveau de la plaque d'athérome chez le lapin que les particules de SPIO et USPIO non revêtues.

En résumé, le ciblage passif de la plaque d'athérome par des USPIO peut être favorisé par certains paramètres physico-chimiques tels que la taille des particules, leur forme et leur revêtement. Cet ensemble de facteurs leur confère des propriétés pharmacocinétiques particulières tels qu'un échappement au système réticulo-endothélial et un temps de circulation prolongé qui permet d'augmenter la probabilité d'accumulation au sein de la plaque par phénomène de diffusion passive.

b. Ciblage actif :

La surexpression de biomarqueurs spécifiques de l'athérosclérose à certains stades de la pathologie peut être une voie d'action exploitable, en vue d'un ciblage actif de la plaque d'athérome par des particules fonctionnalisées avec un ou plusieurs ligands.

Les ligands utilisés pour la fonctionnalisation des USPIOs peuvent être des anticorps (ou des fragments d'anticorps), des polysaccharides ou des peptides.

Il a été vu précédemment que la surexpression de molécules permettant l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium est l'un des premiers événements initiant l'athérosclérose. Les molécules intervenant dans ce mécanisme comme la P-sélectine, la E-sélectine, le VCAM-1 et l'ICAM-1 ont été utilisées comme biomarqueurs précoces de l'athérosclérose. Différentes études ont montré l'intérêt de développer des USPIOs fonctionnalisés par un ligand spécifique de ces cibles moléculaires (67-71). D'autres marqueurs précoces tels que les LDL-oxydés ont été utilisés comme cibles moléculaires de l'athérosclérose (72, 73).

Les mécanismes inflammatoires sont très impliqués dans les plaques à risque de rupture et sont notamment causés par une forte présence de macrophages. Dans ce cadre, l'imagerie moléculaire s'est tournée vers la détection de l'accumulation macrophagique dans les plaques athéromateuses. Cette détection peut être effectuée via différents marqueurs d'inflammation tels que le facteur d'adhésion cellulaire CD44 qui possède une forte affinité pour l'acide hyaluronique (HA). L'HA a ainsi été utilisé pour le ciblage actif de particules magnétiques sur les sites inflammatoires de l'athérosclérose (74). Les récepteurs scavengers peuvent aussi être utilisés pour la détection des macrophages intraplaque. Le marqueur CD163 a par exemple fait l'objet d'une étude de ciblage en IRM par des particules magnétiques fonctionnalisées avec un anticorps anti-CD163 (75). L'ostéopontine (OPN), qui est une molécule sécrétée par les macrophages spumeux, est un biomarqueur de la plaque d'athérome vulnérable qui a aussi été récemment utilisé lors d'une étude faisant intervenir une sonde bimodale (IRM/UV-visible) couplée à un anticorps anti-OPN (76).

Un autre élément caractéristique des plaques à risque de rupture est la présence marquée d'apoptose macrophagique. L'annexine-V, qui est une protéine utilisée pour la détection précoce d'apoptose, a par exemple été employée pour fonctionnaliser et étudier la biodistribution de particules dédiées à l'IRM (77) ou hybrides (TEMP/IRM) (78).

L'angiogenèse intraplaque est un processus impliqué dans la croissance rapide de la plaque hémorragique et est un marqueur indicatif des plaques à risque de rupture (10). Un marqueur potentiel d'inflammation et d'angiogenèse dans les lésions athérosclérotiques est l'intégrine $\alpha v \beta 3$ qui est un récepteur exprimé à la surface des macrophages et des cellules endothéliales activées (79).

La formation de thrombus peut enfin être une cible pour l'identification de lésions athéromateuses compliquées qui sont à l'origine de thrombo-embolies (29-31). Ces lésions avancées sont riches en plaquettes activées et certains marqueurs comme la P-selectine ou l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$ sont fortement exprimés à leur surface. Plusieurs études de ciblage d'USPIOs fonctionnalisés avec des anticorps dirigés contre ces marqueurs plaquettaire ont été effectuées au sein de l'équipe du RMSB (31, 58, 67).

Jacobin-Valat et al. ont par exemple développé en 2011 des USPIO versatiles (VUSPIO), marqués avec de la rhodamine et fonctionnalisés avec un anticorps murin dirigé contre la P-sélectine humaine (VH10). Ce type de particule a été évalué *ex vivo* et *in vivo* sur des aortes de souris ApoE^{-/-} (67). Une autre étude menée en 2015 a porté sur la fonctionnalisation du même type de particule avec un anticorps humain appelé rIgG4 TEG4, et qui est dirigé spécifiquement contre l'intégrine $\alpha IIb \beta 3$. L'immunoréactivité des VUSPIO fonctionnalisés a été confirmée *in*

vitro par des techniques de cytométrie en flux, de microscopie électronique à transmission et de microscopie optique. Des mesures IRM effectuées *ex vivo* chez la souris ApoE^{-/-} ont montré la fixation spécifique des VUSPIO fonctionnalisés sur la plaque d'athérome. Cependant, la fonctionnalisation chimique de ce type d'anticorps (format IgG), longue et fastidieuse, ne permettait le greffage que d'un seul ligand par particule en moyenne.

Ces difficultés ont été dépassées durant la thèse de Mélusine Larivière qui durant ses travaux, a montré la faisabilité de fonctionnalisation d'un nombre croissant de fragments d'anticorps (scFv : single chain Fragment variable) sur les VUSPIO (80). Le diamètre hydrodynamique d'un scFv (5 nm) représentant un cinquième de la taille d'un anticorps de format IgG, les scFv sont un format semblant plus adapté pour une fonctionnalisation sur des particules de petite taille. A partir de la bimodalité des VUSPIO (IRM/NIRF), le ciblage spécifique des particules VUSPIO-TEG4 a récemment été mis en évidence lors d'essais *ex vivo* et *in vivo* chez des souris ApoE^{-/-} (31).

En résumé, les plaquettes activées sont des cibles moléculaires de choix qui permettent de diagnostiquer les plaques d'athérome à risque de rupture. Des anticorps dirigés contre ces marqueurs ont donc été utilisés durant ces travaux.

Durant cette thèse, une collaboration avec le Dr. Christoph E. Hagemeyer (ACBD, Melbourne, Australie) a permis l'utilisation d'un scFv appelé SCE5 qui est dirigé spécifiquement contre l' α IIb β 3 activée. Ce type d'anticorps a déjà été utilisé au cours de différents travaux qui ont mis en évidence l'efficacité de ciblage de ce scFv pour les plaquettes activées (81-84).

Wang et al. (82) ont par exemple utilisé en 2014 les propriétés de ciblage de ce scFv afin de potentialiser l'effet fibrinolytique d'un activateur de plasminogène (scuPA) au niveau des sites d'activation plaquettaires. Plus récemment, au cours d'une première étude *in vivo* de tomographie par émission de fluorescence-3D (FLECT), le même groupe a également démontré qu'une sonde proche infrarouge (NIRF) conjuguée au SCE5 facilitait la détection des thrombus dans l'artère carotide, ainsi que des embolies dans l'artère pulmonaire (85).

Le SCE5 a ici été utilisé dans l'optique de fonctionnaliser des USPIOs qui ont été synthétisés durant ce projet.

Il existe différentes méthodes de fonctionnalisation des anticorps sur les USPIOs. Les mécanismes ayant été étudiés durant ce projet sont détaillés dans la partie suivante.

H. Méthodes de greffage des anticorps

Les anticorps contiennent des fonctions amines dans leur structure moléculaire qui permettent de former des liaisons covalentes avec une variété de groupement chimiques. Ces fonctions amines peuvent être mises à profit pour effectuer des fonctionnalisations chimiques d'agents de contraste. Un exemple de fonctionnalisation chimique est la réaction d'addition de Michael qui réside en une thio-alkylation faisant intervenir une fonction thiol (appelée également sulfhydryle) avec un groupement fonctionnel accepteur de nucléophiles, maléimide.

1. Thiol-Maleimide :

Jacobin et al. ainsi que Larivière et al. ont publié deux articles montrant la fonctionnalisation d'un anticorps anti-plaquettaire (TEG4) sur des particules d'oxyde de fer par une réaction de conjugaison faisant intervenir cette voie (31, 58). Cette partie décrit brièvement le principe général de technique de fonctionnalisation utilisée. Comme le rapporte l'étude menée par Jacobin et al. en 2015 (58), certains anticorps nécessitent une étape préparative de thiolation pour faire apparaître un groupement sulfhydryl à leur surface. Les fonctions maléimides possèdent une double liaison capable de réagir avec les groupements sulfhydryl pour former des liaisons thioether stables. Cette réaction fait intervenir spécifiquement les fonctions thiols lorsque le pH est situé entre 6,5 et 7,5. Une réactivité croisée avec les groupements amines peut avoir lieu pour des valeurs de pH plus élevées (86). Une augmentation du pH peut aussi provoquer l'hydrolyse des fonctions maléimides.

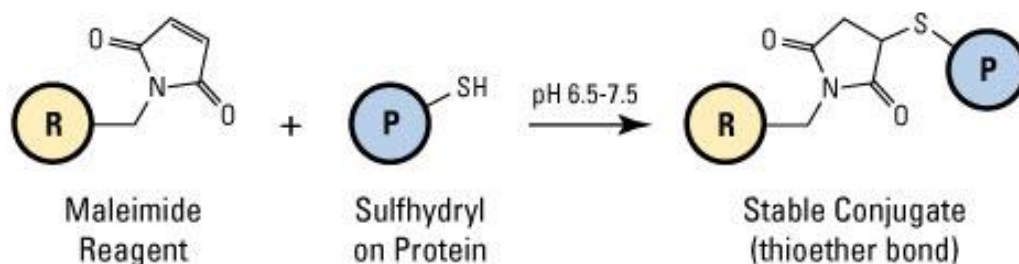


Figure 6: Principe général de la fonctionnalisation d'anticorps par réaction de conjugaison thiol-maléimide. Figure issue de www.thermofisher.com

2. Greffage site-spécifique :

Il a été vu que l'étape préparative de thiolation était basée sur la présence de fonction amines au niveau de la structure moléculaire des anticorps. Bien que cette stratégie de fonctionnalisation ait montré sa faisabilité sur certains anticorps comme les IgG (58), elle présente un risque de dégradation des sites de fixation sur des anticorps de plus petits formats comme les scFv. Les travaux menés par Larivière et al. ont récemment mis en évidence une stratégie de fonctionnalisation dit « site-spécifique », capable de conserver l'intégrité de ce type d'anticorps après greffage sur des particules (31, 80). Cette technique nécessite la conception, par génie génétique, d'anticorps recombinants possédant des séquences d'ADN codant pour l'expression de deux fragments cystéine en position C-terminale du scFv. La présence de fragments cystéines dans la structure moléculaire des scFv permet d'éviter l'étape de thiolation précédemment décrite.

Les scFv recombinants doivent ici être activés par un agent réducteur (TCEP) avant d'effectuer un greffage « classique » par la voie Thiol-Maléimide. Cette voie de fonctionnalisation a été abordée au cours de cette thèse lors de travaux effectués en collaboration avec l'équipe du Pr. Sylvie Crauste-Manciet. Geoffrey Prévot a greffé des anticorps de type scFv-Fc-Cys sur des nanoémulsions (NE) contenant des USPIOs. La furtivité et le ciblage de ces NE ont été testé *in vitro* et *in vivo* par IRM chez la souris ApoE^{-/-}. Ces travaux font actuellement l'objet d'une publication en cours de soumission (Annexe n°10).

3. Sortase :

La sortase A est une enzyme qui peut être utilisée pour effectuer des couplages site-spécifique d'anticorps sur des particules. Ce type de greffage a déjà été effectué lors des travaux de M. Larivière (80) et est utilisé régulièrement dans l'équipe de C. Hagemeyer (ACBD, Melbourne). (87-89)

Les enzymes de type sortase sont exprimées par les bactéries du genre *Staphylococcus* et autres bactéries Gram-positives. Elles jouent un rôle essentiel dans leur constitution membranaire et dans la liaison covalente de protéines de surface à leur peptidoglycane. Ces protéines de surface sont des facteurs de virulence qui peuvent permettre de moduler l'adhérence bactérienne à des

tissus ou d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (90-92). Le mécanisme de liaison covalente des protéines de surface nécessite un site de fixation membranaire C-terminal comprenant plusieurs acides aminés dont le motif est de type LPXTG (Leucine, Proline, X : n'importe quel acide aminé, Threonine, et Glycine respectivement). Le motif LPXTG est couplé à une région hydrophobe chargée positivement. La sortase A reconnaît le motif LPXTG et un premier couplage se produit au niveau de son site catalytique. Un clivage de la liaison peptidique entre la thréonine et la glycine est effectué : un intermédiaire thioacyl est alors formé. Cet intermédiaire réactionnel peut être impliqué dans une attaque nucléophile de la partie N-terminale de toute protéine porteuse d'un groupement poly-glycine. Cette réaction entraîne alors la création d'une liaison peptidique stable entre la membrane (LPXT) et la protéine (GGG) (87).

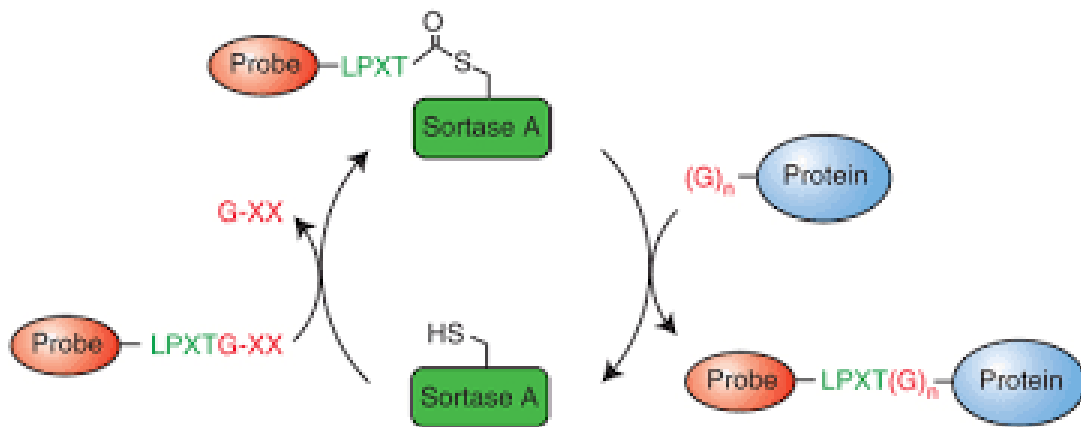


Figure 7: Principe général de la fonctionnalisation d'anticorps par réaction enzymatique (Sortase-A). Le fragment LPXTG (X pouvant être n'importe quel un acide aminé) est reconnu par l'enzyme qui effectue une de conjugaison avec tout élément porteur de groupement GGG. Figure issue de Theile et al., Nat Protoc, (2013) (93)

La sortase A utilisée durant ce projet provient de la bactérie *Staphylococcus aureus* et le poids moléculaire de l'enzyme est de 17,9 kDa.

I. Evaluation de l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque d'athérome :

Comme présenté précédemment, l'IRM est une technique d'imagerie de choix permettant l'évaluation de la plaque d'athérome à différents stades de son évolution. De façon à améliorer l'information diagnostique dans certaines situations pathologiques, cette technique à recourt à des agents de contraste superparamagnétiques (tels que les USPIOs) définis par leur capacité à créer un contraste négatif local (hyposignal) lorsqu'ils s'accumulent au sein de la zone d'intérêt. Dans ce cadre, les USPIOs ont souvent été utilisés dans le but de caractériser la paroi artérielle par IRM. Les séquences utilisées pour mettre en évidence les USPIOs sont le plus souvent des séquences en écho de gradient pondérées T_2^* .

Une revue succincte de la littérature sur ce type de séquence, employée pour évaluer l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque, permet de distinguer deux méthodes d'imagerie différentes :

1. Imagerie qualitative (ou semi-quantitative) :

Ces méthodes d'imagerie reposent sur l'appréciation visuelle et semi-quantitative des différences d'intensités entre plusieurs images effectuées avant et après injection. Les résultats sont généralement exprimés en intensités relatives de signal.

Plusieurs études cliniques de ce type visant à évaluer le ciblage passif d'USPIOs par les macrophages ont été menées chez l'homme (94, 95), le lapin (60, 64, 96), et chez la souris (69, 97, 98).

Une des limites de l'interprétation qualitative (ou semi-quantitative) est qu'elle laisse souvent place à une variabilité intra et inter opérateur qui peut être élevée (99). En effet sans protocole d'imagerie au préalable validé, tout résultat exprimé en intensités relatives de signal est potentiellement sujet à une fortes incertitudes de mesures qui peuvent biaiser l'interprétation des résultats. Cette incertitude peut être par exemple due à une forte influence des variations spatiales de l'antenne de réception vis-à-vis de sa sensibilité de détection. Le choix des paramètres de séquence a aussi une influence majeure sur l'interprétation qualitative des résultats car le contraste intrinsèque des tissus est conditionné par ces paramètres (100).

Ce constat a déjà été fait par Fayad et al. en 2009 (101), en réponse à l'étude clinique ATHEROMA menée durant la même année (95). Dans leur communiqué les auteurs expliquent :

« As a result, aspects of USPIO-MRI quantification need to be addressed before using this method in large multicenter clinical trials. The authors rely on visual observation and changes in signal intensity to determine USPIO uptake. However, differences in patient positioning, coil inhomogeneities, noise, and other artifacts may all induce signal loss and may not be indicative of USPIO uptake. The conclusions obtained from this study would be greatly strengthened by the addition of validated semiquantitative analyses. »

En résumé, même si l'imagerie qualitative peut permettre une analyse préliminaire de résultats et soulever des tendances intéressantes, il est d'une importance cruciale de valider préalablement les méthodes d'analyse avant de pouvoir émettre des hypothèses ou de conclure sur les résultats observés.

Deux études ont cependant montré une validation de leur protocole d'étude semi-quantitatif en établissant des liens de corrélation entre l'aire d'extinction du signal des images IRM (suite à l'injection d'USPIOs) et leurs résultats d'analyses *ex vivo* (coupes histologiques) (64, 69). Ces méthodes d'analyse semi-quantitatives montrent des résultats intéressants concernant l'accumulation passive (64) ou active (69) d'USPIOs au sein de la plaque.

Cependant l'imagerie quantitative du T2* de la plaque d'athérome est une méthode de plus en plus utilisée depuis une dizaine d'année, potentiellement plus informative quant à l'accumulation des agents de contraste au sein de la plaque.

2. Imagerie quantitative du T2* :

Il a été expliqué précédemment que les USPIOs sont des agents de contraste ayant la capacité de diminuer les valeurs de T2* des tissus dans lesquels ils s'accumulent. Pour une concentration fixe d'USPIO injecté, cet effet est d'autant plus marqué que la relaxivité des particules est élevée. La quantification du T2* (ou $R2^* = 1/T2^*$) a été menée lors de deux études *in vitro* sur des USPIOs avant et après leur internalisation par des cellules tumorales (102) ou macrophagiques (103). Les auteurs ont montré des corrélations linéaires entre les concentrations en fer estimées et les taux de relaxations mesurés. Ces deux études ont mis en

évidence le potentiel de leur protocole de mesure à évaluer la concentration d'agents de contraste internalisé au sein de différentes cellules à 3T (102), 4.7T (103) et 7T (103). Un des défis actuels reste à réussir à transposer ce type de protocole pour quantifier la concentration d'USPIO lors d'études *in vivo*.

Des travaux de quantification du T2* (ou R2*) ont été menés lors d'études cliniques chez l'homme à 1.5T (104, 105) et 3T (106). Les protocoles établis sont des mesures de T2* ou R2* sur des plaques d'athérome carotidiennes avant et après injection d'USPIOs. Patterson et al. ont par exemple montré des différences significatives de T2* de la plaque entre un groupe de patients traités avec une faible dose de statines et un groupe de patients traités avec une forte dose de statines, avant et après injection d'USPIOs (105). Smits et al. ont injecté du ferumoxytol et observé l'évolution des valeurs de R2* dans le temps au niveau des parois carotidiennes chez un groupe d'individus sains et un groupe de patients présentant des plaques d'athérome (> 30% de sténose) (106). Cette étude a montré des variations importantes des valeurs de R2* entre 48h et 72h post-injection chez le groupe de patients présentant des plaques d'athérome (Figure 8) Le ferumoxytol est le seul agent superparamagnétique actuellement utilisable en clinique. Cependant, la recherche concernant de nouveaux agents de contrastes superparamagnétiques ciblant est actuellement en plein essor.

Des études de validation pré-cliniques sur l'animal sont indispensables avant tout passage chez l'homme. Il n'y a en revanche que peu d'études chez l'animal qui font état de protocoles de quantification du T2* de la plaque d'athérome.

Une étude chez le lapin à 3T a montré la possibilité de combiner deux modalités d'imagerie (IRM/PET) pour l'analyse des processus inflammatoires au sein des plaques d'athérome (107). Les résultats de cette étude ont mis en évidence la capacité des mesures de R2* à évaluer l'état inflammatoire de la plaque d'athérome avec une sensibilité diagnostique proche des mesures effectuées en TEP.

D'autres études menées chez des souris ApoE^{-/-} ont porté sur l'analyse de l'état inflammatoire de la plaque via l'injection d'USPIOs (108, 109). Sigovan et al. ont par exemple montré, à partir des valeurs de T2* post-injection, que l'état inflammatoire de la plaque évolue selon l'âge des souris. Selon leurs conditions expérimentales, un pic d'inflammation a été mesuré pour des souris âgées entre 16 et 24 semaines (Figure 9). Les études présentées rapportent cependant des valeurs de T2* mesurées au niveau de la crosse aortique. Cette zone anatomique est située à un niveau proche des poumons qui peuvent eux-mêmes engendrer de fortes hétérogénéités de champ magnétiques. Il a été vu précédemment dans le communiqué de Fayad en 2009 qu'un certain nombre de paramètres (dont les hétérogénéités de champ) peuvent engendrer des pertes

de signal qui peuvent fausser l'interprétation des résultats sur l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque (101). Le niveau d'incertitude de mesure du $T2^*$ engendré par de telles hétérogénéités (particulièrement à haut champ magnétique) peut rendre difficile toute interprétation de résultats sans évaluation préalable de la répétabilité, de la reproductibilité et de la robustesse de mesure du protocole. Il doit cependant être souligné que la spécificité des résultats observés a été validée en établissant un lien de corrélation entre l'aire relative d'extinction de signal sur les images IRM et l'aire occupée par les macrophages sur les données histologiques.

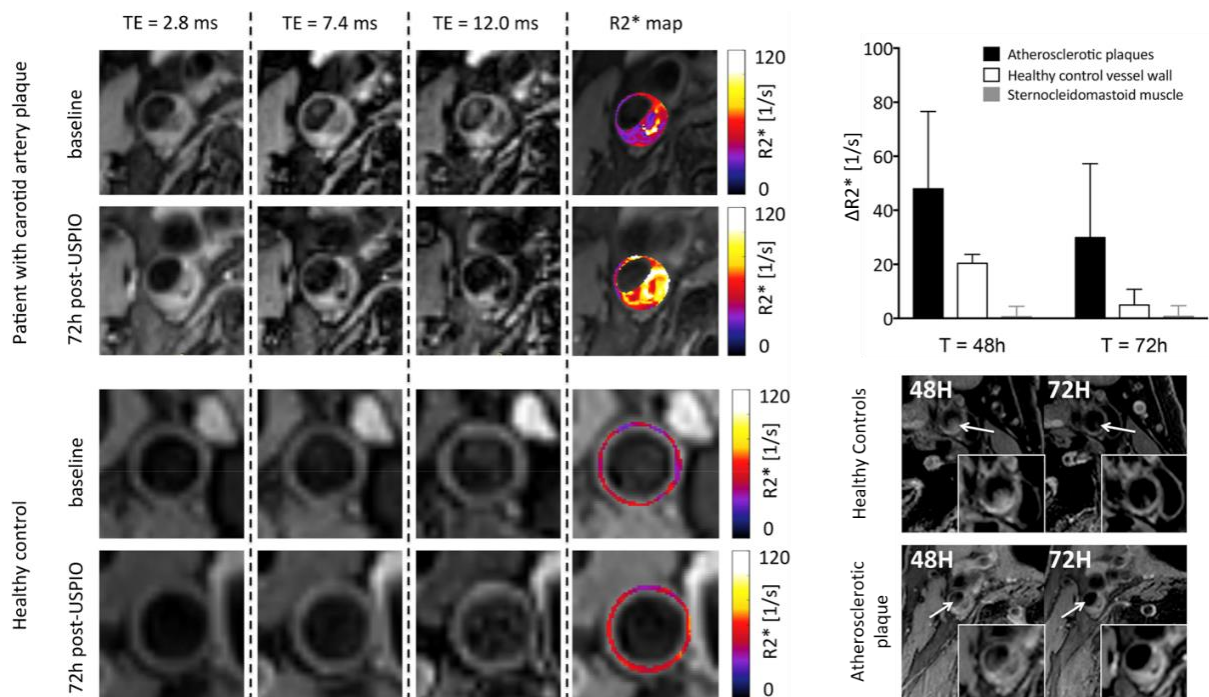


Figure 8: Images représentatives de séquences multi-écho de gradient effectuées sur des aortes carotidiennes chez des patients athéromateux et des individus sains avant et 72h après injection de ferumoxytol. Les cartographies $R2^*$ ont été superposées aux images anatomiques. Les valeurs de $\Delta R2^*$ représentées en histogramme montrent des variations importantes entre chaque groupe entre 48h et 72h post-injection. Le groupe de patient présentant des plaques d'athérome présente des valeurs de $R2^*$ encore élevées 72h post-injection à la différence du groupe d'individus sains, signe d'une accumulation prolongée du ferumoxytol dans la plaque. Des mesures de $R2^*$ ont été faites au niveau d'un muscle faisant office de contrôle négatif. Aucune modification des valeurs de $R2^*$ n'a été observée à ce niveau. Les auteurs rapportent aussi la présence d'artefacts de flux dans les deux groupes à 48h qui ne sont plus observés à 72h (images à droite en bas). Figure adaptée de Smits et al. (2017)

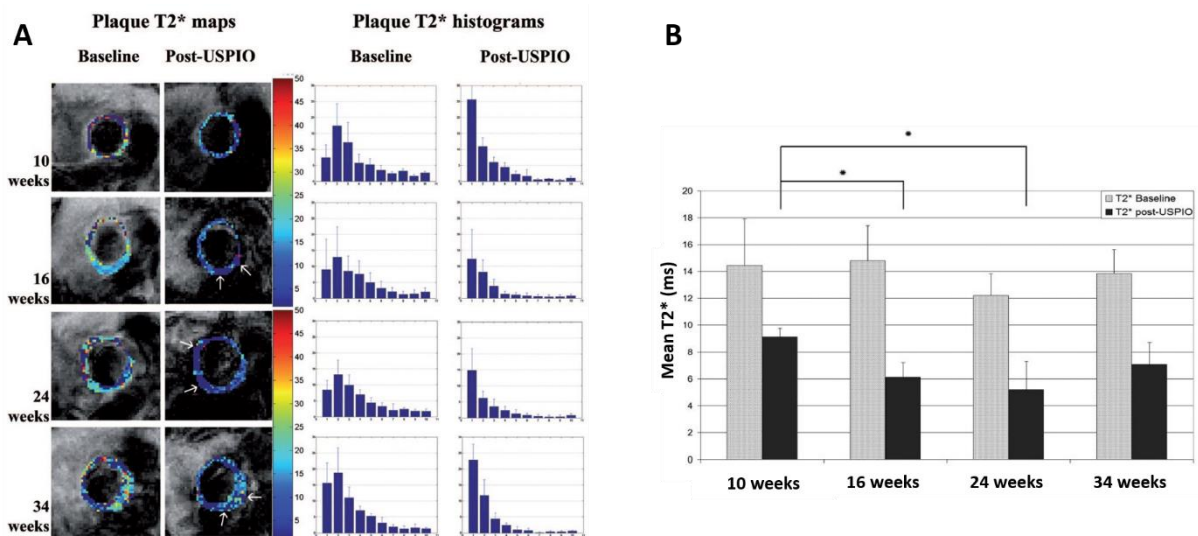


Figure 9: Images représentatives de séquences multi-écho de gradient effectuées au niveau de la crosse aortique de souris *ApoE^{-/-}* à 4.7T avant et 48h après injection d'USPIOs (P904). **A:** Les cartographies T2* ont été superposées aux images anatomiques. Les histogrammes correspondants représentent le profil de distribution des valeurs de T2* de chaque cartographie. **B:** Variations temporelles des valeurs moyennes de T2* mesurées sur les images IRM avant et 48h après injection d'USPIOs. Figure adaptée de Sigovan et al. (2010)

D'après les résultats de la littérature, il semble que l'incertitude de mesure des méthodes d'analyses quantitatives du T2* de la plaque d'athérome chez le petit animal est un paramètre qui n'est actuellement pas pris en compte dans l'interprétation des résultats. Cependant, l'incertitude de mesure est un élément quantifiable qui participe à l'évaluation et la validation d'un protocole de mesure. Une validation de la répétabilité, de la reproductibilité et de la robustesse de chaque protocole d'imagerie quantitative reste nécessaire afin de pouvoir conclure sur une éventuelle accumulation des USPIOs au sein de la plaque.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans ce cadre d'étude.

En particulier, plusieurs protocoles d'imagerie quantitative du T2* développés et validés durant cette thèse seront présentés. La répétabilité, la reproductibilité et la robustesse de mesure ont été évaluées pour chaque protocole. L'analyse comparative de ces différents paramètres a permis de choisir le protocole le plus adapté parmi tous ceux étudiés.

Ce protocole d'imagerie a été appliquée à l'étude d'agents de contraste à susceptibilité magnétique (USPIO). Trois types d'agents de contraste développés à l'ICMCB ont été abordés pour répondre à différentes hypothèses. Tous ces USPIOs sont constitués d'oxyde de fer (maghémite, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$) où le fer est entièrement oxydé sous son degré stable (+III), contrairement à la magnétite (Fe_3O_4) afin d'éviter les réactions redox qui peuvent intervenir à la surface de la nanoparticule durant son cycle de vie (de la synthèse à l'expérimentation) :

- Le premier agent de contraste est constitué de grappes de nanoparticules de maghémite autoassemblées en structures supracolloïdale (SPC). Ces SPC qui seront couplés à des fragments d'anticorps présentent l'intérêt d'offrir une grande quantité de nanoparticules d'oxyde de fer au niveau de la cible limitée en taille chez le petit animal (plaques d'athérome situées au niveau de l'aorte d'une souris $\text{ApoE}^{-/-}$) en utilisant un minimum d'agent de ciblage.

- Le deuxième agent de contraste utilisé dans ces travaux sont des nanoparticules d'oxyde de fer de morphologies nanofleurs. Cette morphologie résulte d'un mécanisme de coalescence de germes pratiquement épitaxiés durant leur étape de croissance donnant des particules finales multidomaines magnétiques (110). Cette configuration en sous domaines épitaxiés a des répercussions sur leurs moments magnétiques orientés selon le même axe de facile aimantation conférant des propriétés magnétiques coopératives (111). Sous l'effet d'un champ magnétique, les moments magnétiques s'additionnent, se comportant alors comme des macrospins. Il en résulte alors des propriétés singulières intéressante pour des applications biomédicales. En particulier, cela se traduit par des relaxivités élevées bien au-delà de celles des nanoparticules sphériques classiques, intéressantes pour l'IRM, ou encore des propriétés d'échauffement exaltées sous induction magnétique, très utile en thérapie par hyperthermie magnéto-induite (112).

- Une dernière forme d'agent de contraste est basé sur des nanoparticules de très petites tailles ($< 3\text{nm}$) pour répondre à des questions de pharmacocinétique et d'accumulation au sein de la plaque via les désordres endothéliaux localisés au niveau des parois vasculaires des microvaisseaux de l'adventice jusqu'à la base de la plaque d'athérome (vasa vasorum). Cette propriété du vasa vasorum donne la possibilité d'atteindre des cibles plus profondes avec des nanoparticules (113) sous réserve que leur taille ne dépasse pas celle des fenêtres vasculaires générés par les désordres endothéliaux ($< 20\text{ nm}$). De par leur taille très petite, la surface spécifique développée par ces particules offre une quantité importante de cations paramagnétiques à leur surface et leur susceptibilité magnétique diminue ce qui permet de les utiliser comme agent d'imagerie T1 en IRM (114).

Toutes ces nanoparticules feront l'objet d'une chimie de surface adaptée pour prolonger le temps de circulation une fois injectées dans le milieu sanguin. Ces procédés de passivation de surface des nanoparticules qui mettent en œuvre des macromolécules de poly(éthylène glycol), ont montré qu'ils peuvent offrir des niveaux de densité de greffage suffisants pour cibler des tumeurs lors de travaux récents (115).

Ce protocole d'imagerie a aussi permis l'étude d'agents de contraste superparamagnétiques ciblés synthétisés par Geoffrey Prévot (Chembiopharm) grâce à la collaboration avec le Pr. Sylvie Crauste-Manciet. Ce dernier type d'USPIO est un ensemble de particules d'oxyde de fer encapsulées au sein de nanoémulsions lipidique huile dans eau (NE), PEGylées en surface. La phase huileuse permet d'encapsuler conjointement des drogues lipophiles avec les particules d'oxyde de fer. Ce type de formulation peut donc permettre de remplir un double rôle dans le cadre de l'athérosclérose et trouve son application aussi bien dans le diagnostic que la thérapie.

J. Objectifs de cette thèse :

- Le premier objectif de cette thèse est de synthétiser de nouveaux agents de contraste superparamagnétiques possédant des caractéristiques physicochimiques spécifiques qui permettent d'imager la plaque d'athérome chez le petit animal. Au cours de l'introduction, plusieurs points ont été abordés concernant la capacité des USPIOs à imager la plaque d'athérome :
 - La relaxivité des particules
 - La furtivité des USPIOs vis-à-vis du système réticulo-endothélial : conditionnée par la chimie de surface des particules
 - Le ciblage passif : influencé par la taille des particules et leur chimie de surface
 - Le ciblage actif : permis par le greffage de ligands spécifiques (de la plaque) à la surface des particules

A partir de ces spécifications, plusieurs types d'USPIOs seront synthétisés et testés.

- Le deuxième objectif est de produire des anticorps spécifiques de la plaque d'athérome et de les fonctionnaliser sur les USPIOs synthétisés. Deux voies de fonctionnalisations ont été abordées au cours de ces travaux.
- Le troisième objectif est de développer et de valider un protocole d'imagerie quantitative par IRM permettant d'évaluer l'accumulation d'USPIOs au sein de la plaque d'athérome chez la souris.
- Le dernier objectif est finalement de tester l'accumulation des particules non-fonctionnalisées et fonctionnalisées dans la plaque d'athérome *in vivo*.

K. REFERENCES :

1. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):29-38.
2. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1262-75.
3. Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003;24(24):2166-79.
4. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* 2009;122(1 Suppl):S3-s14.
5. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol.* 2015;6:98-.
6. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, van der Linden JA, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, et al. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood.* 1996;87(8):3271-81.
7. Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1176-84.
8. Mulligan-Kehoe MJ. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2010;298(2):H295-H305.
9. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2316-25.
10. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2054-61.
11. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(7):831-42.
12. Jahangiry L, Farhangi MA, Rezaei F. Framingham risk score for estimation of 10-years of cardiovascular diseases risk in patients with metabolic syndrome. *J Health Popul Nutr.* 2017;36(1):36-.
13. van der Heijden AA, Ortegon MM, Niessen LW, Nijpels G, Dekker JM. Prediction of coronary heart disease risk in a general, pre-diabetic, and diabetic population during 10 years of follow-up: accuracy of the Framingham, SCORE, and UKPDS risk functions: The Hoorn Study. *Diabetes Care.* 2009;32(11):2094-8.
14. Puri R, Worthley MI, Nicholls SJ. Intravascular imaging of vulnerable coronary plaque: current and future concepts. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(3):131-9.
15. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RAP, Brown AJ, Tawakol A, et al. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118:750-69.
16. Taqueti VR, Hachamovitch R, Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, et al. Global coronary flow reserve is associated with adverse cardiovascular events independently of luminal angiographic severity and modifies the effect of early revascularization. *Circulation.* 2015;131(1):19-27.
17. Kaul P, Douglas PS. Atherosclerosis imaging: prognostically useful or merely more of what we know? *Circ Cardiovasc Imaging.* 2009;2(2):150-60.

18. DeMaria AN, Narula J, Mahmud E, Tsimikas S. Imaging vulnerable plaque by ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C32-9.
19. Ma T, Yu M, Li J, Munding CE, Chen Z, Fei C, et al. Multi-frequency intravascular ultrasound (IVUS) imaging. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control.* 2015;62(1):97-107.
20. Yamagishi M, Terashima M, Awano K, Kijima M, Nakatani S, Daikoku S, et al. Morphology of vulnerable coronary plaque: insights from follow-up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(1):106-11.
21. Kotani J, Mintz GS, Castagna MT, Pinnow E, Berzinger CO, Bui AB, et al. Intravascular ultrasound analysis of infarct-related and non-infarct-related arteries in patients who presented with an acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003;107(23):2889-93.
22. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation.* 2004;110(22):3424-9.
23. Kubo T, Maehara A, Mintz GS, Doi H, Tsujita K, Choi SY, et al. The dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(15):1590-7.
24. Motreff P, Rioufol G, Finet G. Seventy-four-month follow-up of coronary vulnerable plaques by serial gray-scale intravascular ultrasound. *Circulation.* 2012;126(24):2878-9.
25. Suter MJ, Nadkarni SK, Weisz G, Tanaka A, Jaffer FA, Bouma BE, et al. Intravascular optical imaging technology for investigating the coronary artery. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(9):1022-39.
26. Jang IK, Bouma BE, Kang DH, Park SJ, Park SW, Seung KB, et al. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(4):604-9.
27. Uemura S, Ishigami K, Soeda T, Okayama S, Sung JH, Nakagawa H, et al. Thin-cap fibroatheroma and microchannel findings in optical coherence tomography correlate with subsequent progression of coronary atheromatous plaques. *Eur Heart J.* 2012;33(1):78-85.
28. Zhu S, Yang Q, Antaris AL, Yue J, Ma Z, Wang H, et al. Molecular imaging of biological systems with a clickable dye in the broad 800- to 1,700-nm near-infrared window. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(5):962-7.
29. Larivière M. Nanoparticles functionalized with human antibodies for multimodal molecular imaging of atherosclerosis 2016.
30. Gallino A, Stuber M, Crea F, Falk E, Corti R, Lekakis J, et al. "In vivo" imaging of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):25-36.
31. Larivière M, Lorenzato CS, Adumeau L, Bonnet S, Hémadou A, Jacobin-Valat M-J, et al. Multimodal molecular imaging of atherosclerosis: Nanoparticles functionalized with scFv fragments of an anti- α IIb β 3 antibody. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2019;22:102082.
32. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation.* 2002;105(23):2708-11.
33. Wenning C, Kloth C, Kuhlmann MT, Jacobs AH, Schober O, Hermann S, et al. Serial F-18-FDG PET/CT distinguishes inflamed from stable plaque phenotypes in shear-stress induced murine atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;234(2):276-82.

34. Huet P, Burg S, Le Guludec D, Hyafil F, Buvat I. Variability and uncertainty of 18F-FDG PET imaging protocols for assessing inflammation in atherosclerosis: suggestions for improvement. *J Nucl Med.* 2015;56(4):552-9.
35. Blomberg BA, Thomassen A, Takx RA, Hildebrandt MG, Simonsen JA, Buch-Olsen KM, et al. Delayed (1)(8)F-fluorodeoxyglucose PET/CT imaging improves quantitation of atherosclerotic plaque inflammation: results from the CAMONA study. *J Nucl Cardiol.* 2014;21(3):588-97.
36. Mazurek T, Kobylecka M, Zielenkiewicz M, Kurek A, Kochman J, Filipiak KJ, et al. PET/CT evaluation of (18)F-FDG uptake in pericoronary adipose tissue in patients with stable coronary artery disease: Independent predictor of atherosclerotic lesions' formation? *J Nucl Cardiol.* 2017;24(3):1075-84.
37. Tahara N, Mukherjee J, de Haas HJ, Petrov AD, Tawakol A, Haider N, et al. 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-mannose positron emission tomography imaging in atherosclerosis. *Nat Med.* 2014;20(2):215-9.
38. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013;113(1):72-7.
39. Irkle A, Vesey AT, Lewis DY, Skepper JN, Bird JL, Dweck MR, et al. Identifying active vascular microcalcification by (18)F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat Commun.* 2015;6:7495.
40. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet.* 2014;383(9918):705-13.
41. Oliveira-Santos M, Castelo-Branco M, Silva R, Gomes A, Chichorro N, Abrunhosa A, et al. Atherosclerotic plaque metabolism in high cardiovascular risk subjects - A subclinical atherosclerosis imaging study with (18)F-NaF PET-CT. *Atherosclerosis.* 2017;260:41-6.
42. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation.* 2007;116(24):2841-50.
43. Ye YX, Calcagno C, Binderup T, Courties G, Keliher EJ, Wojtkiewicz GR, et al. Imaging Macrophage and Hematopoietic Progenitor Proliferation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2015;117(10):835-45.
44. Chen J, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, et al. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(23):2766-71.
45. Lin SA, Patel M, Suresch D, Connolly B, Bao B, Groves K, et al. Quantitative Longitudinal Imaging of Vascular Inflammation and Treatment by Ezetimibe in apoE Mice by FMT Using New Optical Imaging Biomarkers of Cathepsin Activity and alpha(v)beta(3) Integrin. *Int J Mol Imaging.* 2012;2012:189254.
46. Jaffer FA, Calfon MA, Rosenthal A, Mallas G, Razansky RN, Mauskopf A, et al. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2516-26.
47. Kramer CM, Anderson JD. MRI of atherosclerosis: diagnosis and monitoring therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5(1):69-80.
48. Bloch F. Nuclear Induction. *Physical Review.* 1946;70(7-8):460-74.
49. Koonjoo N. Development of Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging in vivo : application to molecular imaging of proteolysis: Université de Bordeaux; 2015.

50. Kastler B. Chapitre 3 - Les phénomènes de relaxation. In: Kastler B, Vetter D, editors. *Comprendre L'IRM (Septième Édition)*. Paris: Elsevier Masson; 2011. p. 19-27.
51. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108(6):2064-110.
52. Mornet S. *Synthesis and chemical surface modification of maghemite nanoparticles for biomedical applications: Université Sciences et Technologies - Bordeaux I*; 2002.
53. Pinho SLC, Pereira GA, Voisin P, Kassem J, Bouchaud V, Etienne L, et al. Fine Tuning of the Relaxometry of γ -Fe₂O₃@SiO₂ Nanoparticles by Tweaking the Silica Coating Thickness. *ACS nano*. 2010;4(9):5339-49.
54. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito CA, Bengele HH, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*. 1990;175(2):489-93.
55. Berry CC, Curtis ASG. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys*. 2003;36(13):R198-R206.
56. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;307(1):93-102.
57. Di Marco M, Sadun C, Port M, Guilbert I, Couvreur P, Dubernet C. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *International journal of nanomedicine*. 2007;2(4):609-22.
58. Jacobin-Valat M-J, Laroche-Traineau J, Larivière M, Mornet S, Sanchez S, Biran M, et al. Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015;11(4):927-37.
59. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology*. 2001;219(2):316-33.
60. Briley-Saebo KC, Mani V, Hyafil F, Cornily J-C, Fayad ZA. Fractionated feridex and positive contrast: In vivo MR imaging of atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2008;59:721-30.
61. Briley-Saebo KC, Amirbekian V, Mani V, Aguinaldo JG, Vucic E, Carpenter D, et al. Gadolinium mixed-micelles: effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2006;56(6):1336-46.
62. Maiseyeu A, Mihai G, Kampfrath T, Simonetti OP, Sen CK, Roy S, et al. Gadolinium-containing phosphatidylserine liposomes for molecular imaging of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50(11):2157-63.
63. Yancy AD, Olzinski AR, Hu TC, Lenhard SC, Aravindhan K, Gruver SM, et al. Differential uptake of ferumoxtran-10 and ferumoxytol, ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agents in rabbit: critical determinants of atherosclerotic plaque labeling. *J Magn Reson Imaging*. 2005;21(4):432-42.
64. Sigovan M, Bousset L, Sulaiman A, Sappey-Marinié D, Alsaïd H, Desbleds-Mansard C, et al. Rapid-clearance iron nanoparticles for inflammation imaging of atherosclerotic plaque: initial experience in animal model. *Radiology*. 2009;252(2):401-9.
65. Sigovan M, Canet-Soulas E. Molecular MRI of Atherosclerosis with USPIO. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*. 2013;6.
66. Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, Otani H, Takahashi M, Murata K, et al. Atherosclerotic imaging using 4 types of superparamagnetic iron oxides: new possibilities for mannan-coated particles. *Eur J Radiol*. 2013;82(11):1919-25.

67. Jacobin-Valat MJ, Deramchia K, Mornet S, Hagemeyer CE, Bonetto S, Robert R, et al. MRI of inducible P-selectin expression in human activated platelets involved in the early stages of atherosclerosis. *NMR Biomed.* 2011;24(4):413-24.
68. Reynolds PR, Larkman DJ, Haskard DO, Hajnal JV, Kennea NL, George AJT, et al. Detection of Vascular Expression of E-selectin in Vivo with MR Imaging. *Radiology.* 2006;241(2):469-76.
69. Burtea C, Ballet S, Laurent S, Rousseaux O, Dencausse A, Gonzalez W, et al. Development of a Magnetic Resonance Imaging Protocol for the Characterization of Atherosclerotic Plaque by Using Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Apoptosis-Targeted Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Derivatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(6):e36.
70. Michalska M, Machtoub L, Manthey HD, Bauer E, Herold V, Krohne G, et al. Visualization of vascular inflammation in the atherosclerotic mouse by ultrasmall superparamagnetic iron oxide vascular cell adhesion molecule-1-specific nanoparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(10):2350-7.
71. Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R, Bogdanov A, Jr. Magnetic resonance imaging of inducible E-selectin expression in human endothelial cell culture. *Bioconjug Chem.* 2002;13(1):122-7.
72. Briley-Saebo KC, Nguyen TH, Saeboe AM, Cho YS, Ryu SK, Volkova ER, et al. In vivo detection of oxidation-specific epitopes in atherosclerotic lesions using biocompatible manganese molecular magnetic imaging probes. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(6):616-26.
73. Briley-Saebo KC, Cho YS, Shaw PX, Ryu SK, Mani V, Dickson S, et al. Targeted iron oxide particles for in vivo magnetic resonance detection of atherosclerotic lesions with antibodies directed to oxidation-specific epitopes. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(3):337-47.
74. El-Dakdouki MH, El-Boubbou K, Kamat M, Huang R, Abela GS, Kiupel M, et al. CD44 targeting magnetic glyconanoparticles for atherosclerotic plaque imaging. *Pharm Res.* 2014;31(6):1426-37.
75. Tarin C, Carril M, Martin-Ventura JL, Markuerkiaga I, Padro D, Llamas-Granda P, et al. Targeted gold-coated iron oxide nanoparticles for CD163 detection in atherosclerosis by MRI. *Sci Rep.* 2015;5:17135.
76. Qiao R, Qiao H, Zhang Y, Wang Y, Chi C, Tian J, et al. Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Vivo with Osteopontin-Specific Upconversion Nanoprobes. *ACS nano.* 2017;11(2):1816-25.
77. Schellenberger EA, Bogdanov A, Jr., Hogemann D, Tait J, Weissleder R, Josephson L. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Mol Imaging.* 2002;1(2):102-7.
78. Cheng D, Li X, Zhang C, Tan H, Wang C, Pang L, et al. Detection of vulnerable atherosclerosis plaques with a dual-modal single-photon-emission computed tomography/magnetic resonance imaging probe targeting apoptotic macrophages. *ACS applied materials & interfaces.* 2015;7(4):2847-55.
79. Winter PM, Morawski AM, Caruthers SD, Fuhrhop RW, Zhang H, Williams TA, et al. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with alpha(v)beta3-integrin-targeted nanoparticles. *Circulation.* 2003;108(18):2270-4.
80. Larivière M. Nanoparticles functionalized with human antibodies for multimodal molecular imaging of atherosclerosis: Université de Bordeaux; 2016.
81. SCHWARZ M, RÖTTGEN P, TAKADA Y, GALL FL, KNACKMUSS S, BASSLER N, et al. Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$

- designed by subtractive selection from naive human phage libraries. *The FASEB Journal*. 2004;18(14):1704-6.
82. Wang X, Palasubramaniam J, Gkanatsas Y, Hohmann JD, Westein E, Kanojia R, et al. Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. *Circ Res*. 2014;114(7):1083-93.
83. Bonnard T, Tennant Z, Niego B, Kanojia R, Alt K, Jagdale S, et al. Novel Thrombolytic Drug Based on Thrombin Cleavable Microplasminogen Coupled to a Single-Chain Antibody Specific for Activated GPIIb/IIIa. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(2).
84. Hanjaya-Putra D, Haller C, Wang X, Dai E, Lim B, Liu L, et al. Platelet-targeted dual pathway antithrombotic inhibits thrombosis with preserved hemostasis. *JCI insight*. 2018;3(15).
85. Lim B, Yao Y, Huang AL, Yap ML, Flierl U, Palasubramaniam J, et al. A Unique Recombinant Fluoroprobe Targeting Activated Platelets Allows In Vivo Detection of Arterial Thrombosis and Pulmonary Embolism Using a Novel Three-Dimensional Fluorescence Emission Computed Tomography (FLECT) Technology. *Theranostics*. 2017;7(5):1047-61.
86. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*: Academic press; 2013.
87. Hagemeyer CE, Alt K, Johnston APR, Such GK, Ta HT, Leung MKM, et al. Particle generation, functionalization and sortase A-mediated modification with targeting of single-chain antibodies for diagnostic and therapeutic use. *Nat Protocols*. 2015;10(1):90-105.
88. Ta HT, Prabhu S, Leitner E, Jia F, von Elverfeldt D, Jackson KE, et al. Enzymatic single-chain antibody tagging: a universal approach to targeted molecular imaging and cell homing in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2011;109(4):365-73.
89. Ta HT, Li Z, Hagemeyer CE, Cowin G, Zhang S, Palasubramaniam J, et al. Molecular imaging of activated platelets via antibody-targeted ultra-small iron oxide nanoparticles displaying unique dual MRI contrast. *Biomaterials*. 2017;134(Supplement C):31-42.
90. Schneewind O, Model P, Fischetti VA. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell*. 1992;70(2):267-81.
91. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*. 1999;285(5428):760-3.
92. Marraffini LA, Schneewind O. Anchor structure of staphylococcal surface proteins. V. Anchor structure of the sortase B substrate IsdC. *J Biol Chem*. 2005;280(16):16263-71.
93. Guimaraes CP, Witte MD, Theile CS, Bozkurt G, Kundrat L, Blom AE, et al. Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc*. 2013;8(9):1787-99.
94. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, et al. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;107(19):2453-8.
95. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, JM UK-I, et al. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(22):2039-50.
96. Qi C, Deng L, Li D, Wu W, Gong L, Li Y, et al. Identifying Vulnerable Atherosclerotic Plaque in Rabbits Using DMSA-USPIO Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Investigate the Effect of Atorvastatin. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125677.

97. Li Y, Liu J, Huang JW, Song JC, Ma ZL, Shi HB. In vivo MRI detection of atherosclerosis in ApoE-deficient mice by using tenascin-C-targeted USPIO. *Acta Radiol.* 2018;59(12):1431-7.
98. Wen S, Liu DF, Cui Y, Harris SS, Chen YC, Li KC, et al. In vivo MRI detection of carotid atherosclerotic lesions and kidney inflammation in ApoE-deficient mice by using LOX-1 targeted iron nanoparticles. *Nanomedicine.* 2014;10(3):639-49.
99. Gao S, van 't Klooster R, van Wijk DF, Nederveen AJ, Lelieveldt BPF, van der Geest RJ. Repeatability of in vivo quantification of atherosclerotic carotid artery plaque components by supervised multispectral classification. *Magma (New York, Ny).* 2015;28(6):535-45.
100. Coolen BF, Calcagno C, van Ooij P, Fayad ZA, Strijkers GJ, Nederveen AJ. Vessel wall characterization using quantitative MRI: what's in a number? *MAGMA.* 2018;31(1):201-22.
101. Fayad ZA, Razzouk L, Briley-Saebo KC, Mani V. Iron oxide magnetic resonance imaging for atherosclerosis therapeutic evaluation: still "rusty?". *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(22):2051-2.
102. Kuhlperter R, Dahnke H, Matuszewski L, Persigehl T, von Wallbrunn A, Allkemper T, et al. R2 and R2* mapping for sensing cell-bound superparamagnetic nanoparticles: in vitro and murine in vivo testing. *Radiology.* 2007;245(2):449-57.
103. Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Chauveau F, Lagarde F, et al. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T. *Eur Radiol.* 2010;20(2):275-85.
104. Tang TY, Patterson AJ, Miller SR, Graves MJ, Howarth SP, JM UK-I, et al. Temporal dependence of in vivo USPIO-enhanced MRI signal changes in human carotid atheromatous plaques. *Neuroradiology.* 2009;51(7):457-65.
105. Patterson AJ, Tang TY, Graves MJ, Muller KH, Gillard JH. In vivo carotid plaque MRI using quantitative T2* measurements with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a dose-response study to statin therapy. *NMR Biomed.* 2011;24(1):89-95.
106. Smits LP, Tiessens F, Zheng KH, Stroes ES, Nederveen AJ, Coolen BF. Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron-oxide (USPIO) enhanced MRI with ferumoxytol to quantify arterial wall inflammation. *Atherosclerosis.* 2017;263:211-8.
107. Millon A, Dickson SD, Klink A, Izquierdo-Garcia D, Bini J, Lancelot E, et al. Monitoring plaque inflammation in atherosclerotic rabbits with an iron oxide (P904) and (18)F-FDG using a combined PET/MR scanner. *Atherosclerosis.* 2013;228(2):339-45.
108. Sigovan M, Bessaad A, Alsaïd H, Lancelot E, Corot C, Neyran B, et al. Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE-/- mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* 2010;45(11):702-7.
109. Klug G, Kampf T, Ziener C, Parczyk M, Bauer E, Herold V, et al. Murine atherosclerotic plaque imaging with the USPIO Ferumoxtran-10. *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* 2009;14:2546-52.
110. Hugounenq P, Levy M, Alloyeau D, Lartigue L, Dubois E, Cabuil V, et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C.* 2012;116(29):15702-12.
111. Lartigue L, Hugounenq P, Alloyeau D, Clarke SP, Levy M, Bacri JC, et al. Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents. *ACS nano.* 2012;6(12):10935-49.
112. Hemery G, Genevois C, Couillaud F, Lacomme S, Gontier E, Ibarboure E, et al. Monocore vs. multicore magnetic iron oxide nanoparticles: uptake by glioblastoma cells and efficiency for magnetic hyperthermia. *Molecular Systems Design & Engineering.* 2017;2(5):629-39.

113. Lobatto ME, Fuster V, Fayad ZA, Mulder WJM. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(11):835-52.
114. Shen Z, Wu A, Chen X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol Pharm.* 2017;14(5):1352-64.
115. Adumeau L, Genevois C, Roudier L, Schatz C, Couillaud F, Mornet S. Impact of surface grafting density of PEG macromolecules on dually fluorescent silica nanoparticles used for the in vivo imaging of subcutaneous tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2017;1861(6):1587-96.

Matériels et Méthodes :

A. Production de l'agent de contraste ciblant :

1. Nanoparticules multimodales :

a. Supra-particules Colloïdales (SPC) :

i. Synthèse des particules :

La première partie de ce projet a permis la production et la caractérisation de nanoparticules multimodales dédiées à l'IRM et à l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge (PIR). Des SupraParticules Colloïdales (SPC) ont été produites à partir du procédé de synthèse précédemment décrit dans la thèse de Laurent Adumeau (1). Les SPC sont un assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$) en grappes. Un exemple de ce type de particules (après fonctionnalisation par des scFv) est schématisé sur la Figure 10.

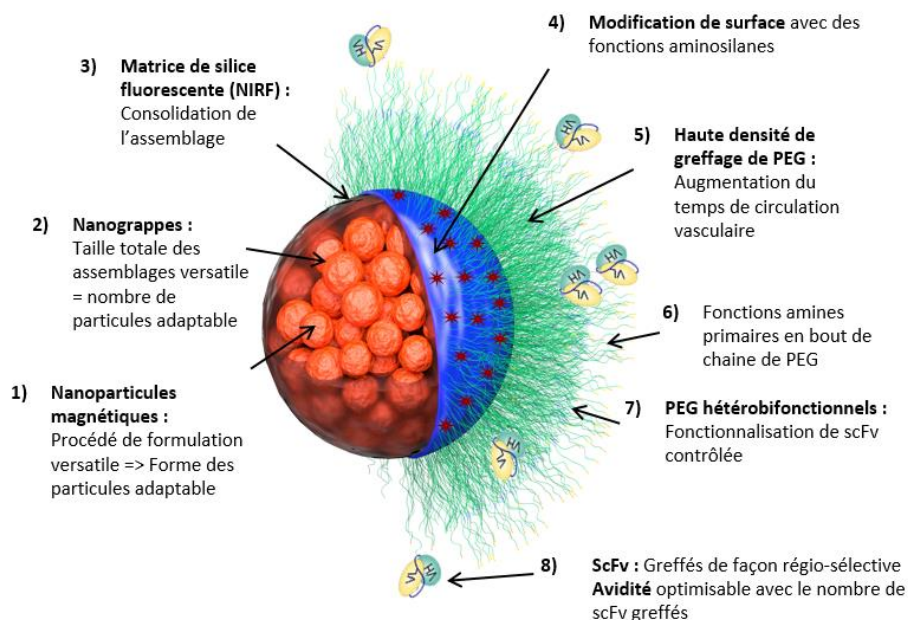


Figure 10: Schéma de Supra-particule Colloïdale (SPC) après fonctionnalisation par des scFv (figure adaptée de L. Adumeau (1))

Une première étape permet la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$) selon une méthode de co-précipitation alcaline décrite par Massart (2). Ces particules sont ensuite modifiées chimiquement en surface par ajout d'acides gras liés de façon covalente. Cette modification de surface permet la formation d'assemblages en grappes, suite à l'évaporation d'un solvant organique en phase aqueuse, après émulsification de l'ensemble. Ces assemblages sont consolidés par une fine couche de silice par voie sol-gel. La silice est dopée par des molécules fluorescentes dans le PIR durant sa formation (Cy3 et Cy7.5), puis fonctionnalisées en surface par des aminosilanes. Des chaînes macromoléculaires de polyéthylène glycol (PEG) sont greffées chimiquement en surface de chaque SPC consolidé, afin de prolonger leur temps de circulation vasculaire. Lors d'une dernière étape, la couronne macromoléculaire de PEG est fonctionnalisée par des amines primaires.

Les différentes étapes de synthèse de base sont schématisées sur la Figure 11.

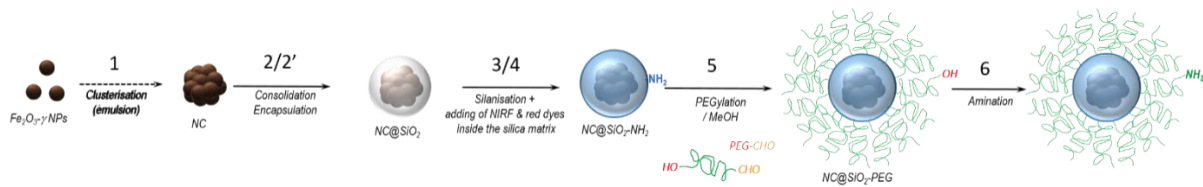


Figure 11: Étapes de synthèse de base des SPC

C'est à partir de cette base de formulation que le greffage de fragments d'anticorps sera par la suite réalisable.

b. Nanoflowers (NF) :

i. Synthèse des particules :

Ce type de particule a été synthétisé par Clément Vecco-Garda et Stéphane Mornet. Les nanofleurs magnétiques (NF) ont été synthétisées par voie polyol selon la méthode développée par Caruntu et al. en 2004 (3). La synthèse consiste en une hydrolyse forcée des précurseurs $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en milieu basique dans un mélange de polyol composé de diéthylène glycol et N-méthyl-diéthanolamine (NMDEA). Le mélange réactionnel est chauffé à 220°C pendant 4 h en appliquant une rampe de température de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ avec un régulateur de

température. La taille des nanoparticules obtenues dépend de la quantité d'eau ajoutée au début de la synthèse, de la rampe de température appliquée ou encore du temps de croissance à 220°C (4). La synthèse par méthode polyol permet d'obtenir des NPs d'oxyde de fer monodisperses en taille et bien cristallisées (5) en raison d'une température de réaction importante qui permet de séparer les paliers de nucléation et de croissance. Dans la suite, les conditions de synthèse sélectionnées permettent d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer γ -Fe₂O₃ de morphologie NF de 16 nm de diamètre.

ii. Protocole synthèse des NF

Une masse de 1,082 g de FeCl₂.4H₂O (5,44 mmol) et une de 0,398 g de FeCl₃.6H₂O (1,47 mmol) sont dissouts dans 80 g d'un mélange de diéthylène glycol (DEG) et de N-méthyl-diéthanolamine (NMDEA) (ratio 1:1, v/v). Cette solution est mélangée 1h sous flux d'azote sous agitation jusqu'à dissolution complète des précurseurs. Une masse de 0,64 g de NaOH (16 mmol) est dissoute dans 40 g d'un mélange NMDEA/DEG (1:1, v/v) sous flux d'azote. La solution de NaOH est ajoutée à la solution contenant les précurseurs et le mélange est chauffé à 220°C, à 2°C/min, pendant 4 h. Les nanoparticules obtenues sont sédimentées magnétiquement et lavées avec un mélange éthanol / acétate d'éthyle (1:1, v/v) trois fois pour éliminer les impuretés organiques et inorganiques. Un lavage à l'acide nitrique 10 % est réalisé. Une masse de 8,25 g de Fe₃(NO₃)₃.9H₂O (20,4 mmol) est solubilisé dans 20 mL d'eau et la solution est ajoutée aux nanoparticules. La dispersion de nanoparticules est chauffée à 80°C pendant 45 minutes pour obtenir de la maghémite γ -Fe₂O₃. Après décantation et élimination du surnageant, les nanoparticules sont lavées à l'acide nitrique 10 %, puis à l'acétone et finalement à l'éther diéthylique. Au final les nanoparticules sont redispersées dans l'eau.

Les NF sont par la suite encapsulées dans une couche de silice fluorescente, composée de deux fluorophores, l'un dans le proche infrarouge et l'autre dans le visible, pour les suivre par imagerie optique. Les fluorophores (cyanine 7.5 et la cyanine 3) sont incorporés dans la couche de silice de manière covalente (1, 6). Cette synthèse est basée sur le greffage covalent entre un fluorophore portant une fonction maléimide et un agent de couplage silanique organofonctionnel thiolé, le 3-mercaptopropyl)triméthoxysilane (MPS). Ensuite les organosilanes fluorescents sont condensés en présence de tétraéthylorthosilicate (TEOS) et des NF, en milieu hydro-alcoolique basique. Cependant pour les NF, il a été nécessaire de modifier

préalablement leur surface par adsorption d'acide citrique afin de les stabiliser en milieu hydro-alcoolique basique.

iii. Protocole d'encapsulation des NF par une couche de silice bi-fluorescente

Modification de surface des NF avec l'acide citrique pour les stabiliser en milieu hydro-alcoolique basique :

Dans un erlenmeyer de 250 mL, un volume de 30 mL d'une dispersion de NF dans l'eau (15 g/L en γ -Fe₂O₃, surface développée=36,3m²) et de 70 mL d'une solution d'acide citrique (14 g/L) sont ajoutés. Après 5 minutes d'agitation, les nanoparticules sont décantées magnétiquement et lavées 2 fois à l'eau ultrapure (18m Ω). Au final, les NF modifiées en surface avec des citrates, sont redispersées dans 30 mL d'eau ultrapure et peptisées en ajoutant 20 μ L de NH₄OH (30% v/v). A l'issue de cette modification de surface, les NF sont stables en milieu hydro-alcoolique basique.

Synthèse des organosilanes fluorescents avec la Cy 7.5 et la Cy3 :

Dans un tube de 5 mL, un volume de 100 μ L d'une solution à 2,5 mg/mL de cyanine 7.5-maléimide dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) anhydre (3,1 μ mol ; 1eq) est ajouté à 2,5 mL d'éthanol absolu. Un volume de 1,8 μ L de (3-mercaptopropyl)triéthoxysilane (MPS ; 12,4 μ mol ; 4 eq) est ajouté à la solution contenant le fluorophore. Le mélange est incubé 2 h à température ambiante au tourniquet et à l'abri de la lumière sous atmosphère inerte. Dans un second tube de 5 mL, un volume de 100 μ L d'une solution à 2,1 mg/mL de cyanine 7.5-maléimide dissout dans du DMSO anhydre (3,1 μ mol ; 1eq) est ajouté à 2,5 mL d'éthanol absolu. Un volume de 1,8 μ L de (3-mercaptopropyl)triéthoxysilane (MPS ; 12,4 μ mol ; 4 eq) est ajouté à la solution contenant le fluorophore. Le mélange est incubé 2 h à température ambiante au tourniquet et à l'abri de la lumière sous atmosphère inerte.

Encapsulation des NF dans une couche de silice bi-fluorescente :

Dans un ballon de 250 mL, un volume de 10,7 mL d'une dispersion de NF (C γ -Fe₂O₃ = 15,7 g/L) modifiées citrate est ajouté dans une solution contenant 150 mL d'éthanol, 40 mL d'eau et

3,2 mL d'ammoniaque (30% m/m). La dispersion est passée au bain à ultrasons pour bien homogénéiser les nanoparticules. Les deux organosilanes fluorescents sont mélangés avec 10 mL d'éthanol puis un volume de 350 μ L de TEOS est ajouté directement dans le milieu réactionnel. La réaction est laissée sous agitation mécanique, une nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Une couche de silice protectrice autour de la couche de silice fluorescente est formée autour des NF pour protéger les fluorophores de la dégradation, en ajoutant 400 μ L de TEOS dans le milieu réactionnel. Après une nuit sous agitation mécanique, les nanofleurs enrobées d'une couche de silice fluorescente NF@SiO₂:DF sont obtenues.

Au final, les nanoparticules obtenues (NF@SiO₂:DF) font 24 nm de diamètre et la présence des deux fluorophores est confirmée par le spectre d'absorption de l'échantillon. Le spectre d'absorption présente deux bandes d'absorption vers 490 nm et vers 790 nm correspondant respectivement à la Cy3 et Cy7.5.

c. Nanoparticules 2 nm (NP) :

iv. Synthèse des particules :

Le procédé de synthèse a été adapté selon une étude publiée par Vayssières et al. (7). Il est basé sur le principe de coprécipitation alcaline des sels ferreux et ferriques en milieu basique. La formation des nanoparticules est bloquée à l'état de germes d'environ 1,5-2 nm contre les mécanismes de croissance et de murissement d'Ostwald par la présence d'une forte concentration en contre-ions sodium et pour une condition de pH élevée (>14).

Une masse de 20,82 g de nitrate ferrique nonahydraté et une masse de 5,07 g de chlorure ferreux tétrahydraté sont dissoutes dans un volume de 400 mL d'une solution de nitrate de sodium à 3 mol/L. Sous forte agitation mécanique, 100 mL d'une solution de soude 5M sont ajoutés rapidement, puis laissé sous agitation pendant 15 minutes. Le flocculat de particules de magnétite est décanté grâce à un aimant pour éliminer le surnageant. Après 2 lavages à l'eau, 400 mL d'acide nitrique à 2 M sont ajoutés et laissés sous agitation pendant 15 minutes, afin d'oxyder la surface des particules. Après élimination du surnageant, 400 mL d'une solution de nitrate de fer à 0,33 M sont ajoutés pour oxyder en maghémite le cœur des particules. Le milieu réactionnel est porté à ébullition pendant 30 minutes. Après élimination du surnageant, 400 mL

d'acide nitrique à 2 M sont ajoutés. Le flocculat de particules est décanté magnétiquement puis lavé 3 fois avec 400 mL d'acétone pour retirer l'excès d'acide. Le flocculat est peptisé (dispersion stable des particules dans l'eau) dans 200 mL d'eau. Après évaporation de l'excès d'acétone, le volume de particules est ramené à 1 L avec de l'eau.

d. Modification de surface

Les nanoparticules SPC et les NF synthétisées ont été modifiées en surface avec un aminosilane, le N-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine (EDPS). Cette modification de surface optimisée est issue du brevet WO2004107368A2. Afin de modifier la surface des nanoparticules et de la saturer, l'EDPS est ajouté dans un milieu hydro-alcoolique, en large excès (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$). Dans un premier temps, le film polysiloxane est adsorbé à la surface de la nanoparticule par formation de liaisons hydrogènes entre les silanols du film et les silanols présents à la surface des nanoparticules. L'étape de chauffage sous vide dans le glycérol permet ensuite la poly-condensation des silanols ainsi que la libération des amines.

La modification de surface des NP de maghémite de 2nm a été réalisé selon un procédé développé à l'ICMCB actuellement en cours de brevet.

Protocole de modification de surface des SPC et des NF avec l'EDPS :

Un volume de 200 mL d'éthanol est ajouté à 200 mL d'une dispersion de nanoparticules dans l'eau, représentant une surface de 120 m^2 . Sous agitation, un volume de 3,89 ml d'EDPS (18 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Lors de l'ajout de l'EDPS, les nanoparticules flocculent. L'ensemble est laissé sous agitation durant 12 h, puis 100 mL de glycérol est ajouté. L'éthanol ainsi que l'eau sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Les nanoparticules dispersées dans le glycérol sont alors chauffées à 100°C durant 2 h sous vide. Après le traitement sous vide, 100 mL d'éthanol est ajouté puis l'ensemble est lavé à l'éthanol par ultrafiltration tangentielle à l'aide d'un filtre avec un seuil de coupure de 300 kDa. Après deux lavages, quelques gouttes d'acide acétique sont ajoutées afin de protoner les amines de surface. Trois autres lavages dans l'éthanol sont réalisés afin d'éliminer les traces de silane non greffé ainsi que l'excès d'acide acétique. Au final, un dernier lavage dans le méthanol est réalisé. Les nanoparticules nommées NP@SiO₂:DF-NH₃⁺ sont stockées dans le méthanol.

e. PEGylation

Afin d'augmenter le temps de circulation (6) des nanoparticules après injection intraveineuse, toutes les NPs ont été PEGylées à haute densité de greffage. Les densités de greffage obtenues varient entre 0,9 et 1,4 PEG/nm², selon le rayon de courbure des NPs et la masse moléculaire des PEG. Dans cette étude, du PEG de masse moléculaire 1000 g/mol et 4000 g/mol ont été utilisés. La densité de greffage en PEG est déterminée par test de Baleux. Le test de Baleux est un dosage colorimétrique basé sur la formation d'un complexe entre le PEG et l'iode suivie par spectrophotométrie.

Avant de réaliser le greffage du PEG sur les NPs aminées, les extrémités du PEG sont converties en aldéhyde par oxydation de Pftzner-Moffat qui permet l'oxydation ménagée d'un alcool primaire en aldéhyde. Le greffage des macromolécules de PEG fonctionnalisées par des aldéhydes (PEG-al) sur les NPs aminées en surface est réalisé par amination réductrice. Ce procédé de PEGylation optimisé est en cours de brevet.

f. Préparation à la fonctionnalisation des SPC :

De façon à générer des nanoparticules fonctionnalisées de manière site-spécifique, une technologie originale de greffage a été abordée, via l'action enzymatique de la sortase-A. Cette enzyme permet la liaison entre une séquence d'acides aminés LPETG portée par des anticorps humains recombinants (scFv) et la nanoparticule portant une autre séquence d'acides aminés tri-glycine (GGG). Ici, les ligands GGG sont conjugués par amidification aux nanoparticules sur les terminaisons amines du PEG.

Conjugaison de séquence d'acides aminés GGG sur les SPC@SiO₂:DF-PEG4k-NH₂

La conjugaison de la séquence d'acides aminés triglycine (GGG) sur les SPC@SiO₂:DF-PEG-NH₂ est réalisée selon un couplage 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide sulfonaté (EDC/sulfo-NHS) en utilisant un GGG protégé avec un groupement tert-butoxycarbonyle (Boc). Le GGG présentant une fonction acide carboxylique, est couplé de manière covalente à la surface aminé

des SPC@SiO₂:DF-PEG-NH₂. Dans un premier temps, l'acide carboxylique est activé avec l'EDC en présence de sulfo-NHS. L'ajout de sulfo-NHS permet de stabiliser l'intermédiaire formé en limitant l'hydrolyse de celui-ci. L'intermédiaire ester sulfo-NHS est plus stable et va réagir avec les amines pour former une liaison amide stable.

Trois taux de greffage en GGG ont été réalisés, correspondant à un nombre nominal de 35000 GGG/NPs, 8750 GGG/NPs et 3000 GGG/NPs.

Protocole

Trois solutions de sulfo-NHS, EDC et Boc-GGG-OH dans un tampon MES 10 mM pH=6,0 sont préparées. Les trois solutions sont mélangées dans des proportions molaires en Boc-GGG-OH/sulfo-NHS/EDC de 1/5/10. Après 25 minutes d'agitation à température ambiante, les SPC@SiO₂:DF-PEG-NH₂ dispersées dans un tampon PBS à pH =7,4, sont ajoutées à la solution contenant le Boc-GGG-OH, l'EDC et le sulfo-NHS. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 h à température ambiante, à l'abri de la lumière. Au final les SPC sont lavées à l'eau puis au dichlorométhane par centrifugation. La déprotection des GGG est réalisée en incubant les SPC dans une solution de DCM/TFA (50/50, v/v) à température ambiante pendant 30 minutes. Les nanoparticules sont ensuite lavées par centrifugation pour être au final redispersées dans un tampon PBS (8).

Les différentes étapes de synthèse des particules fonctionnalisables par voie enzymatique sont représentées sur la Figure 12.

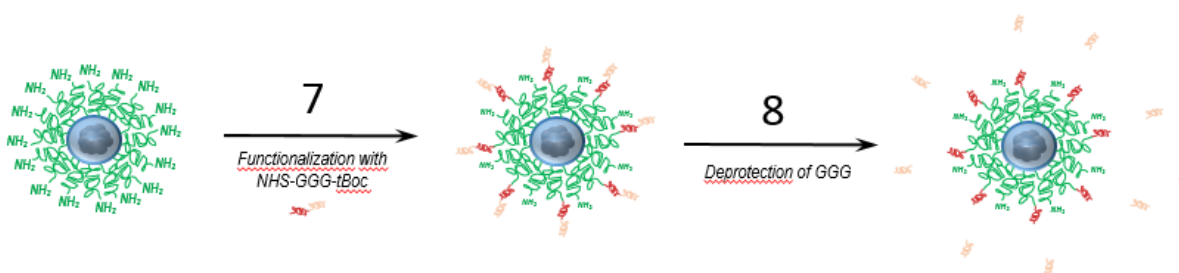


Figure 12: Etapes de synthèse des SPC fonctionnalisables par voie enzymatique

Dans le cadre d'une étude sur la fonctionnalisation de scFv sur les SPC, plusieurs lots de particules avec différents taux de greffage en GGG ont été produits en collaboration avec Clément Vecco-Garda. Ces différents lots produits sont schématisés sur la Figure 13.

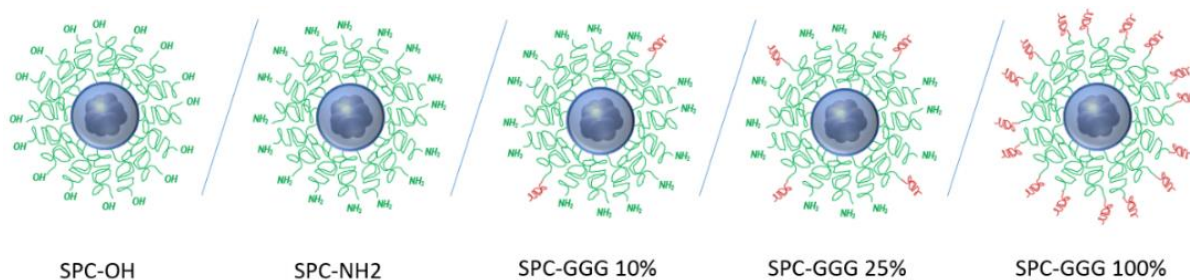


Figure 13: SPC synthétisées en vue d'une étude de fonctionnalisation site-spécifique de scFv par voie enzymatique

g. Caractérisation physico-chimique des particules :

Les caractéristiques physicochimiques de ces nanoparticules ont été déterminées à chaque étape de synthèse (mesures de taille hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière, et taille physique par microscopie électronique en transmission, mesures de relaxométrie par IRM, ...). Les mesures de taille et de concentration en fer ont été effectuées avec l'aide de Stéphane Mornet et de Clément Vecco-Garda (ICMCB).

i. Mesures de taille :

La taille physique et la morphologie des nanoparticules sont déterminées par microscopie électronique à transmission (MET). Elles sont déterminées sur un échantillon de 200 nanoparticules à l'aide du logiciel ImageJ. Le MET utilisé est le CM120 opérant à 120 kV (Philips).

Les images MET des SPC@SiO₂:DF et des NF@SiO₂:DF confirme l'encapsulation par une couche de silice homogène. L'agrégation bidimensionnelle sur la grille MET se produit lors de l'évaporation du milieu dispersant sur le film de carbone.

Le rayon hydrodynamique des nanoparticules est déterminé par Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS) en utilisant un appareil Cordouan Vasco composé d'un laser de longueur d'onde de 658 nm et à un angle de détection de 135°.

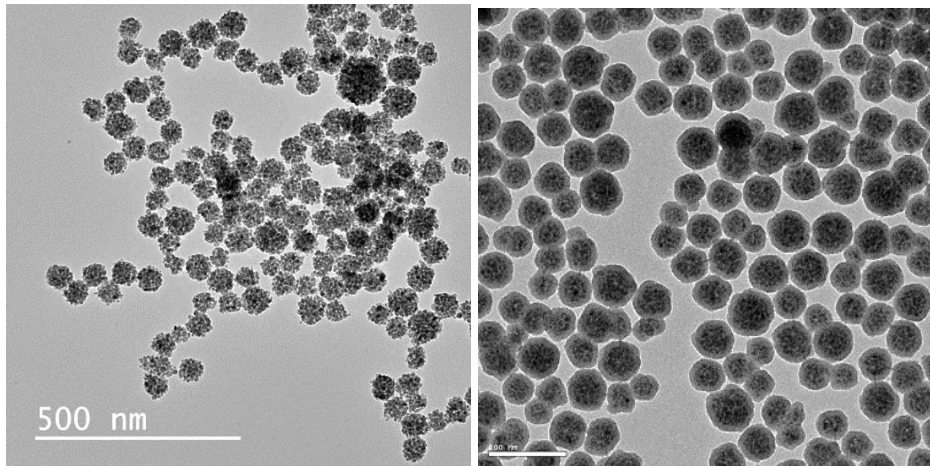


Figure 14: Images TEM de (gauche) SPC non encapsulées dans une couche de silice, (droite) SPC@SiO₂:DF

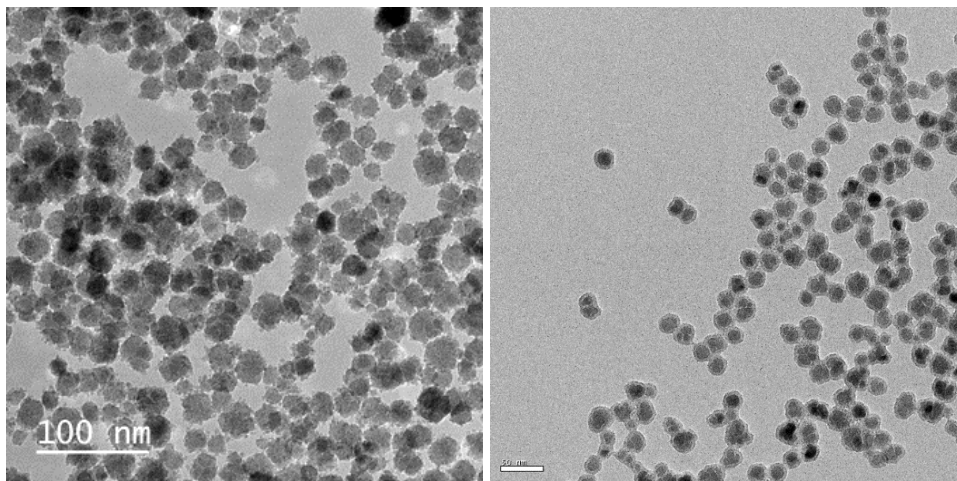


Figure 15: Images TEM de (gauche) NF, (droite) NF@SiO₂:DF

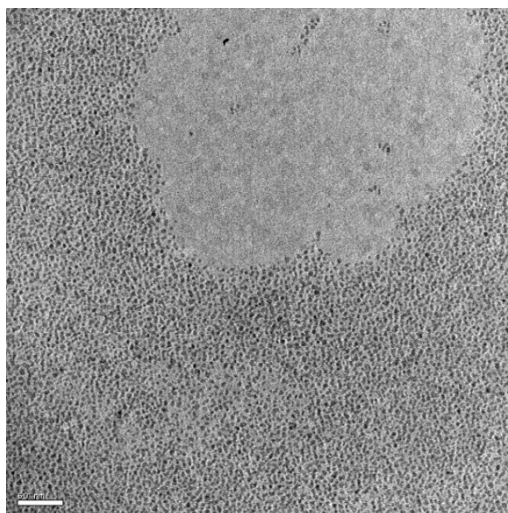


Figure 16: Image TEM de NP-2nm-PEG

La Table 1 résume les caractéristiques physiques de chaque nanoparticule.

	Diamètre du coeur magnétique (Fe₂O_{3-γ})	Epaisseur de la couche de silice fluorescente	Epaisseur de la couche de PEG	Diamètre total
SPC	77 nm : (Multidomaines magnétiques : ≈ 690 NP Fe ₂ O _{3-γ} de 7,5 nm)	12 nm	12 nm	125 nm
NF	16 nm : (Monodomaine magnétique)	4 nm	12 nm	48 nm
NP	2 nm : (Monodomaine magnétique)	-	9 nm	20 nm

Table 1: Résumé des caractéristiques physiques (taille) de chaque type de nanoparticules

ii. Dosage de concentration :

La méthode utilisée pour doser la concentration en fer est basée sur une réaction de complexométrie utilisant un indicateur coloré appelé orange de xylénol.

iii. Relaxométrie :

La relaxivité des agents de chaque contraste développé a été évaluée à l'aide d'un système imprimé en 3D qui a été conçu de façon à mesurer 8 concentrations différentes d'agent de contraste. Ce système est thermostaté via l'eau circulante provenant d'un bain marie (Figure 17).

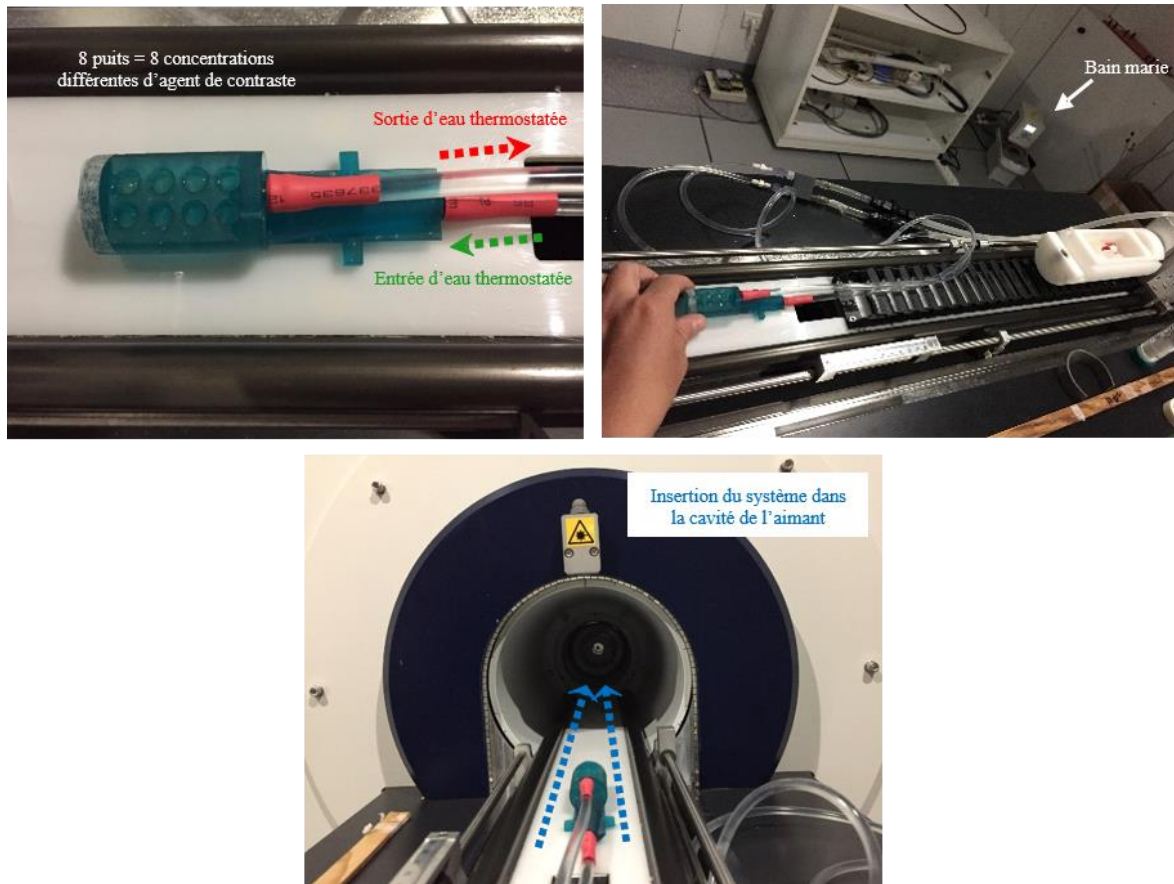


Figure 17: Système de mesure de relaxivité

Les particules ont premièrement été diluées de façon sérielle dans un mélange eau/agarose 1 %. Chaque point de concentration a été introduit dans un puits du système de relaxométrie (8 puits). Des mesures de relaxivités T1, T2 et T2* ont été effectuées à température ambiante et à 37°C.

Instrumentation :

Toutes les acquisitions ont été faites avec un spectromètre-imageur Bruker BioSpec System (Ettlingen, Allemagne) 47/20 opérant à 4,7 T.

Une antenne d'émission-réception volumique 059/035 fabriquée par Bruker a été utilisée (référence : T7817).

Séquences utilisées :

Séquence (Type)	RARE (T1)	MSME (T2)	MGE (T2*)
Orientation des coupes	Sagittal		
Temps de Répétition (TR)	867.5 ms	1000 ms	450 ms
Intervalle inter-TR	867.5 ms	-	-
Nombre de TR	6	-	-
Temps d'écho n°1 (TE1)	26 ms	8 ms	2.46 ms
Intervalle inter-écho (ΔTE)	6.5 ms	8 ms	3.07 ms
Nombre d'échos	-	10	11
Alpha	$90^\circ + 180^\circ$	$90^\circ + 180^\circ$	45°
Nombre d'excitation (NEX)	8	8	12
Bande passante (BW)	75.7 kHz	50 kHz	52 kHz
Nombre de coupes	10	10	10
Résolution	0.1 x 0.2 x 1 mm	0.1 x 0.15 x 1 mm	0.2 x 0.2 x 1 mm
Champ de vue (FOV)	25.6 x 38.4 mm	25.6 x 38.4 mm	25.6 x 38.4 mm
Temps d'acquisition	33 minutes	35 minutes	17 minutes

Table 2: Résumé des différents paramètres de séquences utilisées

Les analyses de relaxivité ont été faites à l'aide d'un algorithme écrit en langage Matlab.

L'algorithme d'ajustement utilisé est une méthode de régression non-linéaire écrite en C++ (méthode de Levenberg-Marquardt).

Les images de magnitude sont d'abord reconstruites. L'opérateur effectue des régions d'intérêts (ROI) sur chaque puits (et sur chaque coupe). Les valeurs de T1, T2 et T2* sont calculées pour chaque voxel segmenté.

Le taux de relaxation moyen ($R = 1/T$), exprimé en s^{-1} , est calculé pour chacun des puits. Les 8 taux de relaxation sont ensuite représentés en fonction de leur concentration respective en agent de contraste. Les concentrations sont ici exprimées en mM^{-1} de Fer.

La relaxivité (r), exprimée en $mM^{-1}.s^{-1}$, correspond alors à la pente de la droite tracée (Figure 18).

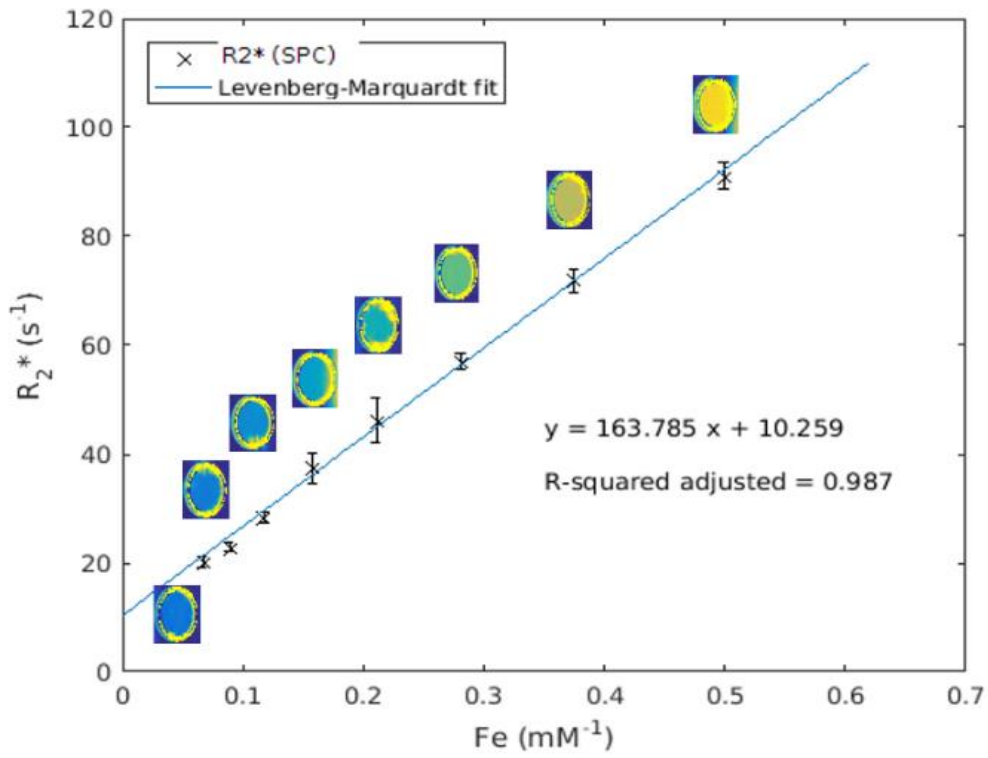
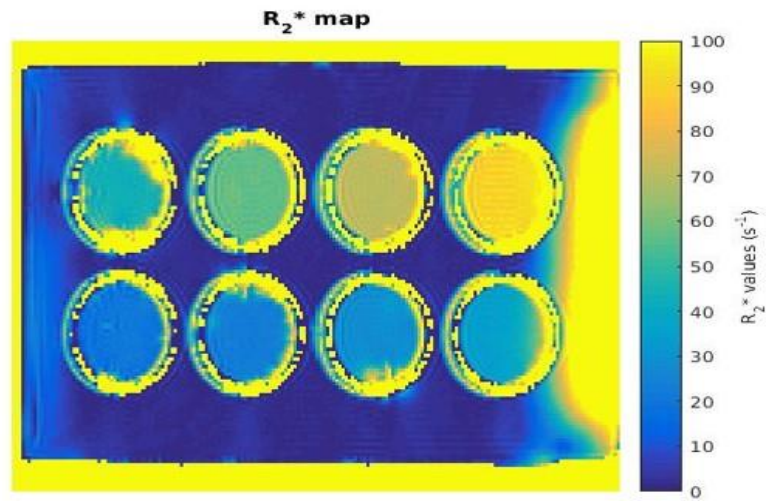


Figure 18: Exemple de résultat de mesure de relaxivité

2. Fragments d'anticorps recombinants (scFv) :

a. H2.1-LPETG :

L'équipe du RMSB possède de solides connaissances et un excellent savoir-faire concernant la technique de sélection d'anticorps appelée « phage-display ». Cette équipe a construit et testé différentes bibliothèques d'anticorps humains et ainsi identifié plusieurs anticorps d'intérêt dans le domaine des pathologies cardiovasculaires.

Un des anticorps ayant été sélectionné et identifié avant cette thèse est nommé H2.1.

H2.1 est un fragment recombinant d'anticorps humain (scFv) qui a une spécificité pour les plaques d'athérome à risque de rupture (9). Une séquence codant pour l'expression d'un enchaînement d'acides-aminés (LPETG) a été précédemment insérée dans le génome de ce scFv afin de permettre un greffage site-spécifique par voie enzymatique (Sortase-A).

i. Production :

Ce fragment d'anticorps humain (scFv) a été produit en culture cellulaire dans des cellules HEK 293 en suspension en milieu sans sérum (Freestyle 293, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) dans un incubateur à agitation horizontale à 37°C avec 8 % de CO₂. Les cellules ont été agitées continuellement durant toute la durée de production.

La croissance cellulaire a été menée jusqu'à une densité optimale de 2.10⁶ cellules/mL et une viabilité cellulaire minimale de 95 % avant la transfection. Des plasmides ont été transfectés dans les cellules (entre le 5^{ème} et le 30^{ème} passage) avec du polyéthylèneimine (PEI) (Polyscience Inc., Allemagne) concentré à 1 mg/mL. Le ratio de transfection a été fixé à 1 µg d'ADN:3µg PEI:1mL de volume de transfection. Ce mélange a été incubé à température ambiante durant 15 minutes puis ajouté dans le volume de culture cellulaire avant d'équilibrer la concentration finale de glucose à 6 g/L.

La culture a été maintenue durant 5 à 7 jours en veillant à ce que la viabilité cellulaire ne descende pas sous le seuil de 40 %. La concentration de glucose a été ajustée à chaque jour de production.

Le scFv produit a été isolé à partir du surnageant issu de la centrifugation des cellules (à 4000G, 15 minutes, 4°C).

ii. Purification :

Le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre à vide sur une membrane de 0,45 µm afin de supprimer les impuretés (débris cellulaires résiduels par exemple).

Le scFv, possédant un tag 6-Histidine en C-terminal, a été purifié par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) selon le protocole décrit dans la thèse de M. Larivière (10).

La purification a été effectuée sur un chromatographe Aktä purifier 100 (GE Healthcare, Uppsala, Suède). Le surnageant a été injecté dans une colonne Ni Sepharose HisTrap Excel de 5 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suède) préalablement équilibrée avec une solution tampon (A) (NaCl 0,5 M, Tris base 50 mM, pH 7,4). Un pré-lavage a été effectué à l'aide d'un gradient de 5 % tampon d'élution (B) (même composition que le tampon (A) + 0,5 M d'imidazole).

Différentes fractions ont finalement été éluées grâce à un gradient de 80 à 100 % de tampon d'élution (B).

iii. Caractérisation :

Les différentes fractions d'élution ont été testées sur gel d'électrophorèse (4-12%). Un dosage protéique selon la méthode Bicinchoninic Acid Assay (BCA kit – Sigma-Aldrich) a permis de déterminer la concentration de H2.1 produit. Ce scFv a finalement été testé par immunohistochimie sur des coupes d'aortes athéromateuses de souris et d'homme selon le protocole décrit dans l'article (11). Les sections incluses en paraffine ont été déparaffinées, réhydratées et une récupération d'antigènes induite par la chaleur a été réalisée avec un tampon Tris-EDTA pH9 selon les spécifications d'Abcam (Paris, France) (www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf). Les peroxydases endogènes ont ensuite été bloquées avec 3% de H₂O₂ dans l'eau, pendant 15 minutes. Après des lavages successifs dans du PBS1X + 0,025% de Triton (PBST), les sites non spécifiques ont été bloqués avec du PBS1X + 0,2% de Triton + 2% de sérum albumine bovine (BSA) pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, le H2.1- 6 His-LPETG a été incubé pendant une nuit à 4 ° C, dilué à 50 µg / mL dans du PBS1X + 1% de BSA. Le jour suivant, trois lavages au PBST ont été effectués. Pour détecter la liaison spécifique des fragments H2.1- 6 His-LPETG, un anticorps, spécifique du tag 6His, conjugué à la HRP (dilution de travail 1 : 250) a été appliqué sur les coupes pendant 1 h à température ambiante. Après trois autres lavages avec PBST, la réaction enzymatique colorimétrique a été réalisée en ajoutant le substrat de la peroxydase, le diaminobenzidine (DAB substrate kit, Eurobio / ABCys, LesUlis, France) à une solution de H₂O₂. Une coloration jaune

brun est obtenue dans les 10 minutes qui suivent, à température ambiante. Après un lavage dans du dH₂O pour arrêter la réaction enzymatique, les zones de marquage ont été révélées avec une solution d'hématoxyline. Les coupes ont ensuite été réhydratées et montées en milieu de montage (CliniSciences, France).

b. SCE5-LPETG :

Un autre fragment recombinant d'anticorps humain a été utilisé durant cette thèse. Il s'agit d'un scFv nommé SCE5.

Il a été identifié, produit, purifié et caractérisé selon les mêmes techniques décrites ci-dessus.

Ce scFv a été validé à plusieurs reprises dans les travaux menés par l'équipe de Christoph E. Hagemeyer (ACBD, Australian Center for Blood Disease, Melbourne) avec laquelle une collaboration est actuellement en cours (12-14).

Le SCE5 a été identifié comme un scFv spécifique de l' α IIb β 3 activée, qui est un marqueur moléculaire d'activation plaquettaire. Ce type d'anticorps est particulièrement adapté pour la détection de plaques athéromateuses hémorragiques (15).

3. Greffage des anticorps sur les particules

a. Greffage site-spécifique (Melbourne) :

i. Protocole de greffage :

L'équipe de Christoph Hagemeyer, basée à Melbourne en Australie (ACBD, Australian Center for Blood Diseases), possède un savoir-faire et une expertise concernant le greffage site-spécifique d'anticorps faisant intervenir l'action enzymatique de la sortase-A.

Le protocole décrit ci-dessous a été adapté d'après leurs travaux (8, 10) et d'après les conseils ayant été transmis durant une mobilité de six mois au sein de leur laboratoire. Le principe de base de greffage des scFv sur les particules d'oxyde de fer est schématisé sur la Figure 19.

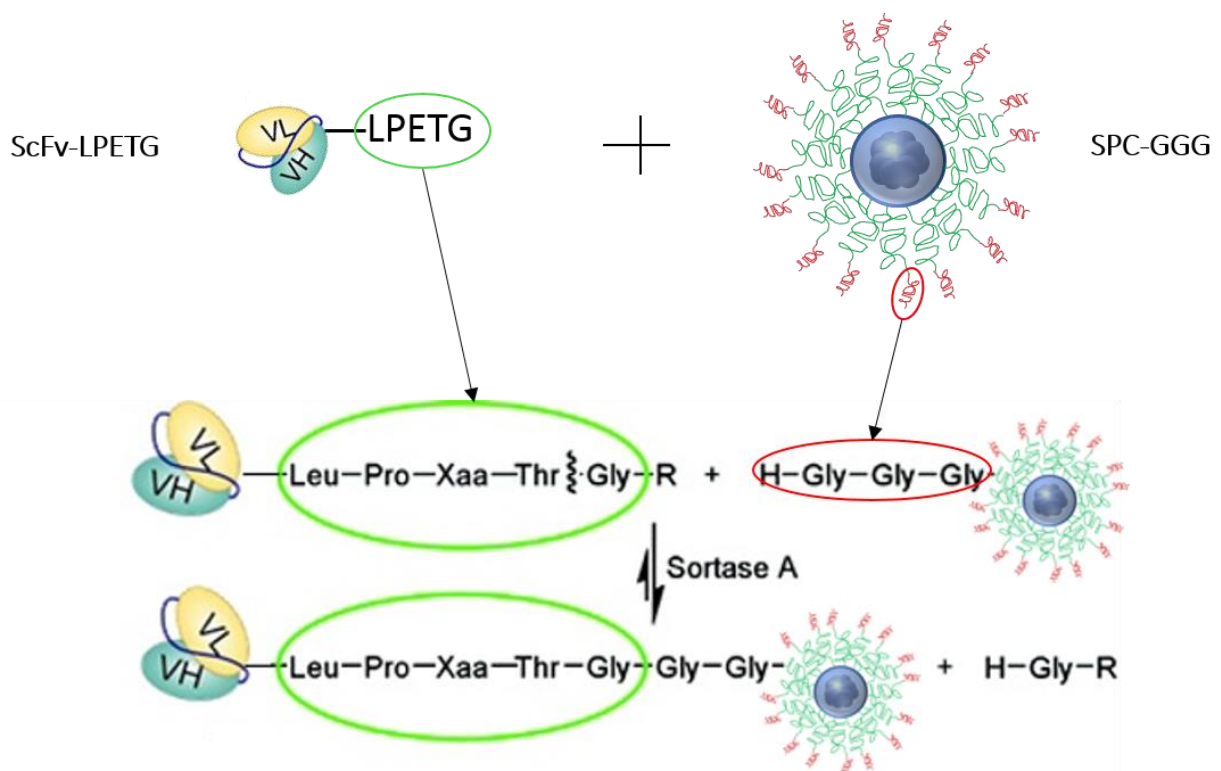


Figure 19: Principe de greffage des anticorps (scFv-LPETG) sur les particules d'oxyde de fer (SPC-GGG) via la méthode de greffage enzymatique (Sortase-A). Figure adaptée de Pritz et al., 2007, J. Org. Chem.

La sortase est une enzyme qui a été produite chez *E.coli*. (10). La réaction de greffage a été menée dans un milieu tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 8,0.

Les constituants du mélange réactionnel ont été ajoutés selon un ordre défini :

- 1- Tampon
- 2- scFv-LPETG
- 3- SPC-GGG
- 4- Sortase
- 5- CaCl₂ (C_f = 0,5 mM)

Les quantités de chaque constituant ont été calculées selon le ratio molaire de réaction. Le ratio molaire utilisé de manière usuelle dans l'équipe de Christoph Hagemeyer est un ratio 1 : 3 : 3, correspondant respectivement au nombre de moles de : scFv : GGG : Sortase.

Suite à l'observation de dimères dans le volume réactionnel en fin de greffage et en considérant la taille des particules, le ratio a été adapté.

Différents ratios ont été ainsi testés :

1 : 3 : 3 1 : 10 : 3 1 : 36 : 3 1 : 50 : 3

La réaction a été menée à 37°C sous une agitation horizontale pendant 3h.

Lorsque la sortase effectue une réaction de conjugaison entre le SCE5-LPETG et les SPC-GGG, le tag Histidine du scFv est clivé.

Les scFv n'ayant pas été impliqués dans une réaction de conjugaison et la sortase (également munie d'un tag His) sont éliminés à l'aide de billes de cobalt en fin de réaction. Ces billes de cobalt se fixent par affinité aux fragments Histidine dans le mélange réactionnel. 500 µL de billes (Talon His Tag Purification Resin, Clontech) ont été utilisées pour 1 mg de scFv impliqué dans le volume réactionnel.

Les billes ont été mises en contact avec le milieu réactionnel durant 3 h à 4°C sous agitation douce.

Le surnageant a été récupéré puis purifié sur colonne magnétique (Millipore, seuil de 10 kDa).

ii. Gels d'électrophorèse SDS-PAGE :

Pour chaque étape de greffage, 50 μL du volume réactionnel a été prélevé et mélangé avec un tampon Laemmli 4X et du β -Mercaptoethanol. Ce mélange a été chauffé à 90°C pendant 5 minutes puis finalement déposé sur un gel pour une analyse qualitative SDS-PAGE. Après migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (Bio-Rad) puis décoloré pendant plusieurs heures afin de révéler les bandes de migration. Un scFv mutant du SCE5, produit également par l'équipe de C. Hagemeyer, a été utilisé comme contrôle négatif pour chaque étape de conjugaison. Les gels ont permis de mettre au point et de contrôler de manière qualitative le procédé de greffage.

iii. Cytométrie en flux :

Étude de fixation non spécifique :

Des études de fixation non-spécifiques des différentes particules décrites sur la Figure 13 ont été effectuées par un protocole de cytométrie en flux.

Les particules ont été incubées avec des plaquettes activées selon le protocole décrit dans la publication de Bonnard et al. (12).

Les plaquettes ont été isolées à partir de prélèvements de sang dans des tubes citratés (3,2% v/v). Le sang a été centrifugé à 180 G pendant 10 minutes à température ambiante. Le plasma riche en plaquettes (PRP), situé au niveau du surnageant a été prélevé.

Le PRP a été dilué avec du PBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de façon à obtenir environ $5 \cdot 10^7$ plaquettes par mL. Les plaquettes ont ensuite été activées par l'ajout de 20 μM d'ADP, suivi d'une incubation de 5 minutes à température ambiante.

Deux concentrations de particules ont été testées :

A : $1,7 \cdot 10^{11}$ SPC / mL (correspondant à un ratio théorique de greffage : 1 : 10 : 3)

B : $8,6 \cdot 10^{11}$ SPC / mL (correspondant à un ratio théorique de greffage : 1 : 50 : 3)

Les particules ont été incubées avec les plaquettes activées dans l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être fixées avec 200 μL de CellFix 1X (BD Biosciences, Franklin Lakes, États-Unis).

Le CD62P-PE (BioLegend, San Diego, Canada) est un anticorps de souris anti-P-selectin humaine (protéine exprimée par les plaquettes activées) de format IgG et marqué à la phycoérythrine (PE). Il a été utilisé comme contrôle positif de l'activation des plaquettes.

Le cytomètre en flux qui a été utilisé est un BD LSR Fortessa. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 561nm et 582 nm.

Étude de fixation spécifique :

La fixation spécifique des SPC-SCE5 a été étudiée par cytométrie en flux sur des plaquettes activées.

Le SCE5 et son contrôle négatif (mutant-SCE5) ont été greffés sur des SPC-GGG 10 % et des SPC-GGG 100 % en suivant le protocole de greffage décrit précédemment avec un ratio de 1 : 36 : 3.

La concentration de particule testée a été fixée à $6,1 \cdot 10^{11}$ SPC-SCE5 / mL.

La préparation de chaque échantillon a ensuite été la même que le protocole utilisé pour l'étude de fixation non spécifique.

Le CD62P-PE (BioLegend, San Diego, Canada) a été utilisé comme contrôle positif de l'activation des plaquettes. L'anticorps SCE5 seul et l'anticorps mutant seul ont été testés sur les plaquettes activées. Le SCE5 et son contrôle négatif (mutant-SCE5) possèdent dans leur structure protéique une séquence d'acides aminés appelée V5 qui peut être ciblée par un anticorps secondaire anti-V5 marqué au FITC.

Un anticorps commercial (Abciximab = Reopro®) dirigé contre l' α IIB β 3, bloquant les sites de liaisons du SCE5 par compétition, a été utilisé afin de valider la fixation spécifique du SCE5 sur les plaquettes activées.

Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo version 7.6.5. Les intensités de fluorescence ont été exprimées en moyennes géométriques normalisées.

b. Greffage avec fonctions ester de NHS – amines primaire (Bordeaux) :

La bioconjugaison des scFv à la surface des NF@SiO₂:DF-PEG-NH₂ est réalisée par un couplage maléimide/thiol. Dans un premier temps, une fonction thiol est ajoutée aux scFv en utilisant le 2-iminothiolane(2-IT) dans des conditions expérimentales optimisées pour obtenir une fonction thiol par scFv. La thiolation est réalisée dans un tampon borate dégazé avec un excès molaire de 20 en 2-IT.

Le maléimide est une fonction réagissant avec les fonctions thiols à pH neutre pour former des liaisons covalentes par addition de Michael. Les fonctions maléimides sont ajoutées à la surface des NPs en ajoutant un bras espaceur PEG hétérobifonctionnel possédant une fonction ester de NHS et une fonction maléimide. La fonction ester de NHS permet de réagir avec les fonctions amines présentes en surface des NF-PEG. La fonction maléimide permet de réaliser le couplage avec les thiols des scFv. La réaction de couplage est réalisée à pH=7 dans un milieu dégazé pour limiter l'hydrolyse des maléimides en acide malique et la formation de ponts disulfures.

i. Protocole de greffage : (du SCE5 sur les nanoflowers uniquement)

Greffage du PEG hétérobifonctionnel ester de NHS/maléimide (NHS-PEG2k-mal) : La quantité de PEG hétérobifonctionnel ajouté correspond à 10 fois la quantité d'amines présentes sur les nanoparticules. Le PEG est solubilisé dans la dispersion de nanoparticules dans un tampon HEPES 25mM à pH=7,8. Le couplage est réalisé 2 h sous agitation à température ambiante à l'abri de la lumière. Après 2 h, les nanoparticules sont lavées à 4 reprises par centrifugation avec du tampon HEPES 25mM dégazé à pH=7,0, afin de limiter l'hydrolyse des maléimides.

Thiolation des scFv : Une fonction thiol est ajoutée aux scFv en utilisant le 2-iminothiolane (2-IT) qui permet de convertir les amines en thiols. Dans notre cas, on se place à un excès molaire de 20 en 2-IT pour obtenir une fonction thiol par scFv. La quantité de 2-IT est ajoutée à une solution de scFv solubilisés dans un tampon borate 0,2M dégazé à pH=8,0. La réaction est poursuivie pendant 2 h à 4°C. Puis les scFv-SH sont lavés 4 fois en utilisant un tube d'ultrafiltration (millipore) avec un seuil de coupure de 10kDa avec du tampon HEPES 25mM dégazé à pH=7,0.

Greffage des scFv-SH sur les nanoparticules-PEG-mal : A la fin des lavages, la quantité de scFv-SH souhaitée est ajoutée à la dispersion de nanoparticules dans le tampon HEPES 25mM dégazé à pH=7,0. La réaction se poursuit une nuit à 4°C. Puis les nanoparticules sont dialysées

dans des tubes (Spectrum Lab) possédant un seuil de coupure de 300kDa contre un tampon PBS à pH=7,4.

Une gamme de greffage a été effectuée par Clément Vecco-Garda selon différents ratios théoriques de scFv greffés par particule (NF) :

scFv /NF ; 0,6 scFv/NF ; 1,6 scFv/NF ; 3,3 scFv/NF ; 4,9 scFv/NF ; 6,5 scFv/NF

ii. Gels d'électrophorèse SDS-PAGE :

Le rendement de greffage du SCE5 sur les NF a été évalué pour chaque point de gamme par une analyse quantitative SDS-PAGE. Un volume contenant une quantité connue de scFv (quantité totale dans le milieu réactionnel) a été prélevée pour chaque point en fin de réaction. Le protocole de préparation des échantillons avant dépôt sur gel est le même que celui décrit précédemment. Après migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie pendant 1h (Bio-Rad) puis décoloré pendant une nuit afin de révéler les bandes de migration.

L'intensité des bandes de migration de chaque échantillon a été évaluée à l'aide d'un imageur BioRad ChemiDocX RS+ et du logiciel Image Lab 5.1. Le gel a été imagé avec une lumière blanche, un filtre standard. La sensibilité de détection a été paramétrée à 50 %.

La mesure du rendement de greffage a été effectuée par comparaison des intensités de bandes de migration de chaque point, à celles issues d'une gamme étalon de SCE5 déposée sur le même gel.

iii. Étude de l'activité des Nanoflowers fonctionnalisés :

Culture cellulaire :

Une lignée cellulaire CHO, adhérente, exprimant à sa surface l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sous sa conformation activée, gracieusement fournie par le Dr Hagemeyer estensemencée à raison de 60.10^6 cellules/L, dans un flacon de culture cellulaire 25 cm² (Dominique Dutcher, Brumath, France) et dans un milieu DMEM W/GLUTAMAX complété avec 10 % de sérum de veau foetal, 1 % de pénicilline-streptomycine, 1 % de L-Glutamine, 1 % de NEAA et 400 mg/L de geneticin. Tous les produits proviennent de Fisher Scientific (Illkirch, France). Les flacons sont placés dans un incubateur (modèle 3541, Thermoscientific, Bordeaux, France), régulé à 37°C, sous une atmosphère de 5% de CO₂.

Lorsque les cellules sont à confluence, au bout de 48 heures à 60 heures, le milieu est éliminé et les cellules adhérentes sont lavées avec 5 mL de PBS (Eurobio, les Ulis, France).

Les cellules sont ensuite détachées du support, sous l'action de 3 mL de trypsine (trypsine – EDTA, Fisher Scientific) et incubées pendant environ 3 minutes à 37°C. L'action de l'enzyme est stoppée par ajout de 5 mL de milieu de culture frais contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal. La suspension est centrifugée dans un tube conique (200 g, 7 minutes) et le culot cellulaire repris dans du milieu.

Cytométrie en Flux :

Les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez puis re-suspendues à raison de 1×10^9 cellules/L dans un tampon PBS 2% (v/v) de sérum de veau fœtal. Cent microlitres de cellules sont ajoutés à chacun des échantillons suivants : 10 μ L de l'anticorps SCE5 spécifique de l'intégrine α IIb β 3 activée (410 mg/L), 100 μ L de la préparation des Nanoflower-SCE5 (12.25 mM de fer et 42.1 mg/L de SCE5), 100 μ L de Nanoflower non couplées. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'anticorps secondaire anti-V5-FITC (ThermoFisher Scientific) dilué au 1/500 est additionné. Trente minutes plus tard, 500 μ L de PBS sont ajoutés, les cellules sont centrifugées et le culot est repris dans 200 μ L de PBS-1% PFA. L'analyse est réalisée au cytomètre de flux BD FACS Canto II (BD Bio Sciences, Franklin Lake, USA).

Les données ont été analysées avec le logiciel BD FACSDiva.

B. Acquisition des données IRM et méthode de post-traitement d'images :

1. Modèle animal :

Des souris ApoE -/- B6.129P2-ApoE^{tm1Unc/J} femelles âgées de 6 semaines ont été obtenues auprès des laboratoires Charles River (Saint Germain Nuelles, France). Ce modèle de souris a suivi un régime hypercholestérolémiant jusqu'à l'âge de 8 mois (Régime Western 1635 + 0,15 % cholestérol, Safe Diets, Augy, France) pour permettre le développement des lésions athérosclérotiques aortiques allant de la crosse aortique jusqu'à l'aorte abdominale. Le protocole d'étude a été approuvé sous le N° 50120192-A par le comité d'éthique animale de Bordeaux (France).

Un protocole d'imagerie paramétrique par résonance magnétique (IRM) de la plaque d'athérome a été développé à partir de ce modèle de souris (âgé de 8 mois).

2. Protocole d'imagerie

a. Objectif :

Quantifier le T2* de la plaque d'athérome chez un modèle de souris ApoE-/-, dans le cadre de l'évaluation de l'accumulation d'agents de contraste super-paramagnétiques au cours du temps.

b. Généralités :

Le protocole est basé sur deux étapes majeures :

- 1 - Une acquisition de données d'imagerie par résonance magnétique (IRM) à partir d'un modèle de souris ApoE-/-
- 2 - Un post-traitement de ces données permettant la reconstruction d'images, la segmentation de la plaque d'athérome, suivi de la mesure quantitative du T2* des voxels segmentés.

c. Acquisition des données :

Les souris ont été imagées à partir de l'âge de 8 mois. Dans le cadre de l'évaluation de l'accumulation d'agents de contraste super-paramagnétiques au cours du temps, le développement d'une méthode d'acquisition de données permettant un suivi longitudinal robuste du T2* de la plaque d'athérome a dû être mis en place.

i. Instrumentation :

Toutes les acquisitions ont été réalisées avec un spectromètre-imageur Bruker BioSpec System (Ettlingen, Allemagne) 47/20 opérant à 4,7 T.

L'antenne d'émission de radiofréquences utilisée est une antenne volumique 112/86 fabriquée par Bruker (référence : T20000V3).

L'antenne de réception utilisée est une antenne surfacique multicanaux de type « tête de rat » fabriquée par Bruker (référence : T13014V3).

ii. Procédure d'acquisition :

Chaque souris a été anesthésiée avec 4% d'isoflurane et a été positionnée sur un lit chauffé permettant de maintenir leur température interne à 37°C durant les scans. Le débit d'isoflurane a été maintenu à 1,5% durant la période d'acquisition et la fréquence respiratoire a été ajustée en permanence entre 45 et 50 respirations / minutes.

L'antenne de réception a été placée en contact avec la partie dorsale de la souris en veillant à ce qu'aucun espace ne soit situé entre la peau de la souris et l'antenne. Le milieu de l'antenne a été centré par rapport au niveau thoraco-abdominal de chaque souris.

La position de chaque souris a été ajustée au centre de l'aimant à l'aide d'images de magnitudes représentant des coupes anatomiques dans les trois directions de l'espace. Ces images ont été obtenues à partir d'une séquence Flash (écho de gradient) avec synchronisation respiratoire activée.

Cette séquence a été suivie de trois autres séquences Flash multi-coupes effectuées selon des directions coronale, axiale et sagittale respectivement. Les images de magnitude résultantes ont été utilisées de manière à orienter manuellement les coupes de la séquence finale.

Les coupes ont été orientées de façon perpendiculaire à l'aorte de la souris et ont été positionnées au niveau de la base des poumons (Figure 20).

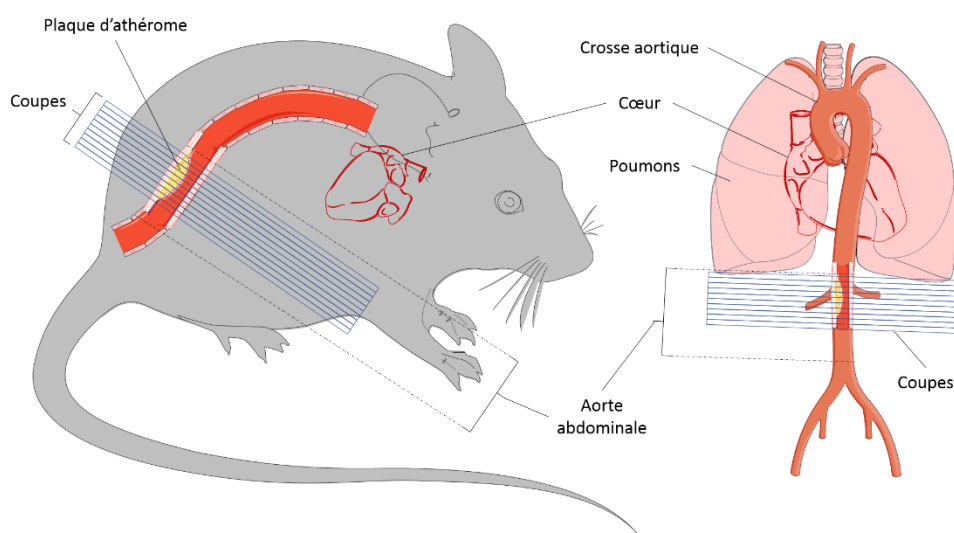


Figure 20: Schéma du positionnement des coupes

Une carte de champ B0 a été effectuée au niveau de l'aorte avant chaque séquence finale avec la synchronisation respiratoire activée. Cette carte de champ B0 permet au spectromètre-imageur de corriger localement les hétérogénéités macroscopiques de champ magnétique dans le sens des coupes. Une séquence multi-écho de gradient multi-coupes est finalement effectuée avec la synchronisation respiratoire activée.

Une procédure d'acquisition détaillée est visible en annexe n°1 pour plus d'informations.

Les paramètres de chaque séquence utilisée sont reportés dans la Table 3 .

iii. Paramètres des séquences utilisées :

Séquence (Type)	Flash (Echo de gradient) multi-coupes				Multi-Échos de Gradient (MGE) multi-coupes
Orientation des coupes	- Axiale - Sagittale - Coronale	Coronale	Axiale	Sagittale	Axiale
Temps de Répétition (TR)	40,0 ms	68,0 ms	158 ms	68,0 ms	- 650,0 ms (TR minimal) - 1300 ms (TR effectif, à FR 45-50, entre chaque respiration)
Temps d'écho n°1 (TE1)	2,10 ms	3,84 ms	3,84 ms	3,84 ms	2,86 ms
Intervalle inter-écho (ATE)	-	-	-	-	3,66 ms
Nombre d'échos	1	1	1	1	15
Alpha	35°	30°	30°	30°	60°
Nombre d'excitation (NEX)	2	2	2	2	8
Bande passante (BW)	50,0 kHz	50,0 kHz	50,0 kHz	50,0 kHz	89,2 kHz
Nombre de coupes	3 (= 1 coupe dans chaque plan de l'espace)	8	20	8	10
Résolution	0,195 x 0,195 x 1 mm ³	0,156 x 0,156 x 1 mm ³	0,156 x 0,156 x 1 mm ³	0,156 x 0,156 x 1 mm ³	0,100 x 0,100 x 1 mm ³
Champ de vue (FOV)	50 x 50 mm	40 x 30 mm	30 x 30 mm	40 x 30 mm	25,6 x 16 mm
Synchronisation respiratoire (triggering)	Oui Délai de départ : 250 ms Durée maximale d'acquisition : 640 ms	Oui Délai de départ : 250 ms Durée maximale d'acquisition : 640 ms	Oui Délai de départ : 250 ms Durée maximale d'acquisition : 640 ms	Oui Délai de départ : 250 ms Durée maximale d'acquisition : 640 ms	Oui Délai de départ : 250 ms Durée maximale d'acquisition : 640 ms
Options (modules activés)	-	-	-	-	- Saturation de flux (bande de saturation placée au niveau du coeur = sang artériel noir) - Suppression du signal de la graisse (opposition de phase) - Destruction de l'aimantation transversale résiduelle (RF spoiling)
Mode d'acquisition	-	-	-	-	Échos issus de gradients positifs uniquement (positiveReadOutEchoes)
Temps d'acquisition	1 minute	1 minute 30	4 minutes	1 minute 30	25 – 30 minutes

Table 3: Paramètres des séquences utilisées dans le protocole d'imagerie

iv. Séquence Multi-échos de gradients :

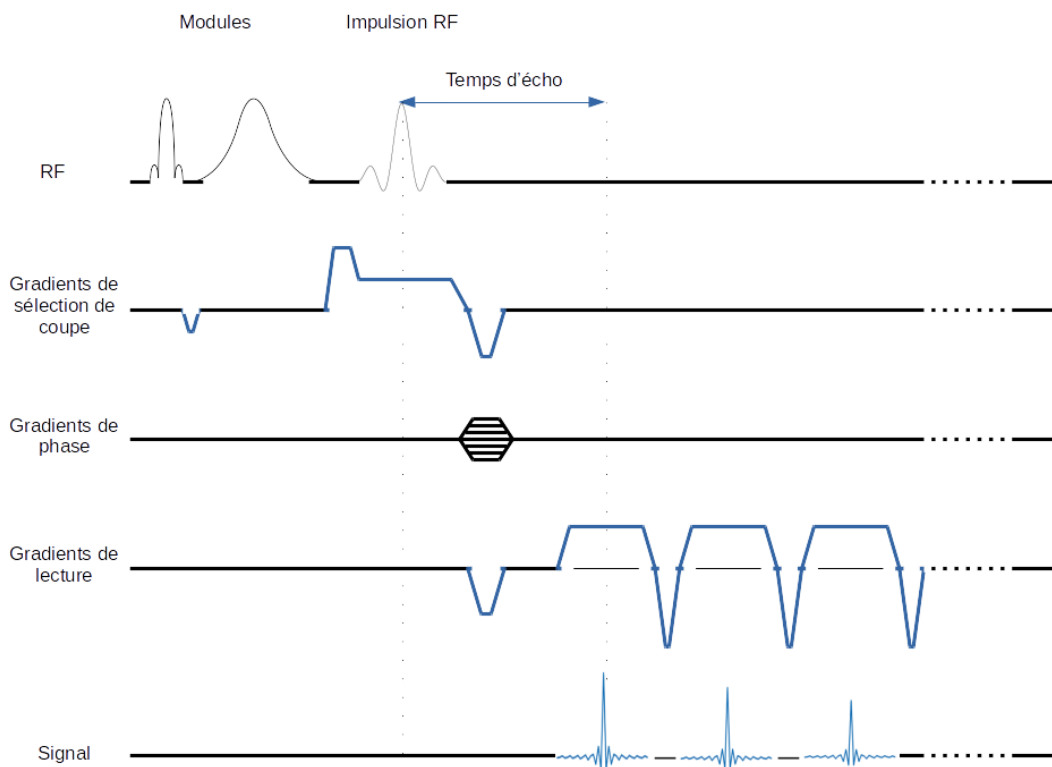


Figure 21: Chronogramme de la séquence multi-échos de gradient

Principe :

Une séquence multi-échos de gradient consiste en une excitation sélective de coupe suivie par un train d'échos de gradient. Ce train d'écho est produit par l'inversion successive de la polarité des gradients de lectures. Les échos issus d'un train d'échos commun sont codés de manière identique en phase.

Le détail du fonctionnement de la séquence est visible en annexe n°2.

Modules activés :

Synchronisation respiratoire (module « Trigger »):

La synchronisation respiratoire est activée durant la séquence (Figure 22).

L'acquisition des données n'est permise qu'entre chaque respiration de la souris.

Son intérêt peut être résumé en deux points :

1 – Limitation des artefacts de mouvements :

Les mouvements respiratoires peuvent engendrer des artefacts d'images qui sont délétères en imagerie quantitative. Lors d'une anesthésie sous isoflurane, la fréquence respiratoire de la souris diminue et laisse apparaître des intervalles durant lesquels certains organes internes ne bougent plus (périodes d'apnées).

Il est ici admis qu'entre chaque respiration, les mouvements éventuels de la portion d'aorte abdominale imagée sont fortement minimisés.

➤ Procédures d'instructions d'acquisition du signal :

- Une instruction de départ d'acquisition du signal est envoyée au scanner 250 ms après la détection de fin d'un mouvement respiratoire (délai fixé dans le logiciel de monitoring respiratoire).

Ce délai permet de s'affranchir de toute acquisition de données durant la respiration.

- Une durée maximale d'acquisition a été arbitrairement fixée à 640 ms afin de s'assurer que des données ne soient pas acquises durant la respiration suivante.

L'intervalle d'acquisition du signal ainsi imposé au scanner se situe au milieu de la période d'apnée de la souris.

2 – Gain de signal grâce à l'allongement des TR :

Lorsque la synchronisation respiratoire est activée, l'intervalle de temps entre chaque cycle respiratoire conditionne l'acquisition de signal.

Dans les conditions expérimentales fixées (45-50 cycles respiratoires par minute), le TR effectif de la séquence est allongé comparé à son TR réel (TR effectif = 1300 ms contre TR réel = 650 ms). Plus un TR est long, plus la magnitude longitudinale durant la phase de relaxation va être grande. A temps de relaxation équivalent, le signal basculé dans le plan transverse lors de la phase d'excitation suivante sera alors plus intense pour une séquence avec un TR long, que pour une séquence avec un TR court.

Malgré un allongement du temps total de séquence, l'utilisation de la synchronisation respiratoire peut, dans ce cas, être bénéfique car elle permet d'obtenir un gain de signal capté par l'antenne de réception. Le rapport signal/bruit (SNR) des images est donc amélioré dès le premier écho.

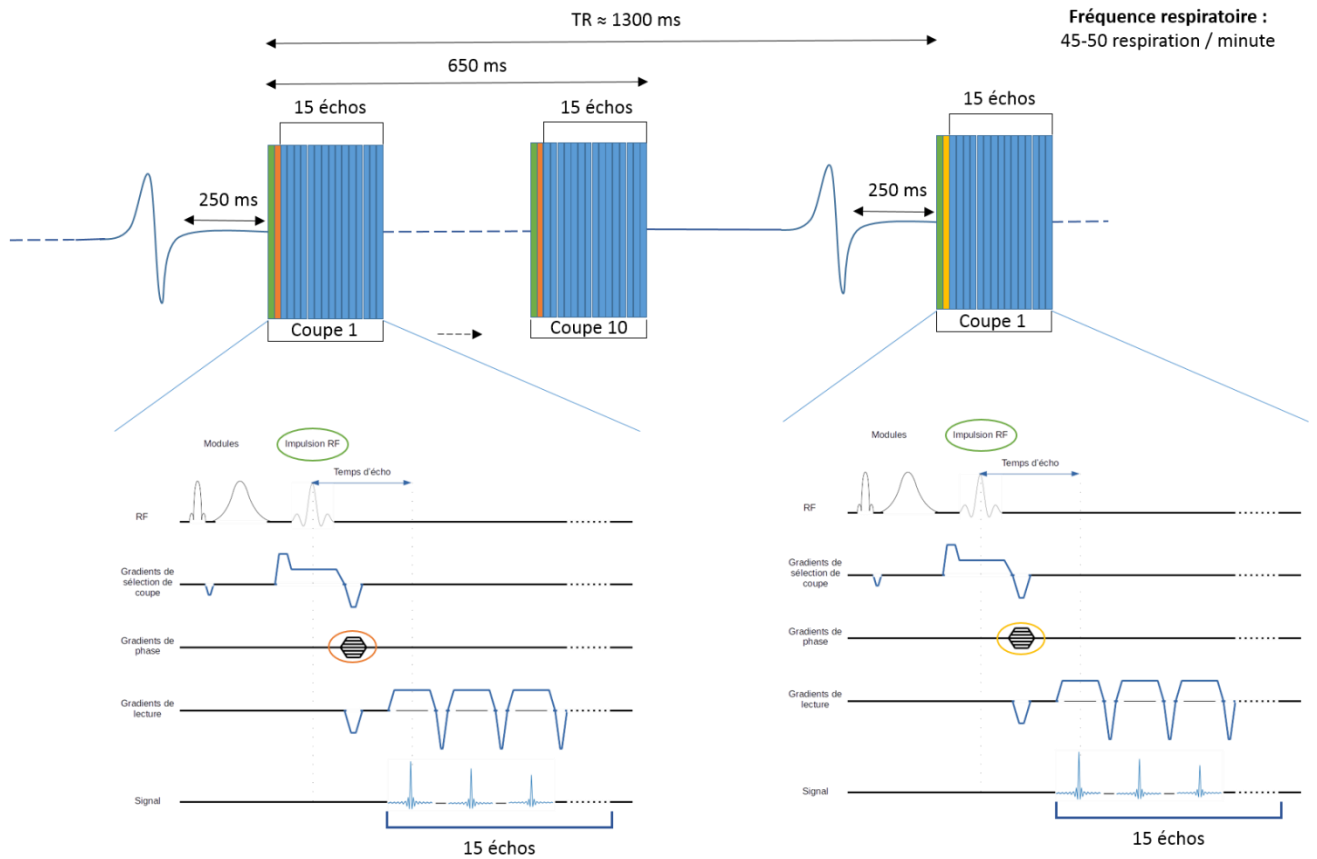


Figure 22: Schéma de la séquence MGE avec la synchronisation respiratoire activée

Saturation du flux (module « Flow Saturation ») :

Le module de saturation de flux est ici une bande spatiale de saturation sélective appliquée au niveau du cœur de la souris, de façon parallèle aux coupes imagées. Cette bande de saturation permet de supprimer le signal du sang artériel au niveau cardiaque. Les pulsations cardiaques éjectent le sang « saturé » sur toute la longueur de l'aorte : le sang entrant au niveau des coupes abdominales (lors de l'acquisition de données) est par conséquent du sang apparaissant en noir sur les images finales.

Ce paramètre est donc intéressant pour créer un contraste entre le sang et la plaque d'athérome de la souris (la plaque d'athérome apparaissant en blanc d'après les conditions expérimentales).

Ce module permet par conséquent de :

- minimiser tout artefact de flux,
- faciliter la segmentation de la plaque d'athérome.

Suppression du signal de la graisse (module « Fat Suppression »):

C'est un module de saturation du signal utilisant une impulsion de radiofréquence paramétrée à la fréquence de résonance de la graisse. Cette impulsion sélective, suivie d'un gradient de déphasage, provoque l'annulation du signal de la graisse sans que le signal de l'eau ne soit affecté.

La suppression du signal de la graisse via ce module permet d'éviter les artefacts de déplacement chimique de premier et de deuxième espèce.

d. Post-traitement des données :

Un programme dédié au post-traitement des données a été développé sur le logiciel Matlab (version 2016a).

Ce programme est défini en plusieurs étapes successives résumées dans la Figure 23 :

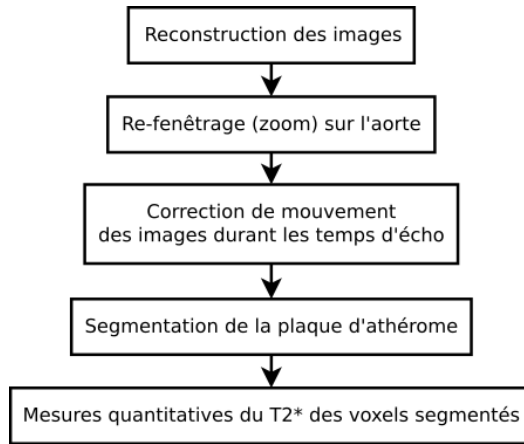


Figure 23: Diagramme de flux du programme de post-traitement des données

Chaque étape sera détaillée dans les sous-parties qui suivent.

i. Reconstruction d'images :

Le programme débute par la reconstruction cartésienne des images à partir du fichier binaire « fid » généré par ParaVision 6.01. Des images de magnitudes, de phase et les images sous forme complexes sont générées (16, 17) et visualisables dans une fenêtre interactive (Figure 24).

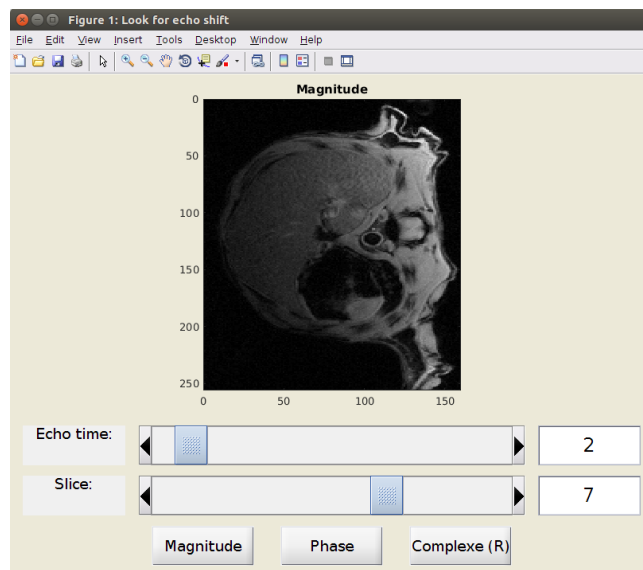


Figure 24: Fenêtre interactive d'affichage des images reconstruites

ii. Re-fenêtrage des images :

Un re-fenêtrage d'une dimension de 40 x 40 voxels permet d'effectuer un agrandissement sur la portion d'aorte de toutes les coupes axiales. Le positionnement de ce fenêtrage est effectué sur la coupe centrale (coupe n°5). Les coordonnées de ce fenêtrage sont ensuite transposées sur toutes les autres coupes afin d'assurer la continuité des voxels dans la direction de sélection de coupe. Cette continuité est importante pour le calcul de cartes de susceptibilité magnétique (voir la partie « *méthode d'ajustement (fit) corrigé* »).

La Figure 25 ci-dessous est un exemple de re-fenêtrage.



Figure 25: Re-fenêtrage des images à partir de la coupe n°5

iii. Correction de mouvement des images durant les temps d'écho :

Il a été remarqué un mouvement des images durant les temps d'écho sur certains jeux d'images.

Ce mouvement est toujours présent dans le sens de l'encodage de phase.

Ce phénomène pourrait être lié à de légères variations de la phase durant l'acquisition de signal.

Dans des conditions où des voxels seraient en mouvement entre chaque temps d'écho, le $T2^*$ estimé ne serait qu'une valeur issue d'un mélange de signal, à ces différents temps d'échos, entre plusieurs voxels translétés.

Ces conditions biaiserait donc les résultats et engendreraient de l'incertitude de mesure.

Une estimation correcte du $T2^*$ pour un voxel donné n'est donc possible que si ce voxel reste fixe durant chaque temps d'écho. C'est seulement dans ces conditions qu'il est possible de parler de spécificité des valeurs de $T2^*$ mesurées.

Le mouvement des images durant les temps d'échos étant délétère pour une bonne estimation du $T2^*$, il a été décidé d'utiliser un algorithme de recalage d'images afin de corriger au mieux ce biais.

La méthode utilisée est un algorithme de flux optique écrit par Baudouin Denis de Senneville : « RealTITracker » en libre accès sur son site internet (<http://bsenneville.free.fr/RealTITracker/>) (18, 19).

C'est une méthode qui, en supposant une conservation de l'intensité de niveau de gris apparent pendant un mouvement, estime une densité de champ vectoriel. En d'autres termes, chaque variation spatio-temporelle d'une intensité de niveau de gris est attribuée à du « mouvement ». Ces vecteurs de mouvements permettent de « recalcr » les images entre-elles afin de corriger leur déplacement apparent.

L'image de référence utilisée pour le recalage est l'image de l'écho n°1.

Un unique paramètre d'entrée est nécessaire pour assurer le bon fonctionnement de l'algorithme. Ce paramètre, nommé « alpha », est une valeur comprise entre 0 et 1 reflétant l'élasticité de l'organe dont le mouvement doit être corrigé :

- Une valeur proche de 0 permet une bonne estimation de la déformation élastique du tissu à recalcr, mais induit une faible robustesse du recalage lorsque le rapport signal/bruit est bas.
- Une valeur proche de 1 est à l'inverse moins précise sur l'estimation de la déformation élastique mais permet de conserver une bonne robustesse de recalage en cas de rapport signal/bruit faible (20).

La valeur alpha a été fixée à 1 :

- Il est considéré que la plaque d'athérome se déforme peu durant l'acquisition du signal
- Les images acquises lors des derniers temps d'échos ont un rapport signal/bruit décroissant

Il est ici admis qu'un recalage robuste sur un maximum d'échos est préférable pour une bonne estimation du $T2^*$.

iv. Segmentation de la plaque d'athérome

La méthode de segmentation de la plaque d'athérome décrite ici fait intervenir différentes étapes qui, l'une après l'autre, permettent d'ajuster au mieux la sélection des voxels.

Ces étapes sont résumées dans la Figure 26 et détaillées dans le texte suivant.

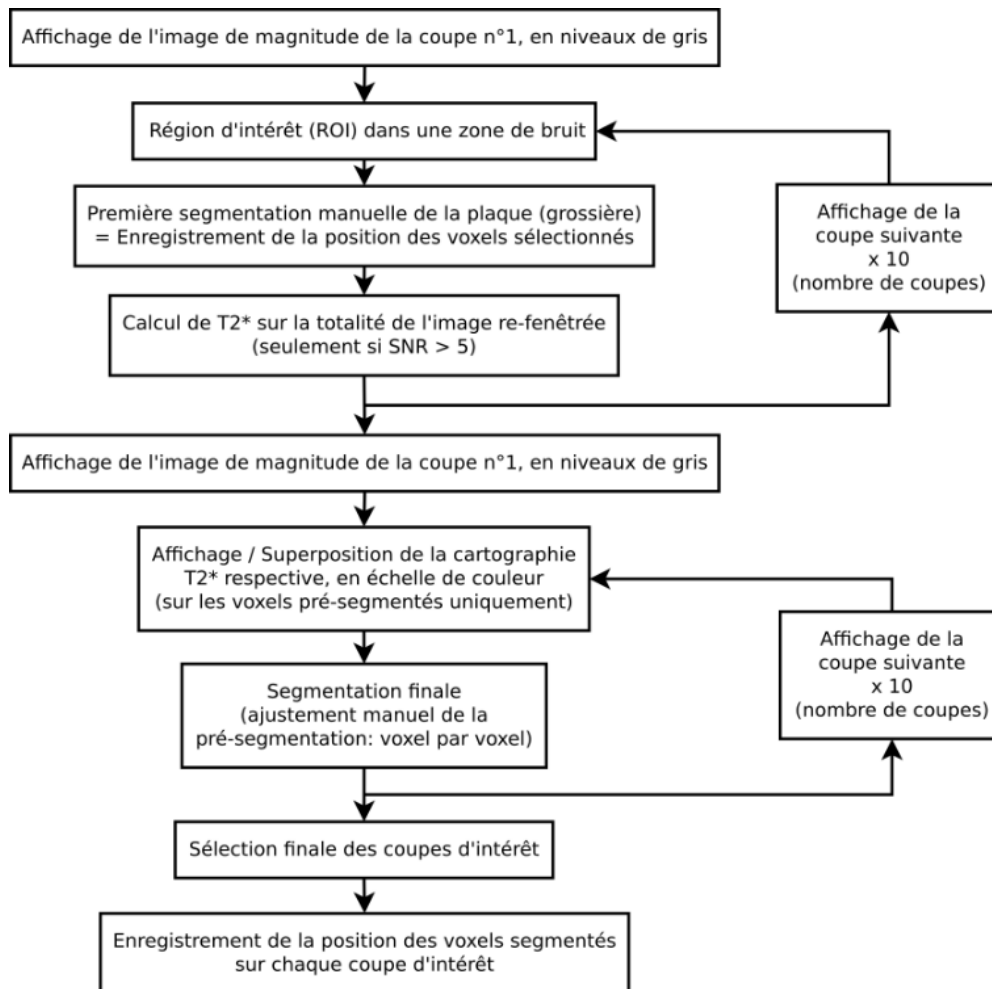


Figure 26: Diagramme de flux de la méthode de segmentation utilisée

Des régions d'intérêts (ROI) ont d'abord été sélectionnées dans le bruit des images non agrandies.

Ces ROIs de bruit permettent ensuite d'évaluer (sur chaque image re-fenêtrée/agrandie) la valeur de rapport signal/bruit (SNR) de chaque voxel.

Une première segmentation (pré-segmentation) manuelle de la plaque est ensuite grossièrement effectuée par l'opérateur sur les images agrandies (Figure 27).

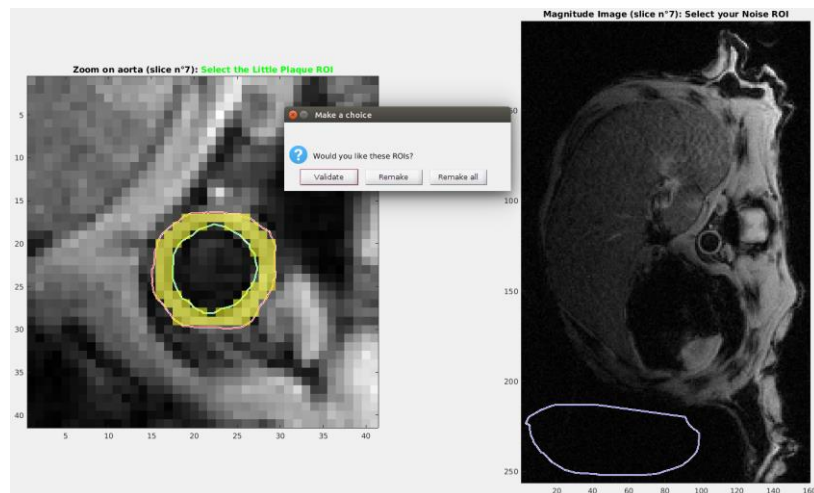


Figure 27: Pré-segmentation manuelle de la plaque d'athérome : ROI sur image de droite = ROI de bruit ; ROIs sur image de gauche = sélection de la plaque d'athérome

Un seuillage de sélection des voxels a été fixé à $SNR > 5$: La valeur de $T2^*$ des voxels présentant un $SNR > 5$ est calculée automatiquement, voxel par voxel, par le biais d'une méthode d'ajustement classique (voir la partie « *méthode d'ajustement (fit) classique* »). Les voxels dont le SNR est inférieur à 5 ne sont pas pris en compte dans le calcul du $T2^*$ (voxels situés au niveau du sang par exemple). Ce seuillage permet ainsi de délimiter finement, dès la pré-segmentation, les voxels de la plaque d'athérome en s'affranchissant des voxels du sang dans la lumière artérielle.

Chaque valeur de $T2^*$ des pixels pré-segmentés peut ensuite être représentée en échelle de couleurs (cartographie $T2^*$). Cette cartographie $T2^*$ est superposée aux images de magnitudes (en niveau de gris). La Figure 28 est un exemple de superposition de cartographies $T2^*$ sur les images de magnitude.

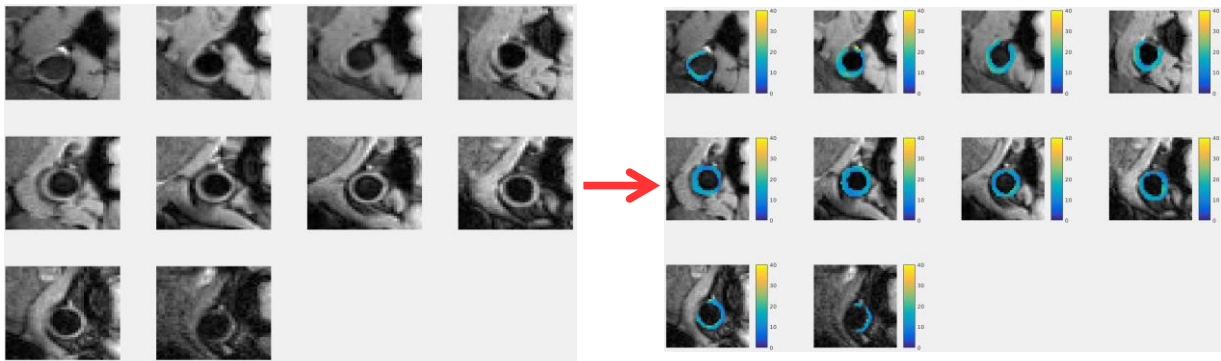


Figure 28: Superposition des cartographies T2 sur les images de magnitude des coupes pré-segmentées*

Une deuxième segmentation est finalement nécessaire afin d'affiner les contours externes de la plaque pré-segmentée grossièrement (Figure 29). Cette deuxième segmentation est manuelle. Elle est effectuée voxel par voxel par l'opérateur en comparant l'image de la coupe en cours de segmentation à sa référence.

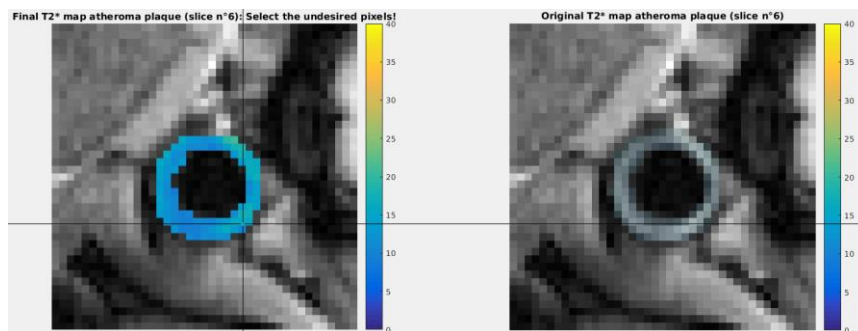


Figure 29: Segmentation finale (voxel par voxel) de la plaque d'athérome (à gauche : l'image en cours de segmentation ; à droite : l'image de référence servant de guide)

L'image en cours de segmentation est l'image de magnitude sur laquelle est superposée (**sans transparence**) la cartographie T2* des voxels pré-segmentés :

L'opérateur est alors libre d'ajouter ou de supprimer manuellement des voxels afin d'affiner la segmentation, en s'appuyant sur l'image de référence.

L'image de référence est l'image de magnitude correspondant à la coupe en cours de segmentation, sur laquelle est superposée (**avec transparence**), la cartographie T2* des voxels pré-segmentés.

Les coupes d'intérêts sont finalement choisies par l'opérateur avant d'effectuer les calculs finaux de T2*. La correspondance des coupes entre chaque séquence est ici un paramètre très important à contrôler avant tout post-traitement. Dans le cadre d'un suivi longitudinal des valeurs de T2* de la plaque, une correspondance correcte des coupes entre chaque jeux de données est en effet obligatoire afin de minimiser toute erreur d'interprétation des résultats. 50 voxels par coupe sont en moyenne segmentés via cette méthode sur une souris âgée de 8 mois avec au minimum 5 coupes sélectionnées : 250 voxels au minimum sont donc segmentés par jeu de données.

v. Mesure quantitative du T2* des voxels segmentés

La valeur moyenne et l'écart-type du T2* de chaque voxel segmenté sont calculés selon deux méthodes différentes :

a) Méthode d'ajustement (fit) monoexponentiel classique :

La méthode d'ajustement classique est une régression non linéaire suivant une simple équation monoexponentielle du signal en fonction des temps d'échos (S(TE)) (Equation n°1) . M0 représente la magnitude initiale du signal, α l'angle d'impulsion des radiofréquences, TE les temps d'écho, et T2* le temps de relaxation transversal.

$$S(TE) = \sin(\alpha)M_0 \times e^{-\frac{TE}{T_2^*}}$$

Equation n°1 : Equation du signal en fonction des temps d'échos (S(TE))

Un algorithme de Levenberg-Marquardt (LM) codé en langage C++ permet d'effectuer l'ajustement de la courbe de corrélation par rapport aux valeurs de signal durant le temps.

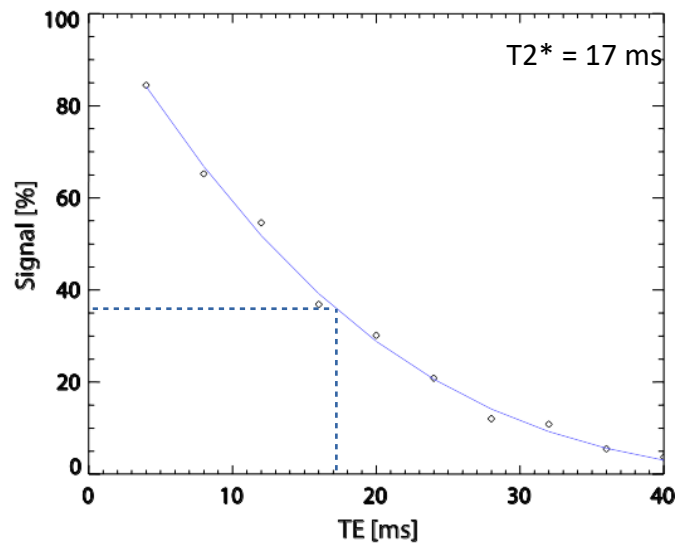


Figure 30: Exemple de décroissance de signal (en%) en fonction des temps d'échos (TE). La courbe bleue continue représente le résultat d'un ajustement via l'algorithme LM.

La valeur de $T2^*$ calculée correspond au temps pour lequel le signal ajusté a perdu 63 % de son intensité initiale (Figure 30).

Les valeurs moyennes \pm écart-type (SD) des $T2^*$ pour chaque coupe sont calculées (Figure 31). Le $T2^*$ global, toute coupe sélectionnée confondue, est aussi évalué. La valeur du $T2^*$ globale est calculée et enregistrée sous la forme [moyenne \pm SD] et [médiane \pm espace interquartile (EIQ)].

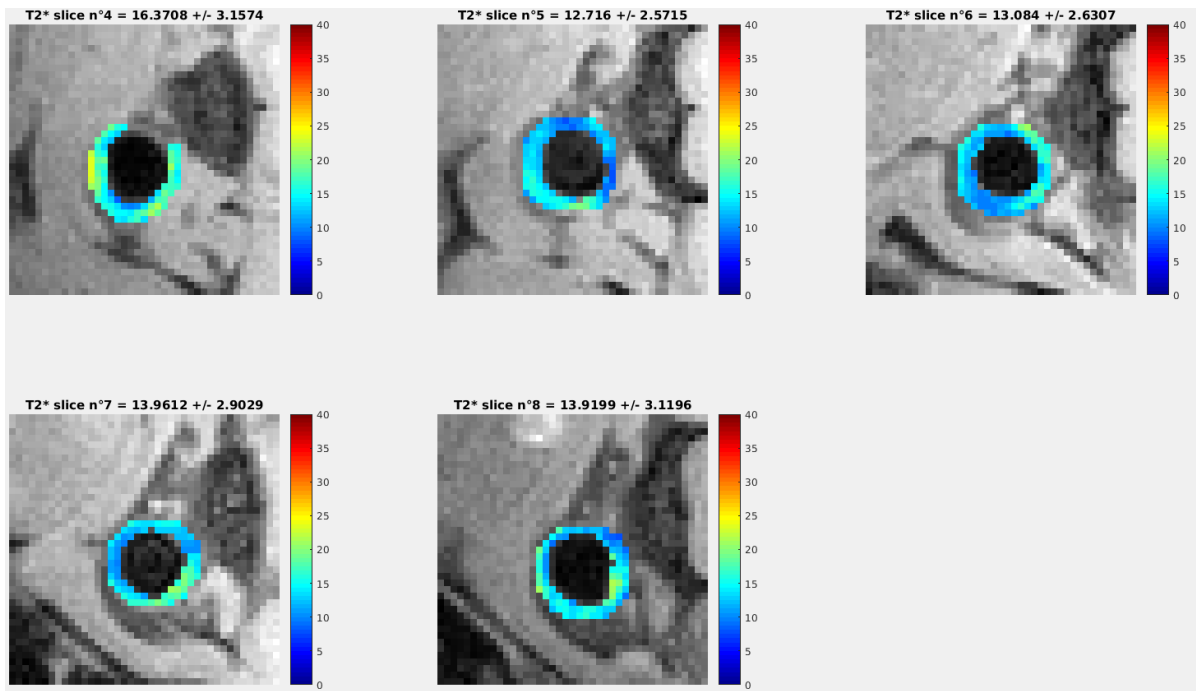


Figure 31: Affichage des valeurs moyennes de T2 \pm écart-type (SD) pour chaque coupe sélectionnée, calculées selon une méthode d'ajustement mono-exponentielle classique*

b) Méthode d'ajustement (fit) corrigé :

Les mesures de $T2^*$ utilisées en imagerie quantitative sont fortement dépendantes des hétérogénéités macroscopiques de champ magnétique, qui induisent des pertes de signal et une sous-estimation des valeurs de $T2^*$. Ces hétérogénéités se rencontrent particulièrement aux interfaces tissus/air, par exemple au niveau des poumons ou au niveau de l'estomac. La maîtrise de ces hétérogénéités macroscopiques est d'une importance cruciale (particulièrement à hauts champs magnétiques) pour améliorer la sensibilité de détection de particules s'accumulant au niveau de la plaque d'athérome. Dans le cadre d'une mesure précise du $T2^*$, une correction prenant en considération ce paramètre (ΔB_0) peut être appliquée. L'évolution du signal peut ainsi être modélisée sous la forme de l'équation n°2.

$$S(TE) = M_0 \times e^{-\frac{TE}{T_2^*}} \times |\text{sinc}(\gamma \Delta B_0 / 2TE)|$$

Equation n° 2: Equation du signal en fonction des temps d'échos (TE)

Avec S le signal, TE les temps d'échos, M_0 la magnitude initiale du signal, γ le rapport gyromagnétique des protons de l'eau, et ΔB_0 la variation de champ magnétique entre deux coupes. L'équation est la combinaison d'une fonction exponentielle et d'une fonction sinus cardinal.

L'approche utilisée ici est inspirée de travaux réalisés par H. Dahnke et al. en 2005 (21), dont la Figure 32 est issue.

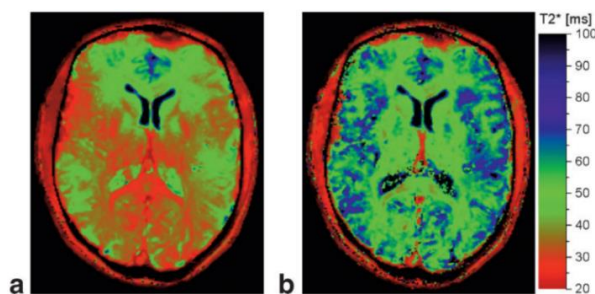


Figure 32: Cartographies $T2^*$ d'une coupe de cerveau imagée à 3T : (a) après ajustement via une méthode monoexponentielle classique ; (b) après ajustement via une méthode corrigée par une fonction sinc prenant en compte le ΔB_0 . Figure issue de Dahnke et al. (2005)(21)

Cette figure montre la comparaison entre deux cartographies $T2^*$ issues de deux ajustements différents sur une même image. Un rehaussement des détails dans les zones sensibles aux hétérogénéités de champ magnétique est visible avec l'ajustement corrigé. La publication montre aussi une amélioration de la précision de mesure du $T2^*$ grâce à cette méthode.

Le principe est de calculer une variation de champ magnétique $\Delta B0$ (départ) sur chaque voxel à partir d'une acquisition multi-coupe sans espace inter-coupe, et d'utiliser le résultat obtenu comme valeur initiale dans un processus d'ajustement (de la valeur finale de $T2^*$) optimisé à chaque itération.

Le processus fait intervenir 4 étapes qui seront détaillées une à une dans les parties suivantes :

- 1 - Déroulement de la phase
- 2 - Estimation de la fréquence de résonance
- 3 - Estimation d'une valeur de $\Delta B0$
- 4 - Estimation finale de $T2^*$

1- Déroulement de la phase :

Une évolution non-linéaire des valeurs de phase durant les temps d'écho est parfois observable à haut champ magnétique. Ceci est dû à un effet d'enroulement de la phase qui peut apparaître lorsque le déphasage du signal est plus rapide que l'intervalle de temps entre deux points d'acquisition. L'évolution de la phase dans le temps est ici analysée et corrigée à l'aide d'un algorithme. Cet algorithme de correction permet l'addition (ou la soustraction) de 2π à la valeur de phase détectée lorsque celle-ci « s'enroule » : c'est-à-dire lorsque la valeur absolue de l'écart de phase entre deux temps d'écho dépasse $\pm\pi$.

La Figure 33 montre l'évolution de la phase durant le temps après correction de l'enroulement de phase.

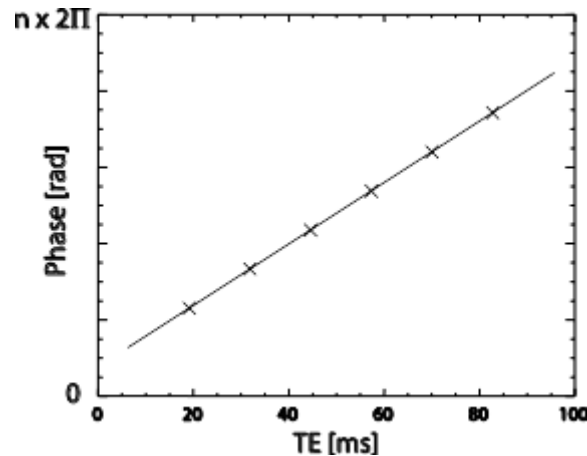


Figure 33: Phase déroulée en fonction des temps d'échos (TE)

Cet algorithme permet finalement une détermination simple de la fréquence de chaque voxel sur chaque coupe.

2- Estimation de la fréquence de résonance :

La fréquence de résonance de chaque voxel d'un jeu d'image est calculée sur chaque voxel de chaque coupe en estimant linéairement la pente de la droite de la phase en fonction des temps d'échos (TE), pour tous les TE dont l'intensité de signal est au moins 5 fois supérieure au bruit moyen ($\text{SNR} > 5$).

Cette étape, visible en exemple sur la Figure 34, permet d'obtenir une carte de fréquence pour chaque coupe (soit 10 cartes de fréquences au total).

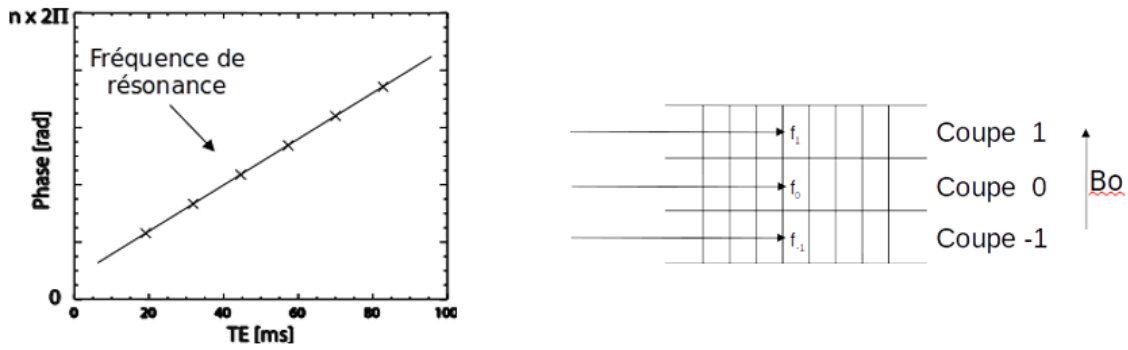


Figure 34: Détermination de la fréquence de résonance

3- Estimation d'une valeur de $\Delta B0$:

A partir de cette distribution tri-dimensionnelle des fréquences, le gradient de susceptibilité magnétique (aussi appelé $\Delta B0$) est mesuré sur chaque voxel dans la direction de sélection de coupe.

La pente générée par la différence de fréquence sur un même voxel issus de trois coupes jointives permet de mesurer une valeur de $\Delta B0$ pour le voxel de la coupe centrale.

La Figure 35 illustre cette étape.

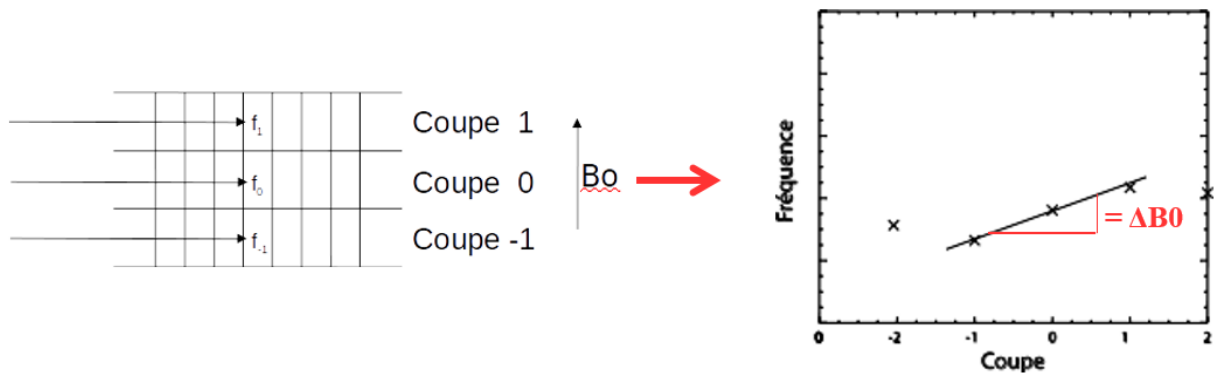


Figure 35: Estimation d'une valeur de $\Delta B0$

4- Estimation finale d'un T2* corrigé :

La valeur de ΔB_0 mesurée sert de valeur de départ dans l'estimation d'un signal théorique en l'absence d'effet du ΔB_0 . Le calcul du signal théorique est basé sur l'équation n°2 :

$$M_0 \times e^{-\frac{TE}{T_2^*}} = \frac{S(TE)}{|\text{sinc}(\gamma \Delta B_0 / 2TE)|}$$

Signal théorique en l'absence d'effet ΔB_0

Eq. N°3 : Calcul du signal théorique en l'absence d'effet ΔB_0

L'équation du signal théorique est représentée par la partie gauche de l'égalité, avec M_0 correspondant à la magnitude initiale théorique du signal, TE les temps d'écho, et T_2^* correspondant à la valeur théorique de T_2^* pour ce signal.

La partie droite de l'égalité intègre $S(TE)$ le signal original capté aux différents temps d'échos (TE), γ le rapport gyromagnétique des protons de l'eau, et ΔB_0 la valeur initiale d'hétérogénéité de champ magnétique déterminée précédemment.

Plusieurs paramètres sont estimés à partir de ce signal théorique grâce à une méthode d'ajustement classique (régression non-linéaire via un algorithme de Levenberg-Marquardt) :

- La magnitude initiale du signal M_0
- Le temps de relaxation transversal (T_2^*)
- Le coefficient de détermination (R^2), représentatif de la justesse de l'ajustement.

La méthode de correction du T_2^* repose sur la recherche itérative d'une valeur finale de ΔB_0 pour laquelle le coefficient de détermination (R^2) issu de l'ajustement est maximal.

Différentes valeurs de paramètres (M_0 , T_2^* et R^2) sont alors estimées à chaque itération en testant successivement de nouvelles valeurs de ΔB_0 .

Les valeurs finales estimées de $\Delta B0$ et de $T2^*$ sont déterminées lorsque la valeur du R^2 de l'ajustement atteint son seuil maximal (valeur maximale théorique = 1).

Afin d'ajuster au mieux la valeur finale de $T2^*$, certains paramètres d'entrée ont été définis (22) :

- Le coefficient de détermination minimum acceptable a été fixé à $R^2 = 0,8$.
- Seuls les échos ayant un SNR supérieur à 5 sont pris en compte dans le calcul.
- Les valeurs de $\Delta B0$ testées varient dans un intervalle total compris entre $\pm 25\%$ de la valeur de départ.
- Le critère d'arrêt des itérations (seuil de tolérance) a été fixé à $\pm 0,0001 \mu T$: les calculs s'arrêtent lorsqu'une variation de $\Delta B0$ de $\pm 0,0001 \mu T$ n'est plus en mesure d'augmenter les valeurs de R^2 déterminées sur les itérations précédentes.

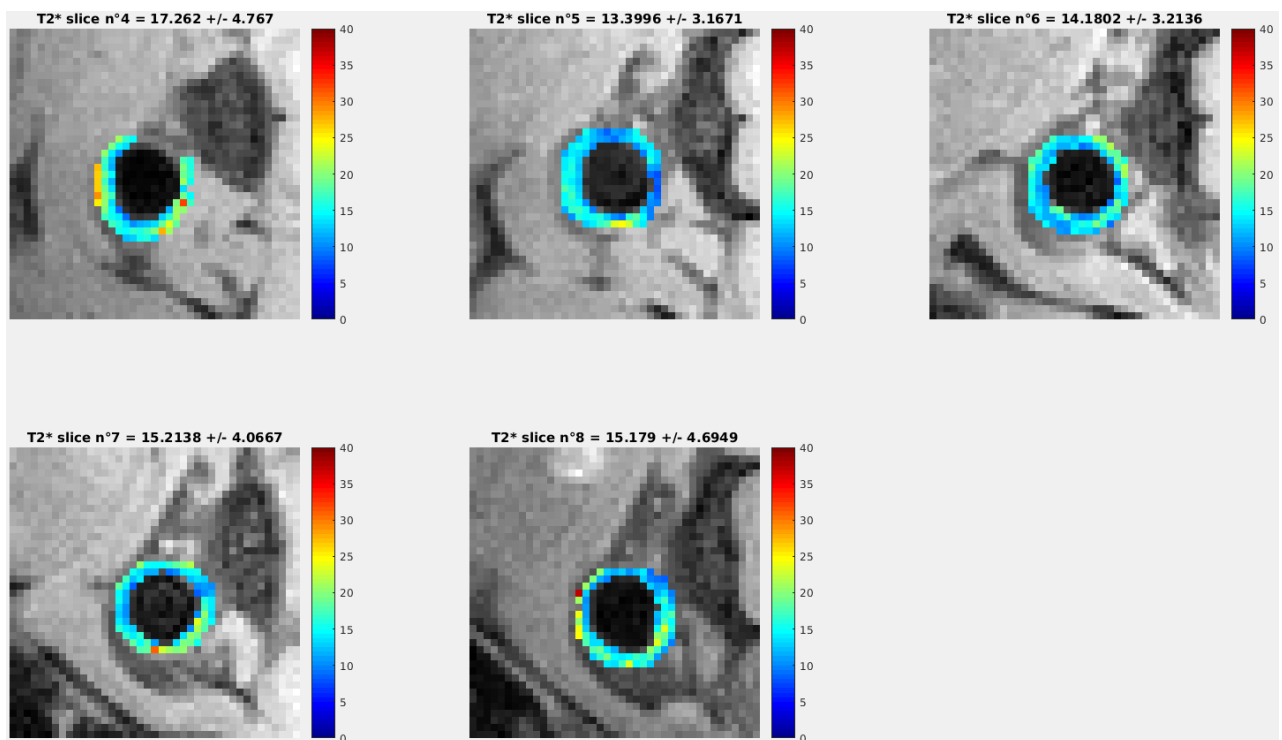


Figure 36: Affichage des valeurs moyennes de $T2^* \pm$ écart-type (SD) pour chaque coupe sélectionnée, calculées selon une méthode d'ajustement corrigée par le $\Delta B0$

Les valeurs moyennes \pm écart-type (SD) des $T2^*$ pour chaque coupe sont calculées et affichées (Figure 36). Le $T2^*$ global, toute coupe sélectionnée confondue, est aussi évalué. La valeur du $T2^*$ global est calculée et enregistrée sous la forme [moyenne \pm SD] et [médiane \pm espace interquartile (EIQ)].

vi. Temps de post-traitement :

Le programme est divisé en plusieurs étapes qui sont plus ou moins longues selon leur nature. L'étape la plus longue du post traitement concerne la segmentation de la plaque d'athérome puisque celle-ci est manuelle. La durée totale est donc très influencée par le niveau d'expérience de l'opérateur.

Chaque jeu de données peut ainsi être post-traité en environ 15 minutes.

3. Évaluation et validation du protocole d'imagerie

a. Généralités

Il a été vu précédemment qu'une mesure de T2* était la conséquence d'une acquisition de données suivie d'une étape de post-traitement. Il a aussi été vu que l'accumulation d'agents de contraste superparamagnétiques (USPIO) dans un tissu était caractérisée par leur capacité à induire des hétérogénéités de champ magnétique locales s'accompagnant d'une diminution des valeurs de T2*. Dans le but d'évaluer l'accumulation d'agents de contraste au niveau de la plaque d'athérome, il est nécessaire d'effectuer un suivi longitudinal des valeurs de T2*. Dans ce cadre il est d'abord nécessaire de valider un protocole qui permet un suivi fiable de ces valeurs sans agent de contraste. C'est en effet à partir d'une valeur « basale » de T2* de la plaque que les résultats obtenus post-injection d'USPIO seront comparés. Une démarche d'évaluation robuste de la capacité du protocole d'imagerie à quantifier le T2* sans agent de contraste est donc indispensable pour être confiant sur l'interprétation et la validation des futurs résultats issus de chaque mesure.

Cette démarche d'évaluation s'inscrit au sein d'une méthode structurée appelée « Six Sigma » visant à une amélioration de la qualité et de l'efficacité des processus. La méthode Six Sigma, orientée qualité, est fondée sur l'analyse statistique de données mesurables dans le but de réduire la variabilité d'un processus pour tendre (idéalement) vers le zéro défaut. L'approche six sigma est très souvent employée dans le secteur industriel dans des domaines variés de production où la maîtrise des processus est primordiale (production d'un médicament par une industrie pharmaceutique par exemple). Elle permet d'assurer qu'un minimum de produit sortant d'un processus de production soit non-conforme vis-à-vis de critères fixés par un cahier des charges (établi en amont).

Cette approche s'applique ici à une étude visant à caractériser et maîtriser un processus de mesure. Sigma (σ) représente l'écart-type d'une population. Sa valeur est indicative de la variabilité d'un jeu de données issu d'un processus. Un processus de mesure est dit « six sigma » si la moyenne de distribution des résultats du processus diffère (de façon répétable et reproductible) d'au moins 6 σ par rapport à des valeurs critiques préétablies dans un cahier des charges (Figure 37).

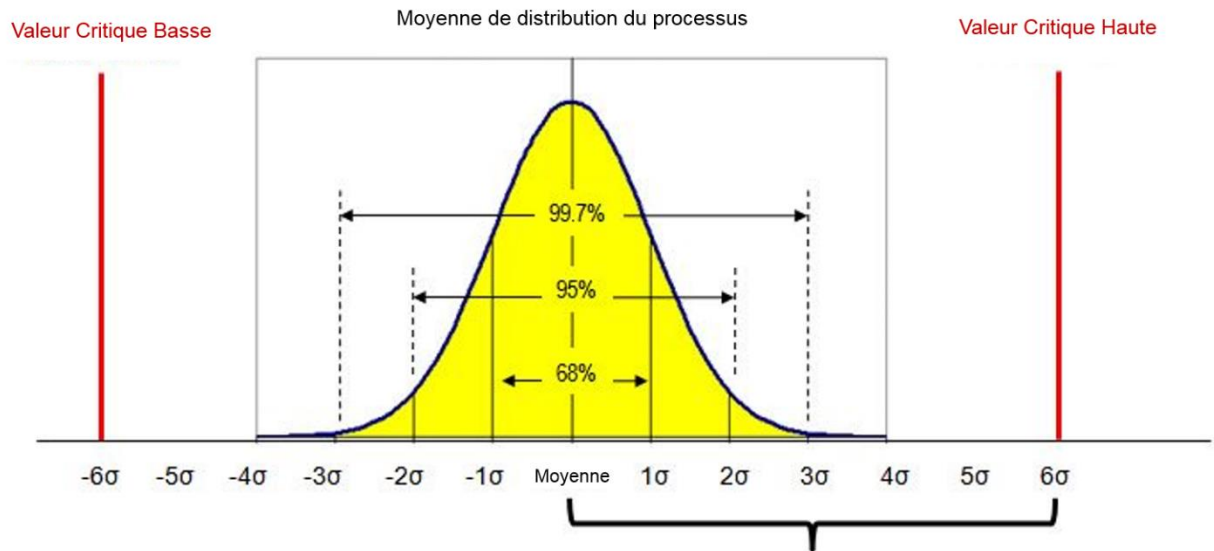


Figure 37: Dispersion d'une population issue d'un processus de mesure six sigma (figure adaptée de leansixsigmadefinition.com)

Les pourcentages indiqués pour chaque valeur de sigma correspondent au degré de maîtrise d'un processus de mesure. Un processus de mesure « 3 sigmas » permet par exemple de maîtriser 99,7% des résultats issus de ce processus. Ces pourcentages sont ainsi directement indicatifs de la robustesse d'un processus de mesure.

La démarche six sigma est d'abord caractérisée par son optique d'amélioration continue visant à maîtriser tout processus (ici un processus de mesure).

La méthode six sigma se base ainsi sur cinq étapes qui se contractent dans l'acronyme « DMAIC » : *Define, Measure, Analyze, Improve, Control* soit « Définir, Mesurer, Analyser, Améliorer, Contrôler » (Figure 38).

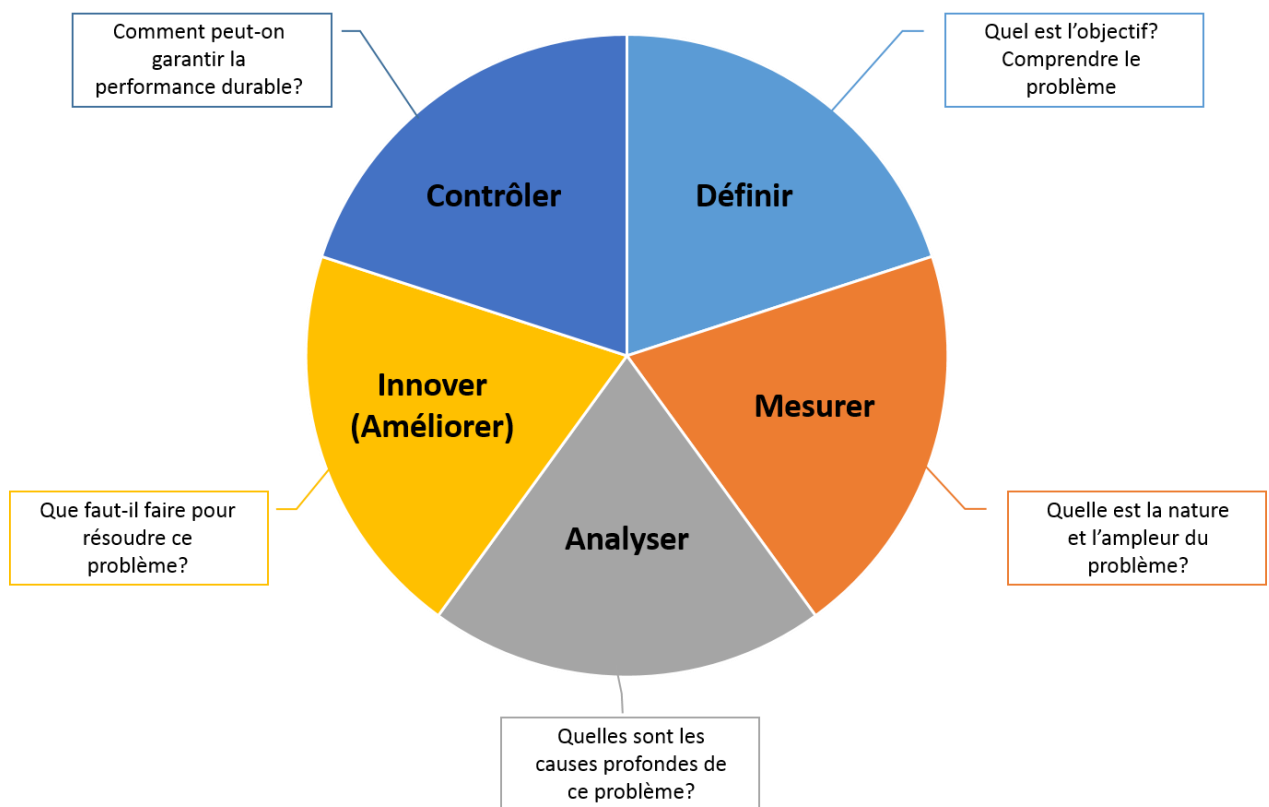


Figure 38: Les cinq étapes de la méthode six sigma (DMAIC)

b. Démarche d'évaluation :

i. Définir :

Il est ici question de définir le problème à évaluer (l'incertitude de mesure), d'identifier et d'analyser les paramètres potentiellement influents dans le processus de mesure. Une large part du travail préliminaire concerne ici la compréhension globale du problème de la mesure d'incertitude du protocole d'imagerie. Cette étape est indispensable afin de poser des bases solides qui permettront une évaluation la plus robuste possible du protocole d'imagerie dans son ensemble. L'objectif principal est ici d'établir un protocole d'évaluation fiable permettant de mesurer l'incertitude de mesure.

Cette première étape de la démarche « DMAIC » a été décomposée en plusieurs parties :

A) Généralités

Cette étape a permis d'aborder la notion d'incertitude de mesure (qui sera le paramètre à évaluer).

B) Identification des facteurs d'incertitudes

Cette étape a été effectuée à l'aide d'un diagramme d'Ishikawa (appelé autrement diagramme des 5M ou de causes à effet). Ce type de diagramme est une représentation graphique très employée en gestion de la qualité. Il permet de visualiser de façon synthétique les potentielles causes d'un problème : le problème étant ici l'incertitude de la mesure du T2* de la plaque d'athérome.

C) Développement d'un protocole expérimental

Chaque cause relevée dans le diagramme d'Ishikawa a été analysée. La synthèse de cette analyse a permis le développement d'un cahier des charges fixant les conditions nécessaires pour le développement d'un protocole expérimental d'évaluation de l'incertitude de mesure du T2*.

En résumé, les différentes étapes de la procédure de développement ayant été menées sont :

Analyse des causes

Synthèse permettant l'élaboration d'un cahier des charges

Cahier des charges permettant l'élaboration du protocole expérimental

Les notions de répétabilité et de reproductibilité du protocole d'imagerie sont abordées durant l'étape d'analyse des causes. La Figure 39 illustre les manières dont seront calculés ces deux paramètres. La répétabilité est le coefficient de variation (CV) moyen calculé à partir de 10 CV indépendants. Ces CV sont obtenus via la moyenne et l'écart-type des résultats de 3 mesures effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. La reproductibilité est le coefficient de variation calculé à partir de la moyenne et de l'écart-type des résultats d'une série de 10 acquisitions effectuées de manière indépendantes.

Expérience	T2* (A)	T2* (B)	T2* (C)	CV (%)
1	Y1(A)	Y1(B)	Y1(C)	$CV_{(Y1(A,B,C))} = (\sigma / \bar{x}) \times 100$
2	Y2(A)	Y2(B)	Y2(C)	$CV_{(Y2(A,B,C))} = (\sigma / \bar{x}) \times 100$
↓	↓	↓	↓	↓
10	Y10(A)	Y10(B)	Y10(C)	$CV_{(Y10(A,B,C))} = (\sigma / \bar{x}) \times 100$
	$CV_{(Y1(A) \rightarrow Y10(A))} = (\sigma / \bar{x}) \times 100$			$CV = \bar{x}_{[CV(1) \rightarrow CV(10)]}$

Reproductibilité

Répétabilité

Figure 39: Tableau résumant les méthodes permettant de calculer les paramètres de répétabilité et reproductibilité

ii. Mesurer :

Cette étape consiste à réunir différents types d'informations afin de mieux quantifier le problème et de pouvoir comparer les résultats. Cette étape consiste ainsi à évaluer les causes non négligeables d'incertitudes de mesure de manière précise à l'aide d'outils statistiques.

A) Protocole expérimental mis en œuvre

Sujets :

Au moment de la mise en œuvre du protocole, seule une souris satisfaisait au critère d'inclusion fixé (selon le volume de plaque d'athérome segmentable).

Acquisition des données :

Étant donné les anesthésies répétées sur la même souris, seuls 27 jeux de données ont pu être recueillis sur une période d'évaluation fixée à 2 mois soit un total de :

- 7 triplicats
- 3 duplicats : la dernière séquence a été arrêtée en raison d'une tolérance à l'anesthésie jugée non-optimale.

Post-traitement :

Il a été développé un algorithme en langage Matlab[®] permettant de comparer les valeurs d'incertitudes des mesures de T2* avec et sans utilisation de ces méthodes de post-traitement.

Le diagramme de flux simplifié de ce programme est visible en annexe n°3. Ce diagramme permet l'utilisation du programme par tout opérateur.

La performance et la robustesse de chaque méthode a été évaluée selon la technique d'analyse « gage R&R » avec des valeurs de sigma fixées à 1, 1,5, 1,7, 2 et 3 (correspondant respectivement à 68,2% 86,6%, 91,1%, 95,4% et 99,7% de robustesse de mesure). Le seuil d'acceptabilité du pourcentage R&R a été fixé à 30%.

Les résultats issus des différentes combinaisons de post-traitement ont fait l'objet d'une étude de facteurs (plan d'expériences) afin de déterminer les effets principaux et les effets d'interaction.

Toutes les méthodes de post-traitement ont été évaluées par le même opérateur, en considérant les différentes combinaisons d'évaluation possibles (32 conditions évaluées au total).

Un plan d'expérimentation résumant chaque condition a été créé et rempli par les réponses expérimentales au fur et à mesure de l'évaluation des méthodes de post-traitement.

Les incertitudes de segmentation intra et inter opérateurs et l'effet du temps de commutation des gradients sont des éléments annexes qui ont été évalués individuellement.

B) Segmentation intra et inter-opérateur

Les paramètres de répétabilité et de reproductibilité intra et inter-opérateur de segmentation ont été évalués (Table 4).

	Intra-opérateur	Inter- opérateur
Répétabilité	Il a été question de faire segmenter un même jeu de données 3 fois à un seul opérateur mais à des jours différents (1 jeu de données par jour). Le coefficient de variation de chaque résultat est calculé. La moyenne des 3 coefficients de variation représente la répétabilité intra-opérateur.	La répétabilité inter-opérateur n'a pas été évaluée.
Reproductibilité	Il a été question de faire segmenter 3 jeux de données indépendants (acquis à des jours différents) à un seul opérateur durant la même journée. Le coefficient de variation de chaque résultat est calculé. La moyenne des 3 coefficients de variation représente la reproductibilité intra-opérateur.	La procédure décrite pour évaluer la reproductibilité intra-opérateur a été effectuée sur 5 opérateurs. La moyenne des 5 répétabilités représente alors la reproductibilité inter-opérateur.

Table 4: Méthodes d'évaluation des répétabilité et reproductibilité intra et inter-opérateur

C) Temps de commutation des gradients

Ce phénomène a été vérifié via l'estimation du coefficient de variation de chaque résultat de mesure de T2* pris individuellement. Ces coefficients de variation (avec ou sans correction de mouvement) ont ensuite été représentés graphiquement en fonction du temps de commutation des gradients.

D) Synthèse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (incertitude-type composée)

Il est important de ne réunir que les données pertinentes pour l'évaluation de l'incertitude de mesure du protocole d'imagerie, car de mauvaises mesures peuvent avoir d'importantes répercussions sur l'analyse puis sur les autres phases du DMAIC. Une dernière synthèse des éléments analysables a donc été effectuée avant la mesure finale de performance et de robustesse du protocole d'imagerie.

E) Performance et robustesse de chaque méthode

La performance de chaque méthode de mesure en termes de répétabilité et de reproductibilité a été évaluée via un outil statistique appelé « gage R&R ». C'est un test qui permet de qualifier un système de mesure en calculant un pourcentage qui indique les variations totales du

processus de mesure. Plus ce pourcentage est faible et meilleur est le système. Généralement, en industrie, ce pourcentage doit être inférieur à 30% pour que le système de mesure soit jugé conforme et acceptable.

Les incertitudes de répétabilité et de reproductibilité de chaque méthode de post-traitement ont été utilisées pour effectuer le test. Les valeurs d'incertitudes utilisées correspondent aux réponses expérimentales indiquées dans le plan d'expérimentation.

Chaque valeur d'incertitude de répétabilité (Rpt) et de reproductibilité (Rpd) a été multipliée (ou corrigée) par une valeur déterminée de σ .

$$\text{Répétabilité corrigée (RPTc)} = [\text{Rpt}] * \sigma$$

$$\text{Reproductibilité corrigée (RPDc)} = \left(\sqrt{[\text{Rpd}]^2 - \frac{[\text{RPTc}]^2}{n}} \right) * \sigma$$

Le facteur σ a permis d'établir le niveau de robustesse du processus de mesure. La valeur de σ est généralement comprise entre 1 et 6. Les valeurs de σ testées ont été fixées à 1, 1,5, 1,7, 2 et 3. Plus cette valeur est élevée et plus le niveau de robustesse de la mesure augmente. Les valeurs testées correspondent respectivement à 68,2%, 86,6%, 91,1%, 95,4% et 99,7% de robustesse de mesure.

n correspond aux nombre de mesure effectuées ($n = 27$).

La somme de l'incertitude de répétabilité corrigée et de l'incertitude de reproductibilité corrigée a ensuite été calculée. La valeur de pourcentage R&R a été obtenue en multipliant le résultat de cette somme par le facteur d'élargissement σ .

$$\text{R\&R(\%)} = \left(\sqrt{[\text{RPTc}]^2 + [\text{RPDc}]^2} \right) * \sigma$$

Les valeurs de pourcentage R&R, calculées pour chaque méthode de post-traitement, ont finalement été représentées graphiquement en fonction du niveau de σ .

Cette représentation graphique a permis de choisir, parmi tous ces protocoles d'imagerie (= méthode d'acquisition + méthodes de post-traitement), celui qui serait le plus robuste concernant la répétabilité et la reproductibilité des mesures.

iii. Analyser :

Cette phase est fondamentalement reliée à la précédente car elle consiste à étudier en détails les mesures obtenues au cours de la deuxième phase. Le Six Sigma repose largement sur l'analyse des chiffres et des statistiques et cette phase d'analyse permet donc de se baser sur les mesures récemment obtenues pour mieux comprendre la source des incertitudes. Grâce à certains outils d'analyse de données comme les plans d'expériences, cette phase met en lumière la source réelle des incertitudes, permettant ainsi de trouver les solutions nécessaires au cours de l'étape suivante.

A) Étude quantitative de facteurs (effets principaux et effets d'interaction)

L'identification des facteurs principaux influençant la minimisation de l'incertitude a été évaluée au moyen d'un plan d'expériences. Il a été question de mener une étude quantitative de facteurs prenant 2 états distincts, avec pour objectif de quantifier leurs effets principaux, ainsi que leurs effets d'interaction. Un plan d'expérience est une méthode de régression basée sur le critère des moindres carrés. Cette méthode estime des coefficients de sensibilité pour chaque facteur étudié, à partir des résultats des expériences et d'un développement limité en série de Taylor, modélisable sous la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e$$

y est la réponse expérimentale (ici, l'incertitude-type composée mesurée pour une condition). Elle est obtenue pour une précision donnée qui sera détaillée dans la partie suivante, x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai, a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients de sensibilité du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences, et la valeur e représente l'écart dû au probable manque d'ajustement du modèle adopté (a priori) avec le modèle réel.

Le calcul des coefficients du modèle a été suivi d'une analyse de la variance multifactorielle (MANOVA) qui, à partir d'une variance expérimentale connue, a permis de calculer un degré de significativité permettant d'établir un graphique des effets principaux et d'interaction de chaque facteur étudié.

iv. Innover et améliorer :

Une fois les causes majeures d'incertitudes définies, il est alors nécessaire de passer à la phase de résolution de ces problèmes. Il faut donc trouver et décider des solutions qui viseront à résoudre les causes d'incertitudes. Ces solutions seront abordées dans la partie discussion.

v. Contrôler :

Cette phase permet de s'assurer que les innovations et les améliorations sont implantées correctement. Il est important de s'assurer qu'un système de suivi soit en mis en place afin de toujours être au fait de l'évolution des nouvelles méthodes et d'effectuer des corrections si nécessaire. Les données obtenues au cours de la seconde phase de « Mesure » peuvent également servir afin de comparer les nouveaux résultats obtenus et ainsi déterminer si les solutions implémentées sont réellement efficaces. Cette partie sera abordée dans la partie discussion.

4. Injection d'USPIO :

Différents types de particules ont été injectée dans des souris ApoE^{-/-} :

- NP-PEG1K-OH ($D_h = 20$ nm)
- NF-PEG4K-OH ($D_h = 50$ nm)
- NF-PEG4K-SCE5 ($D_h = 50$ nm)

Les NF-PEG4K-SCE5 sont des nanoflowers fonctionnalisées avec un ratio théorique égal à 5 scFv par particule. La concentration de fer injectée dans chaque souris et pour chaque lot de particule a été fixé à 3 mg/kg. Les intervalles d'acquisition entre chaque mesure suivent ce plan expérimental suivant :

1 - Mesure avant injection : T = 0

2 - *Injection d'agents de contraste super-paramagnétiques*

3 - Mesures après injection : T = 30 minutes / 1h00 / 1h30 / 2h00 / 7h00 / 24h00 / 48h00 / 72h00

Note : les intervalles de temps sont susceptibles de varier en fonction de la capacité de chaque souris à supporter les anesthésies répétées. Lorsqu'une anesthésie n'est pas stable, l'acquisition est arrêtée et la souris est rapidement sortie de l'aimant.

La Figure 40 résume le planning expérimental suivi.

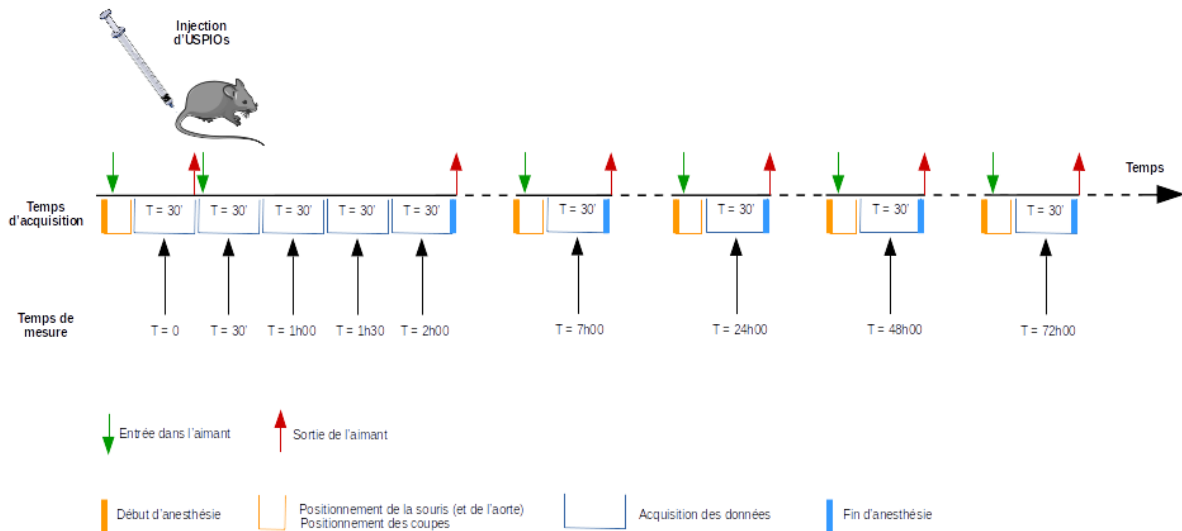


Figure 40: Schéma du planning expérimental de suivi longitudinal post-injection d'agents de contraste super-paramagnétiques

Chaque acquisition a permis d'obtenir un jeu d'images. Des mesures de $T2^*$ ont été effectuées sur chaque jeu d'images à partir de la méthode de post-traitement :

« Sans valeurs aberrantes / Ajustement du $T2^*$ corrigé / Avec correction de mouvement / expression des résultats en valeurs moyennes ».

Les valeurs de $T2^*$ de la plaque d'athérome avant et après injection ont été représentées graphiquement en fonction du temps. Les incertitudes relatives de chaque point ont été calculées à partir des valeurs d'incertitudes de mesure de la méthode de post-traitement employée (incertitudes de répétabilité et de reproductibilité).

C. REFERENCES :

1. Adumeau L. Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques 2015.
2. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans Magn.* 1981;17(2):1247-8.
3. Caruntu D, Caruntu G, Chen Y, O'Connor CJ, Goloverda G, Kolesnichenko VL. Synthesis of Variable-Sized Nanocrystals of Fe₃O₄ with High Surface Reactivity. *Chem Mater.* 2004;16(25):5527-34.
4. Hemery G, Keyes AC, Garaio E, Rodrigo I, Garcia JA, Plazaola F, et al. Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis. *Inorg Chem.* 2017;56(14):8232-43.
5. Fiévet F, Ammar-Merah S, Brayner R, Chau F, Giraud M, Mammeri F, et al. The polyol process: a unique method for easy access to metal nanoparticles with tailored sizes, shapes and compositions. *Chem Soc Rev.* 2018;47(14):5187-233.
6. Adumeau L, Genevois C, Roudier L, Schatz C, Couillaud F, Mornet S. Impact of surface grafting density of PEG macromolecules on dually fluorescent silica nanoparticles used for the in vivo imaging of subcutaneous tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2017;1861(6):1587-96.
7. Vayssières L, Chanéac C, Tronc E, Jolivet JP. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *J Colloid Interface Sci.* 1998;205(2):205-12.
8. Hagemeyer CE, Alt K, Johnston APR, Such GK, Ta HT, Leung MKM, et al. Particle generation, functionalization and sortase A-mediated modification with targeting of single-chain antibodies for diagnostic and therapeutic use. *Nat Protocols.* 2015;10(1):90-105.
9. Deramchia K. Interrogation de la plaque d'athérome par phage-*-display* in vivo une approche pour un ciblage moléculaire à l'aide d'anticorps humains armés pour l'imagerie et la thérapie 2010.
10. Larivière M. Nanoparticles functionalized with human antibodies for multimodal molecular imaging of atherosclerosis: Université de Bordeaux; 2016.
11. Jacobin-Valat M-J, Laroche-Traineau J, Larivière M, Mornet S, Sanchez S, Biran M, et al. Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of

- atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015;11(4):927-37.
12. Bonnard T, Tennant Z, Niego B, Kanojia R, Alt K, Jagdale S, et al. Novel Thrombolytic Drug Based on Thrombin Cleavable Microplasminogen Coupled to a Single-Chain Antibody Specific for Activated GPIIb/IIIa. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(2).
 13. Wang X, Palasubramaniam J, Gkanatsas Y, Hohmann JD, Westein E, Kanojia R, et al. Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. *Circ Res*. 2014;114(7):1083-93.
 14. Hanjaya-Putra D, Haller C, Wang X, Dai E, Lim B, Liu L, et al. Platelet-targeted dual pathway antithrombotic inhibits thrombosis with preserved hemostasis. *JCI insight*. 2018;3(15).
 15. SCHWARZ M, RÖTTGEN P, TAKADA Y, GALL FL, KNACKMUSS S, BASSLER N, et al. Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin α IIb β 3 designed by subtractive selection from naive human phage libraries. *The FASEB Journal*. 2004;18(14):1704-6.
 16. Walsh DO, Gmitro AF, Marcellin MW. Adaptive reconstruction of phased array MR imagery. *Magn Reson Med*. 2000;43(5):682-90.
 17. Griswold M, Walsh D, Heidemann R, Haase A, Jakob P. Proceedings of the 10th Annual Meeting of ISMRM. 2002.
 18. Zachiu C, Denis de Senneville B, Moonen C, Ries M. A framework for the correction of slow physiological drifts during MR-guided HIFU therapies: Proof of concept. *Med Phys*. 2015;42(7):4137-48.
 19. Zachiu C, Papadakis N, Ries M, Moonen C, Denis de Senneville B. An improved optical flow tracking technique for real-time MR-guided beam therapies in moving organs. *Phys Med Biol*. 2015;60(23):9003-29.
 20. Roujol S, Ries M, Moonen C, de Senneville BD. Automatic nonrigid calibration of image registration for real time MR-guided HIFU ablations of mobile organs. *IEEE Trans Med Imaging*. 2011;30(10):1737-45.
 21. Dahnke H, Schaeffter T. Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T2 relaxometry. *Magn Reson Med*. 2005;53(5):1202-6.
 22. Fernandez-Seara MA, Wehrli FW. Postprocessing technique to correct for background gradients in image-based $R^*(2)$ measurements. *Magn Reson Med*. 2000;44(3):358-66.

Résultats

A. Production de l'agent de contraste ciblant :

1. Nanoparticules multimodales

a. Caractérisation des particules :

i. Relaxométrie :

A) SPC :

Les relaxivités (r_1 , r_2 et r_2^*) des SPC ont été mesurées à différentes étapes de leur synthèse à 25 °C et 37 °C par IRM à 4.7 T. Le premier lot correspond à des nanoparticules de maghémite nues ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) qui ont été évaluées avant l'étape d'assemblage. Le deuxième lot représente des nanoparticules présentant une pré-couche de silice qui permet de maintenir la conformation en grappe des particules de maghémite. Le dernier lot correspond à des SPC ayant été consolidées par une couche de silice supplémentaire et dans laquelle des fluorophores ont été inclus. Des chaînes macromoléculaires de polyéthylène glycol ont été greffées de façon covalente sur la couche de silice. Les résultats bruts des mesures de relaxivité à chaque étape de synthèse sont visibles dans la Table 5.

Température	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (7,5 nm)		SPC sans PEG (77 nm)		SPC-PEG4K-OH (124 nm)	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
r1	$2,5 \pm 0,2$	-	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0,04$
r2	$161,5 \pm 10,3$	-	$122 \pm 1,9$	$115 \pm 3,2$	$35,5 \pm 6,13$	$34,4 \pm 12,2$
r2*	184 ± 15	-	$164 \pm 2,1$	$147 \pm 13,7$	$143 \pm 5,6$	$112 \pm 3,5$

Table 5: Résumé des valeurs de relaxivités (4.7 T) à 25 °C et 37 °C des SPC à différentes étapes de leur synthèse (valeurs en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

La Figure 41 représente graphiquement les relaxivités à 25 °C des SPC pour chaque lot testé. Les valeurs de relaxivité transversales r_2^* sont systématiquement plus élevées pour chaque lot comparé aux valeurs de r_2 . Les relaxivités longitudinales (r_1) sont très faibles pour tous les lots.

Le rapport $r2/r1$ est clairement supérieur à 1, les SPC peuvent donc être considérés comme des agents de contraste T2.

Il peut être observé que les valeurs de relaxivités diminuent systématiquement à chaque étape de synthèse. Il doit être souligné que la diminution est moins importante pour la relaxivité $r2^*$ que pour la relaxivité $r2$. Ces deux observations sont en accord avec la publication de Pinho et al. qui ont montré que l'épaisseur de la couche de silice était un facteur déterminant sur les valeurs de relaxivités des particules (1). Plus la couche de silice entourant les particules d'oxyde de fer est importante, et plus leurs valeurs de relaxivités diminuent. Concernant la différence observée pour $r2^*$ et $r2$, les auteurs expliquent qu'il existe une zone de silice mésoporeuse à la surface des SPC dans laquelle la diffusion des molécules d'eau est très ralentie. Ce ralentissement est tel que le déphasage des spins des protons de l'eau peut être atténué au point qu'aucune incohérence de phase (hétérogénéités d'origines moléculaire) ne soit à corriger entre deux impulsions RF à 180° . La composante $r2$ engendrée est donc nulle pour tous les protons de l'eau situés dans la zone de silice mésoporeuse.

La mesure de $r2^*$ n'implique pas de correction des incohérences de phase par des impulsions RF à 180° (séquence écho de gradient). Les protons situés dans la couche de silice mésoporeuse sont alors une composante non-négligeable de la valeur finale de $r2^*$, ce qui explique les différences de $r2$ et de $r2^*$ observées.

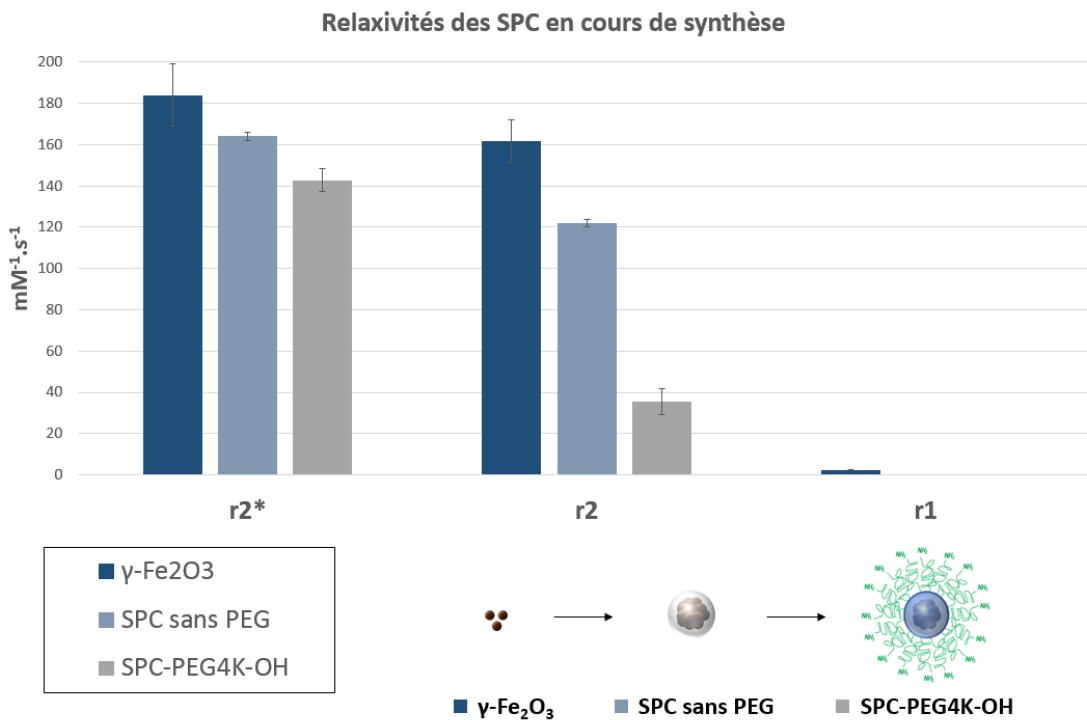


Figure 41: Relaxivités $r2^*$, $r2$ et $r1$ à 4.7 T ($T = 25^\circ\text{C}$) des SPC à différentes étapes de leur synthèse

B) Nanoflowers:

Un deuxième type de nanoparticules appelées « nanoflowers » a été caractérisé. La Table 6 présente les valeurs de relaxivité des nanoflowers fonctionnalisables (NF-PEG4K-OH).

	NF-PEG4K-OH (50 nm)	
Température	25 °C	37 °C
r1	1,41 ± 0,41	2,1 ± 0,32
r2	682 ± 19,7	593 ± 46.,3
r2*	994 ± 108	738 ± 111

Table 6: Résumé des valeurs de relaxivités (4.7 T) à 25 °C et 37 °C des nanoflowers (cœur magnétique = 24 nm) (valeurs en mM⁻¹.s⁻¹)

Il peut être remarqué que les valeurs de relaxivité sont toutes très largement supérieures à celles des SPC. Ces particules possèdent une susceptibilité magnétique très forte et le rapport r2/r1 reste nettement supérieur à 1. Ces particules peuvent être considérées comme des agents de contraste T2. Les valeurs élevées de relaxivité permettent une diminution des doses injectables pour un même niveau de contraste, comparativement à un agent de contraste présentant des relaxivités plus faibles.

Il peut enfin être remarqué que les valeurs de relaxivité r2 et r2* sont plus élevées à 25 °C qu'à 37 °C pour toutes les particules testées.

2. Fragments d'anticorps recombinants (scFv)

a. H2.1-LPETG

i. Purification

Le fragment recombinant d'anticorps humain H2.1-LPETG a été produit par culture cellulaire et a été purifié par chromatographie IMAC. Les résultats de purification sont visibles sur la Figure 42.

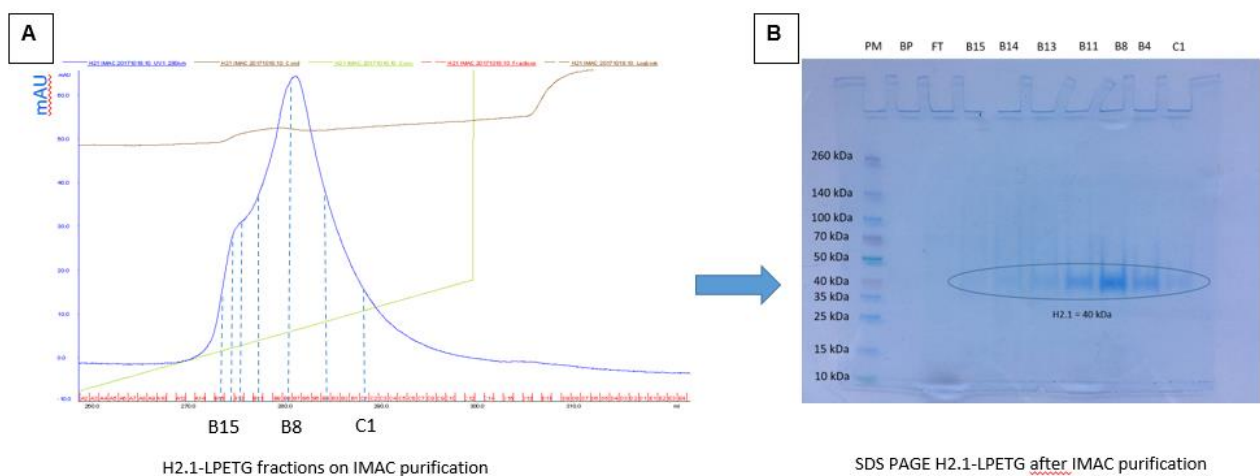


Figure 42: Purification du scFv H2.1-LPETG : (A) chromatogramme représentant l'absorbance du H2.1-LPETG à 280 nm en fonction du temps (B) gel d'électrophorèse (SDS-PAGE 8%) des différentes fractions de purification

Les résultats du chromatogramme (A) concordent avec l'analyse qualitative effectuée sur gel d'électrophorèse (B) :

- L'absorbance du chromatogramme et l'intensité de bande (SDS-PAGE) est maximale pour la fraction de purification « B8 »
- L'intensité des bandes de migration (SDS-PAGE) est graduellement décroissante de part et d'autre de la fraction « B8 »
- Le poids moléculaire du H2.1-LPETG est de 40 kDa (2)

La concentration de scFv produit et purifié a été déterminée par un dosage BCA en microplaque : $C_{(H2.1-LPETG)} = 1,273 \text{ mg/mL}$.

ii. Immunohistochimie

La réactivité du H2.1-LPETG produit a été testée *in vitro* sur des coupes d'aorte de souris et de coronaires humaines (Figure 43).

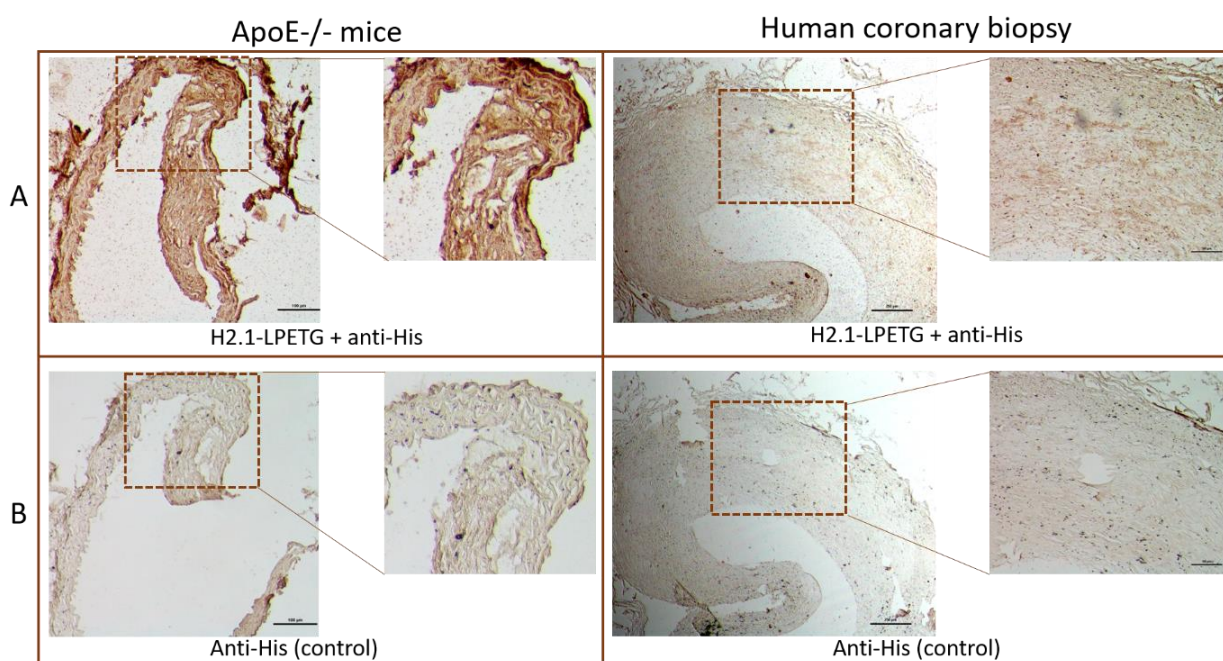


Figure 43: Images des tests de réactivité du H2.1-LPETG obtenues par immunohistochimie : (A) H2.1-LPETG + anticorps secondaire, (B) anticorps secondaire seul (contrôle négatif)

Il peut être observé que le H2.1-LPETG possède une très bonne réactivité pour les coupes d'aorte de souris en comparaison à son témoin négatif. Une réactivité plus modérée mais aussi plus localisée est observable sur les coupes de coronaires humaines, soulignant l'intérêt de l'anticorps pour des études allant du pré-clinique vers la clinique.

3. Greffage des anticorps sur les particules

a. Greffage site-spécifique (Melbourne)

i. Mise au point

Le SCE5 (scFv-LPETG spécifique de l' α IIb β 3 activée), utilisé en routine au sein de l'équipe du Dr. C. Hagemeyer (ACBD, Melbourne),(3) a été choisi pour mettre au point le greffage enzymatique sur les nouvelles nanoparticules (SPC-GGG). Nous avons dans un premier temps utilisé le SPC-GGG 100% (voir Matériels et Méthodes). Le SCE5 a été greffé de façon site-spécifique par voie enzymatique via l'action de la sortase-A. Les ratios molaires de greffages choisis pour la phase d'essais préliminaires (1 mole de scFv : 3 moles de GGG (SPC-GGG 100%) : 3 moles de sortase-A : [1 : 3 : 3]) sont ceux utilisés par l'équipe du Dr. C. Hagemeyer (ratio molaire) dans des réactions de couplage enzymatique de fragments d'anticorps scFv à des petites molécules. Dans le cas des SPC-GGG 100% et considérant 35 000 GGG par SPC, le ratio [1 : 3] revient à greffer 11700 scFv par SPC.

La Figure 44 présente les résultats obtenus à partir de différents mélanges réactionnels.

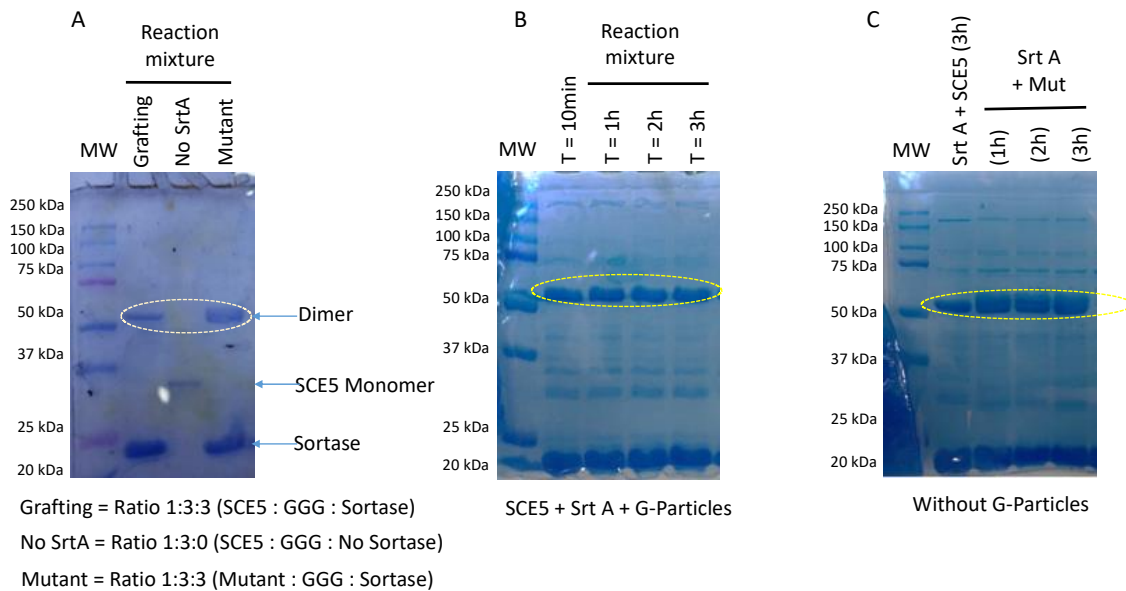


Figure 44: Gels d'électrophorèse (SDS-PAGE 12%) des mélanges réactionnels en fin de réaction (A); en cours de réaction avec les SPC-GGG (B) et sans les SPC-GGG (C)

La Figure 4A montre la présence de dimères pour le SCE5 et le scFv contrôle (Mutant) lorsque la sortase est présente dans le milieu réactionnel, et ce dès les 10 premières minutes de réaction (Figure 4B). Ces dimères sont retrouvés de façon constante jusqu'à la fin de la réaction de

couplage. La figure 4C montre que la sortase peut former des dimères avec les scFv sans l'addition de particules SPC-GGG.

Il a été émis l'hypothèse que la formation de dimères serait éventuellement due à un ratio de greffage inapproprié : le nombre de scFv dans le milieu réactionnel serait trop important par rapport à la capacité de greffage des particules. Cette capacité est conditionnée par la surface spécifique de greffage de chaque particule. Le diamètre des SPC est important, ce qui leur confère une surface spécifique de greffage faible comparé à des particules de taille plus faible. La taille importante des nanoparticules leur confère aussi une capacité de mouvement giratoire limitée, ce qui peut diminuer la probabilité de rencontre entre les GGG, la sortase-A et le scFv-LPETG. Dans cette expérience, le taux de dimères observé étant très important, il n'a pas été jugé nécessaire de tester l'activité des nanoparticules par FACS (sur plaquettes activées) ou par IHC (sur coupes d'aortes de souris). A partir de ces essais préliminaires, il a été décidé de diminuer la quantité de scFv et de tester des ratios entre [1 : 10 : 3] et [1 : 50 : 3], soit entre 3500 et 700 scFv par SPC-GGG 100%.

ii. Etude de fixation non spécifique

La charge, la taille et la forme des particules peuvent avoir une influence sur leur fixation non-spécifique. La fixation non spécifique des différents types de SPC (non greffés avec le SCE5) a été testée sur des plaquettes activées par cytométrie de flux. Les résultats de cette étude sont représentés sur la Figure 45.

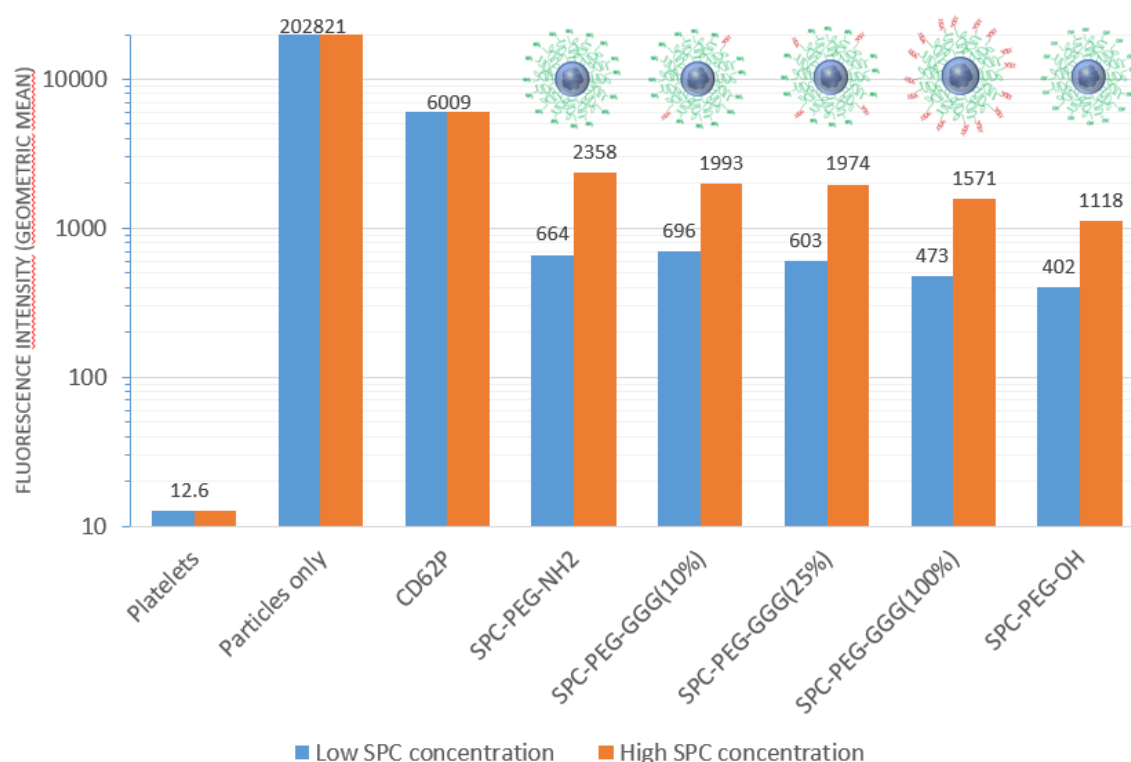


Figure 45: Intensités de fluorescences (exprimées en moyennes géométriques) de l'étude de fixation non-spécifique des SPC sur des plaquettes activées par cytométrie en flux à 582 nm. En bleu et orange sont représentées les intensités de fluorescence correspondant aux concentrations de particules incluses respectivement dans les ratios [1 : 10 : 3] et les ratios [1 : 50 : 3]

Les colorants fluorescents utilisés pour doper la matrice de silice sont le Cy3 (λ_{ex} 555 nm / λ_{em} 570 nm) pour les analyses *in vitro* et le Cy7.5 (λ_{ex} 788 nm / λ_{em} 808 nm) pour l'imagerie par fluorescence *in vivo*. L'intensité de fluorescence (moyenne géométrique) provenant du Cy3 est mesurée à 582 nm pour les particules SPC seules (GeoMean : 202821) et les différents types de SPC mis en présence des plaquettes (valeurs de GeoMean comprises entre 2358 et 402). La fluorescence des plaquettes activées seules a également été mesurée à cette longueur d'onde (GeoMean : 13). Le CD62P, anticorps fluorescent (marqué à la Phycoérythrine) dirigé contre les plaquettes activées, est un contrôle positif de l'activation plaquettaire. Le niveau de fluorescence des SPC est proportionnel au niveau de fixation non-spécifique des particules sur

les plaquettes activées. Deux concentrations de particules (Low SPC : $1,7 \cdot 10^{11}$ SPC / mL and High SPC : $8,6 \cdot 10^{11}$ SPC / mL) ont été testées, correspondant aux concentrations en particules incluses respectivement dans les ratios molaires [1 : 10 : 3] et [1 : 50 : 3]. Certaines tendances peuvent être observées. Les particules possédant des fonctions terminales NH_2 sont celles qui entraînent le plus de fixation non-spécifique sur les plaquettes activées. Ceci peut s'expliquer par la charge de surface positive adoptée par les particules et dues aux fonctions NH_2 lorsque le pH du milieu se situe autour de 7,4 (pH sanguin). Des particules chargées positivement ont une tendance élevée à se fixer de façon non-spécifique aux membranes cellulaires (qui sont chargées négativement). Les particules avec les fonctions terminales OH sont celles qui induisent le moins de fixation non-spécifique. Il peut enfin être remarqué que l'augmentation du nombre de fonctions GGG sur les particules semble induire une diminution de leur fixation non-spécifique sur les plaquettes activées. Les SPC-GGG 10 et 100% ont donc été comparées pour l'étude de fixation spécifique.

iii. Etude de fixation spécifique

La Figure 46 montre de façon qualitative les résultats obtenus sur gel d'électrophorèse en fin de réaction de greffage du SCE5 sur des particules SPC-GGG10% et SPC-GGG100% avec un ratio molaire fixé à 1 : 36 : 3. Ce ratio équivaut à greffer 100 scFv par SPC-GGG10% et 1000 scFv par SPC-GGG100%. Les résultats post-purification et les contrôles sont aussi représentés.

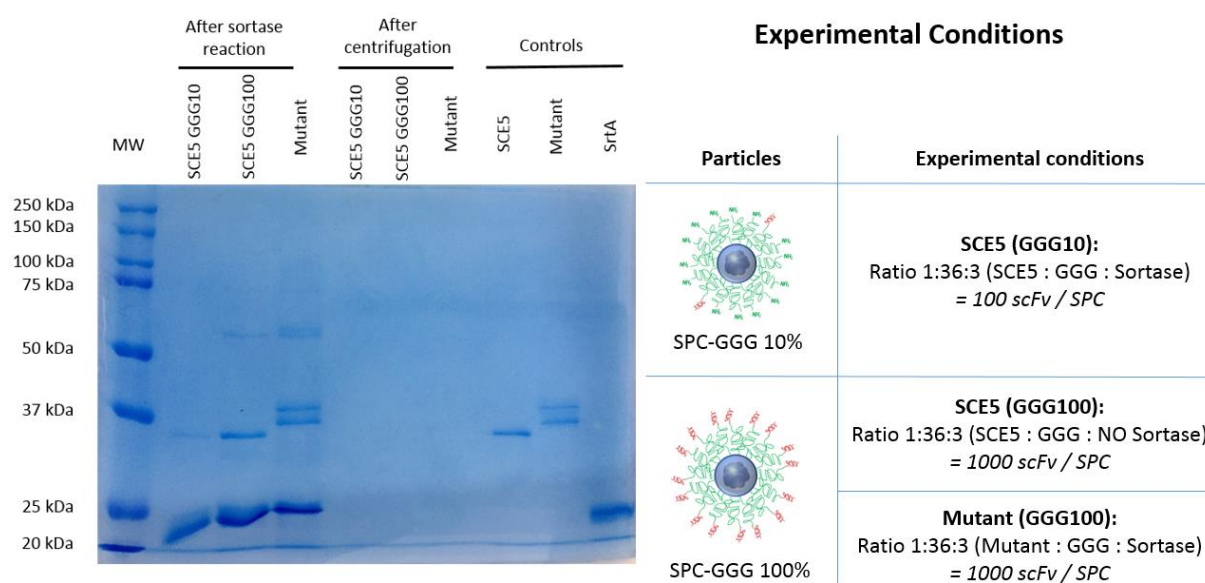


Figure 46: Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE 12%) des mélanges réactionnels en fin de réaction et après purification

Il peut être premièrement remarqué que la présence de dimères de SCE5 et de mutant en fin de réaction est beaucoup plus faible que pour les essais de greffages effectués précédemment. La concentration apparente de monomères de SCE5 et de mutant en fin de réaction est plus importante que celle des dimères. Dans l'optique d'effectuer un greffage contrôlé, ces deux observations permettent d'affirmer que le ratio 1 : 36 : 3 semble plus approprié que le ratio 1 : 3 : 3. L'absence visible de bande de migration après purification permet de conclure sur la bonne capacité du processus à séparer l'ensemble [anticorps non greffés + sortase] des particules greffées.

La fixation spécifique des SPC-SCE5 a été étudiée par cytométrie en flux sur des plaquettes activées. La Figure 47 illustre les résultats obtenus en intensité de fluorescence à une longueur

d'onde d'excitation de 582 nm (A) pour l'étude de la fixation des SPC-SCE5 et de 530 nm pour l'étude de la fixation de l'anticorps SCE5 libre (B).

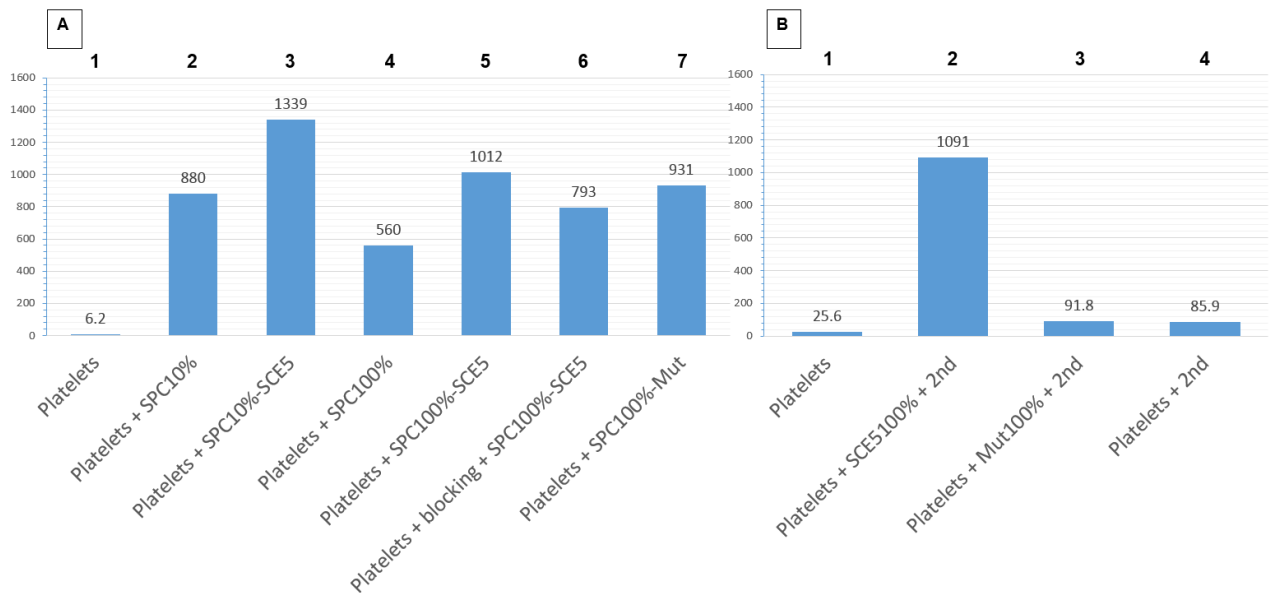


Figure 47: Intensités de fluorescences (exprimées en moyenne géométrique) de l'étude de fixation spécifique des SPC-SCE5 sur des plaquettes activées par cytométrie en flux: (A) Conditions expérimentales avec particules greffées ; (B) Contrôles

Les conditions expérimentales [A2] et [A4] montrent des résultats similaires aux résultats préliminaires de fixation non spécifique obtenus sur la Figure 45 : les SPC-GGG(10%) (GeoMean : 880) se fixent de façon plus importante sur les plaquettes activées que les SPC-GGG(100%) (GeoMean : 560). Ces deux intensités de fluorescence peuvent être respectivement comparées aux conditions [A3] (GeoMean : 1339) et [A5] (GeoMean : 1012) où le SCE5 est greffé sur chaque type de particule. L'intensité de fluorescence pour ces deux conditions est indéniablement plus élevée que celle de leurs contrôles négatifs respectifs. Les particules SPC-GGG(100%) greffées avec le SCE5 (condition [A5]) ne présentent cependant pas des intensités de fluorescence nettement plus élevées que les particules greffées avec le scFv mutant (contrôle négatif : condition [A7] (GeoMean : 931)). Ce résultat est d'autant plus surprenant que les conditions [B1] et [B2] montrent un ciblage très spécifique des plaquettes activées par SCE5. Cependant l'addition du Reopro ou Abciximab (anticorps compétitif anti- α IIb β 3 commercial) montre une tendance à diminuer la fixation des SPC fonctionnalisées sur les plaquettes [A6] (GeoMean : 793). Ces résultats très préliminaires tendent à montrer que la fixation du SCE5 sur les SPC via la sortase est sous-optimale. D'où la nécessité soit de développer d'autres stratégies, soit d'utiliser des nanoparticules de plus petite taille.

b. Greffage avec fonction NHS-amines primaires (Bordeaux)

i. Mise au point

Des cellules CHO recombinantes, exprimant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sous sa conformation activée, ont été remises en culture après plusieurs années conservées dans de l'azote liquide. Ces cellules ont été utilisées dans l'objectif d'effectuer une étude de fixation spécifique des particules greffées. Une première expérience de mise au point du protocole a été effectuée. Les résultats de cette étude sont visibles sur la Figure 48.

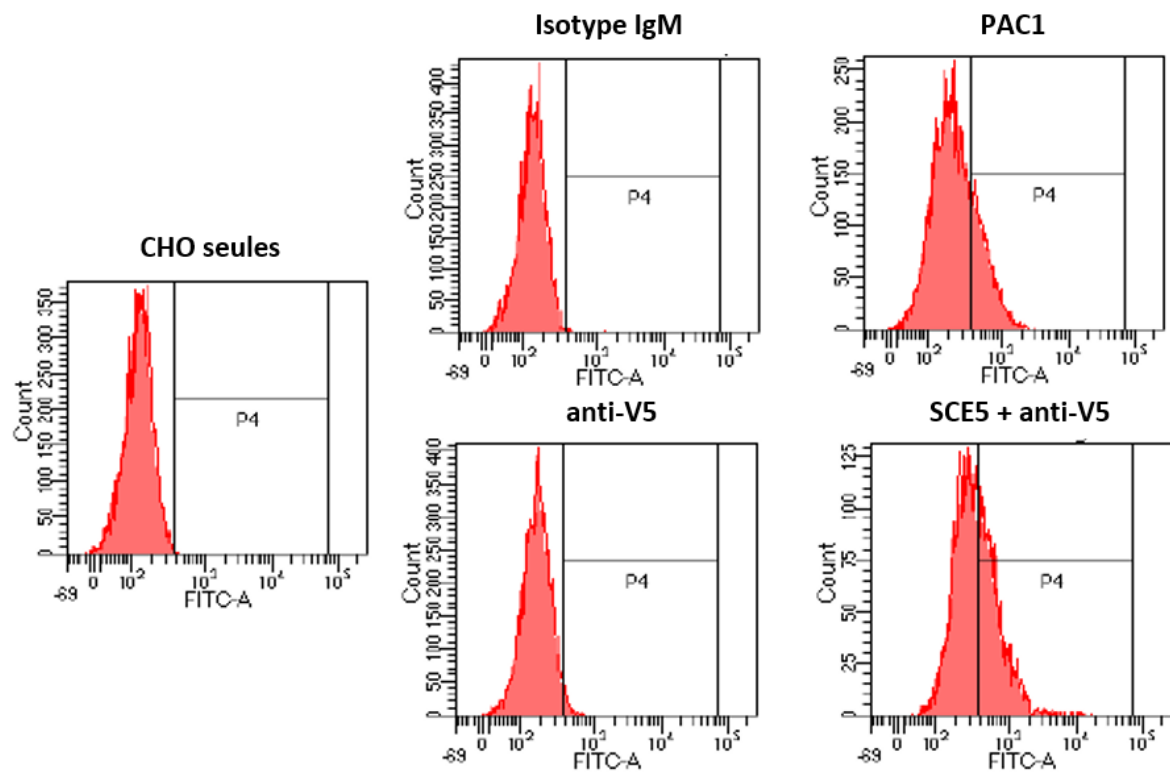


Figure 48: Etude de mise au point du protocole de cytométrie en flux

L'expression du récepteur plaquettaire $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activé a tout d'abord été vérifiée grâce à un anticorps commercial fluorescent de format IgM dirigé contre ce récepteur, dénommé PAC1. Cet anticorps marqué au FITC a été utilisé comme contrôle positif. Un isotype IgM marqué au FITC a été utilisé comme contrôle négatif. Un déplacement du pic vers de plus fortes valeurs de fluorescence lorsque les cellules sont marquées avec PAC1, démontre l'expression de la GPIIbIIIa activée par les cellules CHO recombinantes. L'isotype contrôle présente le même niveau basal de fluorescence que celui observé pour les cellules CHO seules.

Le SCE5, également spécifique de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sous sa conformation activée, a été fourni sous forme lyophilisée par l'équipe du Dr. Hagemeyer. L'intégrité de l'anticorps a été vérifiée par cytométrie en flux. Après marquage avec un anticorps secondaire fluorescent anti-V5, un déplacement de fluorescence similaire à PAC1 est observé. L'anticorps secondaire seul présente le même niveau basal de fluorescence que celui observé pour les cellules CHO. Le scFv SCE5 a donc conservé son intégrité structurale, permettant une reconnaissance spécifique des récepteurs plaquettaires $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activés exprimés par les cellules CHO.

ii. Etude de fixation spécifique des nanoflowers (NF) greffées avec le SCE5

L'expérience de reconnaissance spécifique des cellules CHO recombinantes par les NF-SCE5 a été effectuée 20 jours après la première expérience (soit après 5 passages cellulaires). Les résultats des nanoflowers (NF) greffées avec le SCE5 selon un ratio théorique fixé à 5 scFv/NF sont reportés sur la Figure 49.

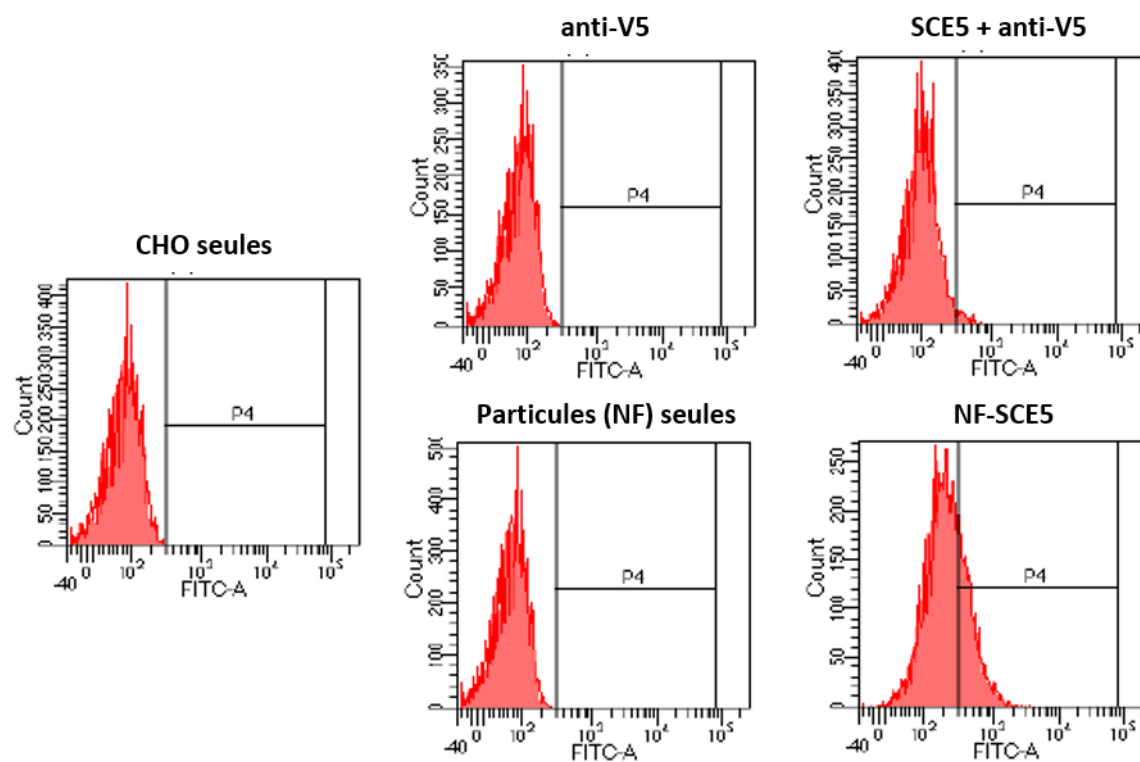


Figure 49: Etude de fixation spécifique des NF-PEG4K-SCE5 (5 scFv / particules) sur des cellules CHO exprimant la GPIIb/IIIa activée

Un déplacement de la fluorescence pour les particules greffées témoigne d'une fixation aux cellules CHO recombinantes. Les particules seules ne se fixent pas sur ces mêmes cellules. Il peut être en revanche remarqué que le scFv SCE5 seul (SCE5+anti-V5) ne présente plus de décalage de fluorescence. Plusieurs hypothèses peuvent être faites à ce stade :

- 1- Les cellules CHO n'expriment plus la α IIB β 3 activée (sans perte d'intégrité du SCE5)
- 2- Les cellules CHO expriment toujours le récepteur mais le SCE5 s'est dégradé et a perdu sa spécificité au cours des manipulations

L'absence d'un contrôle positif avec l'anticorps PAC-1 ne permet pas de conclure sur le niveau d'expression du récepteur plaquettaire par les cellules CHO recombinantes. Si on s'en réfère à

la fixation des NF-SCE5, on peut émettre l'hypothèse que les cellules CHO n'expriment plus que faiblement l' α IIb β 3 activée et que seules les NF fonctionnalisées qui présentent une avidité augmentée par rapport à l'anticorps libre sont susceptibles de se fixer sur les cellules. L'absence de contrôle négatif (mutant greffé sur les NFs) ne permet pas de conclure de façon formelle vis-à-vis de cette hypothèse.

Ces premiers résultats, bien qu'encourageants, sont donc à considérer avec prudence avant de pouvoir confirmer la spécificité de fixation des NF-SCE5 sur les cellules CHO exprimant l'intégrine GPIIb-IIIa recombinante. Des expérimentations sur les plaquettes sanguines sont programmées.

iii. Rendements de greffages

Plusieurs taux de greffage d'anticorps (Théorique : 0 / 0,6 / 1,6 / 3,3 / 4,9 et 6,5 scFv par NF) ont été effectués en vue d'une évaluation des rendements de réaction. Chaque mélange réactionnel a été inclus dans un gel d'électrophorèse Figure 50.

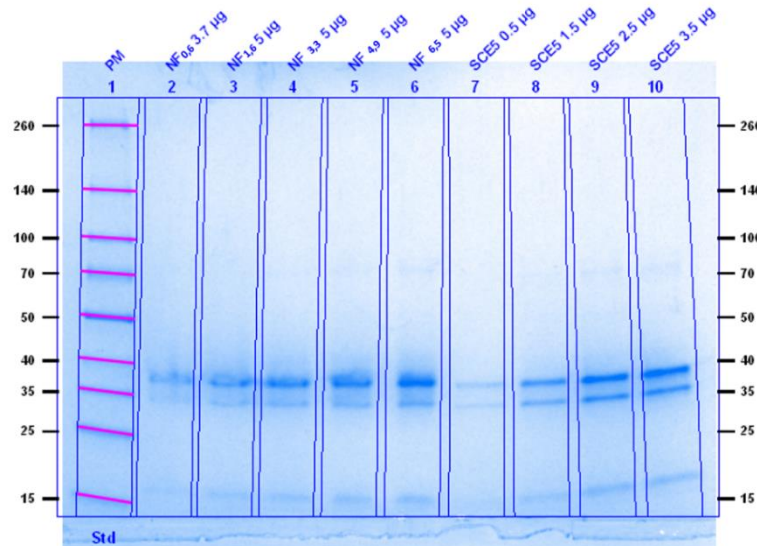


Figure 50: Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE 8%) des différents mélanges réactionnels avec des taux croissants de scFv greffés (puits 2 à 6) et gamme étalon de scFv (puits 7 à 10)

L'intensité de chaque bande a été comparée avec une gamme étalon. Cette comparaison d'intensité a permis le calcul des rendements de greffages respectifs de chaque point de greffage. Les rendements de greffages sont visibles sur la Figure 51. Il peut être observé que le rendement de greffage diminue avec le nombre de scFv théorique à greffer. Ceci peut être dû à des problèmes liés à l'allostérie dans le milieu réactionnel.

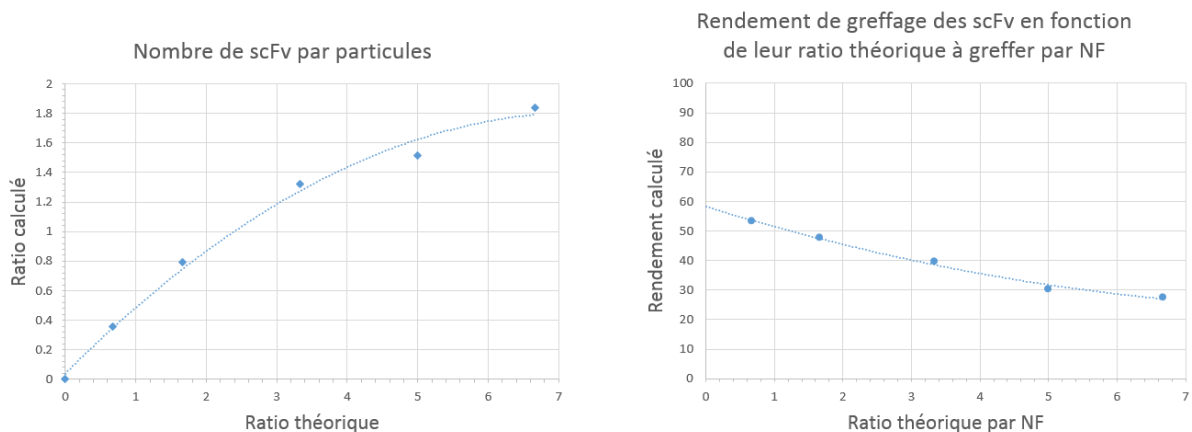


Figure 51: Rendements de greffage du SCE5 sur les Nanoflowers

B. Acquisition des données IRM et méthode de post-traitement d'images :

1. Evaluation et validation du protocole d'imagerie :

❖ Rappel du plan :

▪ Définition du processus à évaluer

- Généralités
- Identification des facteurs d'incertitudes
- Développement et mise en œuvre d'un protocole expérimental
 - Analyse des causes
 - Synthèse
 - Cahier des charges

▪ Mesures

- Protocole d'évaluation mis en œuvre
- Evaluation de l'incertitude de segmentation
- Evaluation de l'effet du temps de commutation des gradients
- Synthèse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (incertitude-type composée)
- Mesure de performance et de robustesse de chaque méthode

▪ Analyses

- Étude de l'influence des facteurs (post-traitement)
 - Effets principaux
 - Effets d'interaction

a. DEFINITION DU PROCESSUS A EVALUER

Quel est l'objectif ?

Comprendre le problème

i. Généralités :

L'évaluation et la validation des méthodes d'acquisition et de post-traitement sont des étapes nécessaires afin de garantir un certain degré de fiabilité (ou niveau de confiance) des valeurs issues de ces protocoles de mesure.

Ce degré de fiabilité est fréquemment interprété comme étant une approximation de la définition de l'erreur de mesure (en métrologie). Selon les directives et définitions du GUM (<https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html> , consulté en 07/2019), la quantification de l'erreur de mesure d'un protocole se base sur la différence des valeurs mesurées avec une valeur de référence (préalablement connue).

Les valeurs mesurées sont ici des valeurs de T2* moyennes et médianes de la plaque d'athérome chez la souris âgée de 8 mois. Ces résultats sont issus de la combinaison entre :

- une méthode d'acquisition donnée

et

- une méthode de post-traitement donnée.

La quantification du T2* de la plaque d'athérome par le biais de ces deux méthodes combinées n'ayant jamais été effectuée auparavant, la valeur de référence du T2* de la plaque demeure à ce jour inconnue. La quantification de l'erreur de mesure n'est par conséquent pas réalisable en l'état actuel.

L'incertitude de mesure est en métrologie une notion relativement proche, qui n'est cependant pas à confondre avec l'erreur de mesure.

La définition de l'incertitude de mesure est, selon le Bureau International des Poids et Mesures (<https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html> , consulté en 07/2019), « un paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées. ».

Le paramètre peut être, par exemple, un écart-type appelé incertitude-type (ou un de ses multiples) ou la demi-étendue d'un intervalle ayant une probabilité de couverture déterminée.

Le mesurande correspond à la grandeur que l'on veut mesurer : ici le temps de relaxation transverse (T2*) de la plaque d'athérome.

Les informations utilisées sont ici les images acquises à différents temps d'écho.

L'incertitude de mesure comprend en général de nombreuses composantes (ou causes).

Certaines peuvent être évaluées par une évaluation de type A de l'incertitude à partir de la distribution statistique des valeurs provenant de séries de mesures et peuvent être caractérisées par des écarts-types.

Les autres composantes, qui peuvent être évaluées par une évaluation de type B de l'incertitude, peuvent aussi être caractérisées par des écarts-types, évalués à partir de fonctions de densité de probabilité fondées sur l'expérience ou d'autres informations.

En général, pour des informations données, on sous-entend que l'incertitude de mesure est associée à une valeur déterminée attribuée au mesurande. Une modification de cette valeur entraîne une modification de l'incertitude associée.

La connaissance préalable de cette valeur n'est en revanche pas nécessaire dans le cadre d'une première évaluation de l'incertitude de mesure (à la différence de l'erreur de mesure).

L'évaluation de l'incertitude de mesure est donc ici tout à fait réalisable.

L'incertitude composée est la somme de toutes les incertitudes-types.

La valeur d'incertitude de mesure déterminée permettra d'estimer au mieux le degré de fiabilité des futures mesures.

ii. Identification des facteurs d'incertitudes :

L'incertitude de mesure est considérée comme une dispersion statistique de valeurs.

Les causes de la dispersion, due à l'influence des différents facteurs du processus de mesure, interviennent dans le résultat de mesure, et donc sur l'incertitude.

Il convient d'identifier ces causes pour en différencier les effets.

Cette étape d'identification peut être effectuée à l'aide d'un diagramme d'Ishikawa (appelé autrement diagramme des 5M ou de causes à effet).

Ce type de diagramme est une représentation graphique très employée en gestion de la qualité. Il permet de visualiser de façon synthétique les potentielles causes d'un problème : le problème étant ici la non-maîtrise de la mesure du T2* de la plaque d'athérome.

Un diagramme d'Ishikawa a donc été établi au fur et à mesure de l'expérience acquise durant le développement global de la méthode (Figure 52).

Chaque branche du diagramme indique des causes potentielles d'incertitude de mesure.

Ces causes peuvent être divisées en deux sous-groupes selon leur ordre d'apparition durant le protocole d'imagerie :

- Causes rencontrées durant la phase d'acquisition
- Causes rencontrées durant la phase de post-traitement

La Table 7 répertorie le nombre de causes pour chaque branche du diagramme en fonction de leur appartenance aux deux sous-groupes décrits ci-dessus. Toutes les causes ont été représentées dans ce tableau avec la même pondération.

		NOMBRE DE CAUSES LIÉES A :					TOTAL
		L'opérateur	La machine	La souris	L'environnement de mesure	La méthode	
DURANT LA :	Phase d'acquisition	5	3	4	1	2	15
	Phase de post-traitement	1	0	0	0	4	5
	TOTAL	6	3	4	1	6	20

Table 7: Tableau relevant le nombre de causes pour chaque branche en fonction de la chronologie de la méthode d'imagerie

Il peut être remarqué que deux branches du diagramme possèdent un nombre de causes d'incertitudes plus élevés que les autres.

La première branche est relative aux causes liées à l'influence de l'homme (ou opérateur).

La deuxième branche est relative aux causes liées à l'influence de la nature des méthodes utilisées.

Il peut aussi être remarqué que le nombre de causes d'incertitudes relevé est plus important lors de la phase d'acquisition que lors de la phase de post-traitement des données.

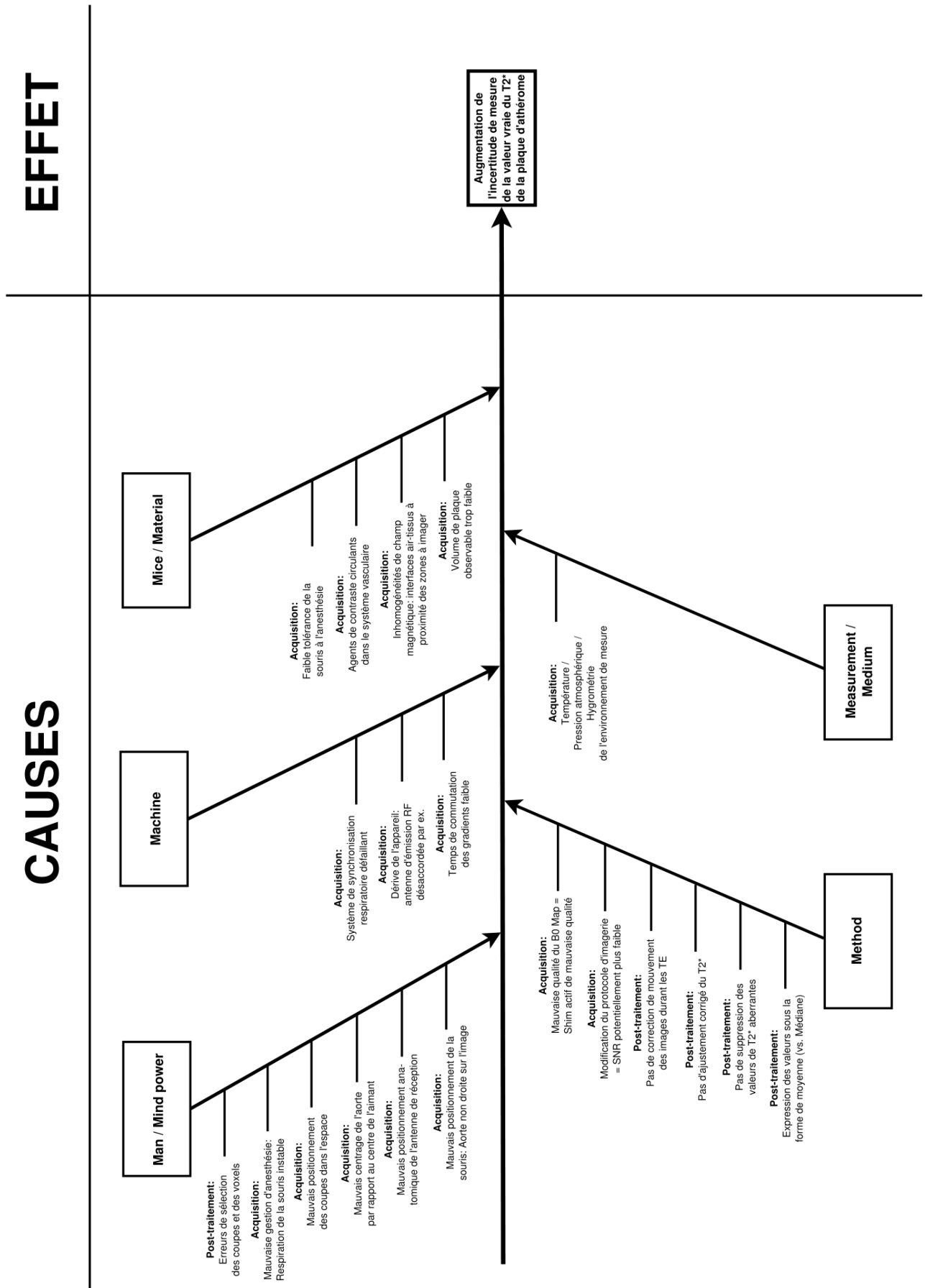


Figure 52: Diagramme de causes à effet développé dans le cadre de l'évaluation de l'incertitude de mesure de la valeur vraie du T2* de la plaque d'athérome

iii. Développement et mise en œuvre d'un protocole expérimental :

ANALYSE DES CAUSES

Causes apparaissant durant la phase d'acquisition :

Les causes liées à l'opérateur :

Les positionnements (de la souris / de l'antenne / de l'aorte dans l'aimant / des coupes) :

La méthode d'acquisition est dédiée au suivi longitudinal du T2* de la plaque d'athérome (avant et après injection d'agents de contraste).

La Figure N° permet de rappeler la présence de deux conditions d'imagerie différentes :

- 1 – Acquisitions consécutives, sans modifier la position de la souris dans l'aimant (entre 30 minutes et 2h00 post injection)
- 2 – Acquisitions avec modification de la position de la souris dans l'aimant (toutes les autres acquisitions)

Puisque deux conditions de mesures différentes sont présentes, il y a ici deux incertitudes de mesures évaluables. D'après la description de ces conditions de mesure, il peut être fait un lien direct avec deux notions importantes en métrologie :

- 1- Incertitude liée à un critère de **répétabilité**
- 2- Incertitude liée à un critère de **reproductibilité** (ou de fidélité intermédiaire)

La répétabilité et la reproductibilité sont des termes ayant leur propre définition en métrologie (<https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html> , consultés en 07/2019).

Répétabilité :

Le critère de répétabilité peut être évalué en calculant le coefficient de variation de différentes mesures effectuées avec les mêmes conditions, sur une courte période de temps.

Reproductibilité (ou fidélité intermédiaire) :

Le critère de reproductibilité peut être évalué en calculant le coefficient de variation de différentes mesures effectuées avec des conditions variables, sur une période de temps étendue.

Malgré tout le soin apporté aux gestes durant la procédure d'acquisition, le facteur « positionnement » est un élément générant obligatoirement de l'incertitude de mesure. Cette cause ne peut pas être considérée comme négligeable et doit donc être évaluée.

Gestion de l'anesthésie :

L'anesthésie de la souris est contrôlée par l'opérateur du début à la fin de la phase d'acquisition. La fréquence respiratoire doit être stabilisée en permanence entre 45 et 50 respirations par minutes via un ajustement manuel régulier du débit d'isoflurane inhalé par la souris. Une respiration instable de la souris peut engendrer des acquisitions de signal avec des TR variables, ce qui peut engendrer des fluctuations de SNR et donc générer de l'incertitude.

La température interne est un facteur lié à la respiration qui doit aussi être contrôlé. Une souris en hypothermie peut devenir instable à l'anesthésie, ce qui se répercute directement sur sa fréquence respiratoire.

Un lit chauffé permet cependant de maintenir de façon stable la température interne de la souris. Ce facteur n'est donc pas à prendre en compte ici.

L'incertitude générée par une mauvaise gestion de l'anesthésie est ici minimisable par un contrôle et un ajustement rigoureux de la fréquence respiratoire de la souris durant chaque séquence. En l'absence d'erreur notable de gestion d'anesthésie par l'opérateur, il a été décidé que cette cause pourrait être considérée comme négligeable.

Les causes liées aux méthodes :

Mauvaise qualité de la carte de champ B0 :

Une carte de champ B0 est effectuée avant chaque acquisition, avec la synchronisation respiratoire activée. Cette synchronisation permet d'estimer au mieux les valeurs de champ B0 à corriger localement : les valeurs de champ captées reflètent l'aimantation interne de la souris entre chaque respiration. Les cartes de champ B0 ont été faites systématiquement sur l'aorte. La qualité de la carte de champ B0 est avant tout dépendante de la respiration de la souris (qui doit être stable). La limitation de l'incertitude liée à la qualité de la carte de champ B0 n'est permise que par un suivi rigoureux de la synchronisation respiratoire.

En l'absence d'erreur de synchronisation respiratoire, il a été décidé que l'incertitude de mesure liée à la qualité de la carte de champ B0 pourrait être considérée comme négligeable.

Modification du protocole d'imagerie :

Le changement d'un des paramètres du protocole d'imagerie (paramètres de séquence par exemple) peut engendrer des modifications de SNR au niveau de la plaque. Cette modification de SNR est un facteur d'incertitude facilement maîtrisable si les paramètres du protocole d'imagerie restent fixes. Il a été décidé que les paramètres des séquences d'acquisitions ne seraient pas modifiés durant tout le protocole d'évaluation. Ce point n'est donc pas à considérer comme une cause d'incertitude.

Les causes liées au matériel :

Temps de commutation des gradients :

Le temps de commutation des gradients a été remarqué comme étant un paramètre susceptible d'avoir un effet positif sur l'annulation du mouvement des images durant les temps d'écho. D'après les explications données sur l'ajustement corrigé du T2* dans la partie « matériels et méthodes », une diminution du mouvement des images engendrerait, en théorie, une diminution de l'incertitude de mesure. Dans ces conditions, ce facteur ne peut être négligé et devra être quantifié.

Dérives et défaillances d'instrumentation :

Les causes liées à d'éventuelles défaillances d'ordre matériel peuvent être maîtrisées par le biais de contrôles qualités journaliers. Afin de limiter les dérives potentielles d'instrumentation, il peut être intéressant d'effectuer les mesures d'incertitude sur une période courte (2 mois par

exemple). En l'absence de dérives d'instrumentation notables durant cette période, il a été décidé que ces causes d'incertitude pourraient être considérées comme négligeables.

Les causes liées à la souris :

Volume de la plaque :

La croissance de la plaque d'athérome est intrinsèquement liée au métabolisme de la souris et reste un paramètre difficilement contrôlable.

Le nombre de voxels segmentables a un impact sur l'incertitude de mesure.

Un nombre élevé de voxels segmentables au niveau de la plaque confère en effet deux avantages.

Premièrement, cela augmente la probabilité de mesurer le T2* de la plaque de façon spécifique : cette condition permet de se rapprocher au mieux de la quantification de la valeur vraie du T2*.

Deuxièmement, cela facilite le processus de segmentation pour tout opérateur : les éventuelles erreurs de segmentation au niveau des bordures de la plaque sont plus susceptibles d'être compensées par un nombre élevé de voxels segmentés, l'incertitude de mesure est par conséquent minimisée.

L'incertitude de mesure étant une dispersion statistique de valeurs, le nombre de voxels « segmentables » doit être suffisamment important afin de pouvoir estimer au mieux cette dispersion (incertitude).

Il a été nécessaire de standardiser un seuil (ou volume) minimal de plaque acceptable pour lequel la segmentation des voxels (permettant ensuite l'évaluation de l'incertitude) pouvait être effectuée de manière « confortable » par l'opérateur : c'est-à-dire de manière répétable et reproductible.

Ce volume estimé est devenu par la suite un critère d'inclusion des souris à imager.

Le volume de plaque a été estimé régulièrement sur les souris durant leur régime hypercholestérolémiant. Cette estimation a été effectuée sur les images issues de la procédure d'imagerie décrite en annexe n°1. Un diagnostic visuel a permis d'apprécier de façon subjective s'il y avait au niveau de l'aorte abdominale une plaque d'athérome suffisamment développée pour être correctement imagée.

La Figure 53 montre des images (A) sans plaque d'athérome et (B) avec présence de plaque d'athérome. Les flèches blanches indiquent la position de la plaque d'athérome.

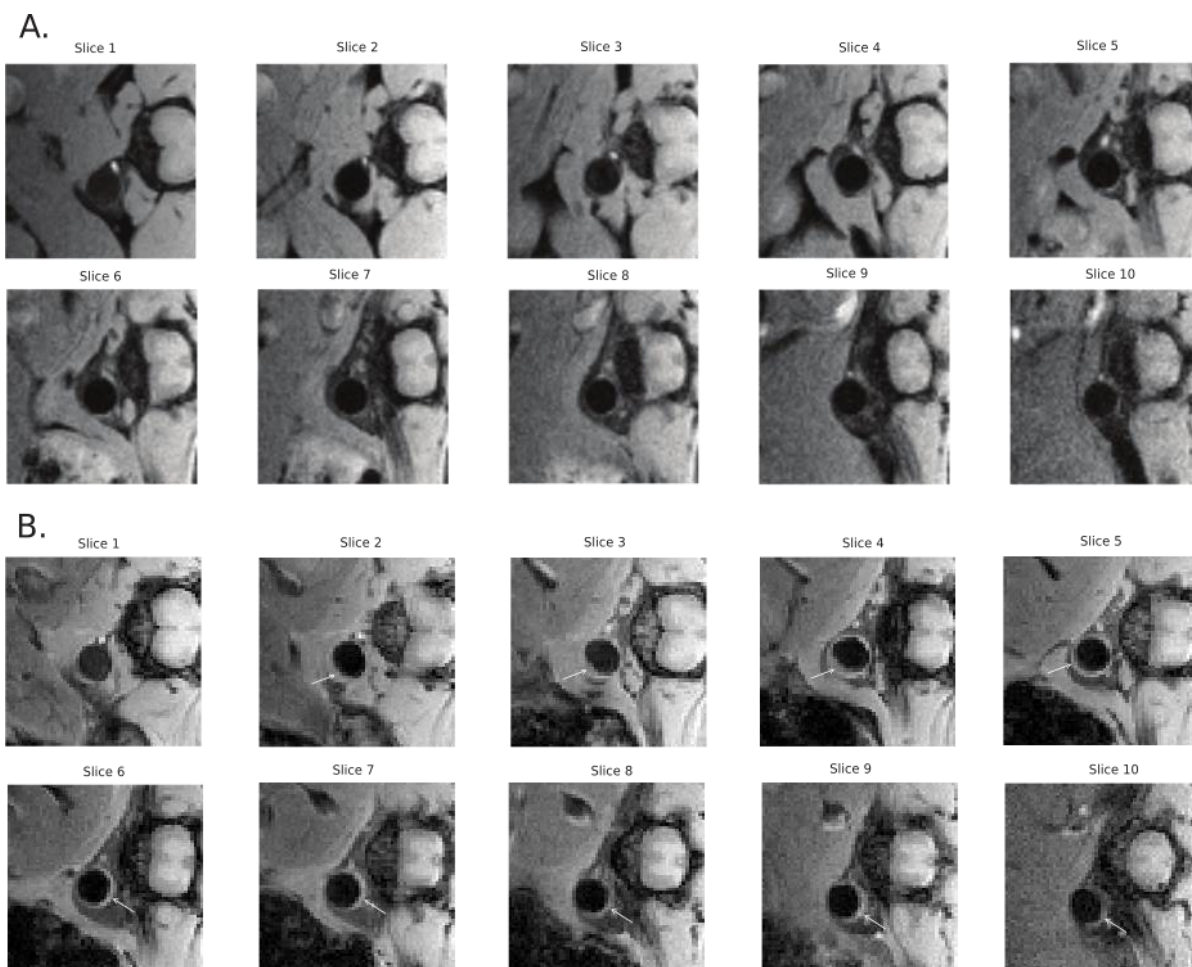


Figure 53: Images de coupes issues (A) d'une souris témoin (BL6/J) et (B) d'une souris ApoE^{-/-} âgée de 8 mois sous régime hypercholestérolémiant

Le volume acceptable a été défini arbitrairement comme l'espace occupé par un total d'environ 250 voxels segmentables sur un minimum de 5 coupes sélectionnables (soit 50 voxels par coupe).

Dans les conditions d'imagerie fixées (résolution de 0,1 x 0,1 x 1 mm³), la plaque segmentée doit donc occuper un volume minimal d'environ $V_{(\text{plaque segmentée})} = 2,5 \text{ mm}^3$.

Il a aussi été évalué avec l'expérience qu'environ 75 % des souris ApoE^{-/-} âgées de 8 mois présentaient un volume de plaque acceptable au niveau de l'aorte abdominale (n = 27 souris sur toute la durée de la thèse).

Ce critère d'inclusion permet de considérer la cause « volume de la plaque » comme non-influente.

Hétérogénéités de champ magnétique :

La mesure de $T2^*$ est une mesure sensible aux hétérogénéités macroscopiques de champ magnétique $\Delta B0$ (4, 5). Ces hétérogénéités, au même titre que les agents de contraste superparamagnétiques, entraînent localement des pertes de signal.

Il a été vu dans l'introduction que certaines publications évaluent l'accumulation d'agents superparamagnétiques au niveau de la crosse aortique (6, 7).

Bien que cette zone soit intéressante en termes de volume de plaque imageable, la crosse aortique se situe au niveau d'une région anatomique sujette à de fortes hétérogénéités macroscopiques de champ magnétiques (le coeur est très proche des interfaces air-tissus des poumons).

Dans l'optique d'évaluer l'accumulation d'agents superparamagnétiques au sein de la plaque d'athérome, il est primordial de pouvoir distinguer les pertes de signal dues au $\Delta B0$ de celles dues à l'effet éventuel des agents de contraste accumulés localement.

Dans ce cadre, il a d'abord été décidé d'imager la portion abdominale de l'aorte des souris plutôt que la crosse aortique.

Cette région permet de se placer dans les conditions expérimentales les moins néfastes possibles (vis-à-vis du $\Delta B0$) pour les mesures de $T2^*$ tout en conservant un volume moyen de plaque à imager acceptable lorsque les souris atteignent l'âge de 8 mois.

La région abdominale n'est pas totalement absente d'organes pouvant induire des hétérogénéités locales au niveau de l'aorte. En fonction de la période d'alimentation de la souris, des volumes d'air peuvent par exemple subsister au niveau de l'estomac lors de certaines acquisitions d'images. Il est cependant assez probable que les valeurs de $\Delta B0$ soient moins intenses au niveau abdominal qu'au niveau pulmonaire : la proximité de l'aorte avec des zones sensibles est globalement plus importante au niveau des poumons qu'au niveau abdominal.

Note :

Ces hétérogénéités sont minimisées avant chaque acquisition grâce à l'estimation « grossière » d'une carte de champ $B0$ (résolution « grossière » = $0,4 \times 0,4 \times 1 \text{ mm}^3$). Cette carte de champ permet, dans un second temps, de corriger localement le champ magnétique $B0$ via un processus de compensation actif des shims de l'aimant.

Une étape de post-traitement des données permet en sus la correction finale des éventuels effets de $\Delta B0$ n'ayant pas été corrigés précédemment (résolution « affinée » = $0,1 \times 0,1 \times 1 \text{ mm}^3$).

En résumé :

- L'intensité du ΔB_0 au niveau abdominal pouvant varier d'un jour à l'autre sur une même souris, l'évaluation directe de l'incertitude de mesure liée à la présence d'hétérogénéités de champ magnétique reste quelque chose de difficilement réalisable en conditions *in vivo*.
- La carte de champ B_0 (ou correction « grossière » de champ B_0) est effectuée de manière systématique avant chaque acquisition.
- Dans ces conditions, seul l'effet de l'absence de correction finale du ΔB_0 durant l'étape de post-traitement peut être évalué afin d'avoir une idée indirecte et empirique de l'incertitude de mesure liée aux éventuels ΔB_0 résiduels à la carte de champ.

Présence d'agents de contraste :

La présence d'agents super-paramagnétiques circulant dans le sang peut induire une surestimation de l'incertitude de mesure par diminution du nombre de voxels segmentables (car due à la diminution du SNR).

Dans ce cadre et pour les raisons expliquées dans l'introduction située juste avant l'analyse des causes, il a été décidé que l'évaluation de l'incertitude de mesure du T_2^* se déroulerait en l'absence totale d'agents de contraste. Cette cause peut alors être considérée négligeable.

Faible tolérance de la souris à l'anesthésie :

La tolérance à l'anesthésie est un paramètre subjectif qui est propre à chaque souris. Ce paramètre n'est pas contrôlable en dehors d'une gestion optimale de l'anesthésie par l'opérateur, qui doit assurer une surveillance accrue des paramètres vitaux de la souris (température et fréquence respiratoire) tout en ajustant manuellement le débit d'isoflurane inhalé. La gestion de l'anesthésie est une cause opérateur-dépendant ayant déjà été détaillée qui peut être considérée comme négligeable lorsqu'elle est maîtrisée.

Les causes liées à l'environnement de mesure :

Température / Pression atmosphérique / Hygrométrie de l'environnement de mesure :

Ces causes sont des causes potentielles d'incertitude mais l'état actuel des connaissances ne permet pas d'établir un lien entre ces paramètres et une modification de l'incertitude de mesure du T_2^* de la plaque d'athérome *in vivo* chez la souris. Des relevés journaliers de ces paramètres peuvent être effectués à titre indicatifs pour établir une éventuelle corrélation. Il a été admis a priori que ces facteurs seraient considérés négligeables.

Causes apparaissant durant la phase de post-traitement des données :

Les causes liées à l'opérateur :

Les erreurs de segmentation :

Afin de mesurer précisément le T2* de la plaque d'athérome et d'évaluer son incertitude de mesure, il faut être en mesure de pouvoir distinguer spécifiquement la plaque de ses tissus environnants au cours du processus de segmentation.

Le protocole d'imagerie permet cela en théorie : il a en effet été développé de manière à pouvoir apprécier un contraste net entre le signal de la plaque et les tissus environnants. La segmentation effectuée par l'opérateur est cependant un des facteurs limitants pouvant générer le plus d'incertitude. La sensibilité de sélection, même pour un opérateur expérimenté, peut être variable d'un jour à l'autre. Il peut alors être observé des différences de résultats de T2* intra-opérateur uniquement dues aux différences de segmentation. Ces différences peuvent être d'autant plus variables entre plusieurs opérateurs.

Dans ces conditions, les causes d'incertitude intra et inter-opérateurs ne peuvent pas être considérées comme négligeables et devront être évaluées.

Les causes liées aux méthodes :

Différentes méthodes de post-traitement sont utilisées afin d'estimer au mieux la valeur vraie du T2* de la plaque d'athérome (exprimée à la fin du post-traitement en valeur moyenne ou en valeur médiane). Ces différentes méthodes sont résumées dans la Table 8 .

	Méthodes utilisées	
	Sans	Avec
Correction de mouvement		
Ajustement du signal	Classique	Corrigé ($\Delta B0$)
Valeurs aberrantes	Conservation	Suppression
Expression des résultats	Moyenne \pm écart-type	Médiane \pm espace inter-quartile

Table 8: Résumé des différentes méthodes de post-traitement à tester

Correction de mouvement :

Un mouvement des images a été remarqué le durant les temps d'écho. Il a été supposé que ce mouvement serait directement la cause d'une augmentation de l'incertitude de mesure due à la translation des voxels entre chaque écho. Dans le cas d'une mesure de T2* sur un voxel

« mobile », la valeur de $T2^*$ estimée ne serait qu'une résultante d'un mauvais ajustement : le signal de chaque temps d'écho ne serait pas issu d'un même voxel mais d'un ensemble de voxels translatés.

Une correction de mouvement a été implémentée dans l'algorithme de post-traitement. L'effet de diminution de l'incertitude de mesure due à cette correction ne peut pas être négligé et devra être évalué.

Ajustement du $T2^*$:

Les valeurs de $T2^*$ ont été évaluées selon deux méthodes d'ajustement différentes. La première est une méthode d'ajustement monoexponentielle classique. La deuxième méthode se base sur l'estimation et l'ajustement corrigé d'un signal théorique à partir du signal original et d'une valeur de $\Delta B0$ premièrement calculée puis affinée.

L'éventuel effet de diminution d'incertitude de mesure de ces deux méthodes ne peut pas être négligé et devra être évalué.

Valeurs aberrantes :

Certains résultats de mesure (exprimés en valeurs moyennes de $T2^*$) peuvent également être parfois perturbés par la présence de valeurs aberrantes dans leur distribution de données (pas plus de 5 à 10 voxels sur 250 en moyenne). Ces valeurs aberrantes sont liées à de rares erreurs d'ajustement du signal qui peuvent apparaître lorsque la valeur de $\Delta B0$ mesurée est forte et qu'un grand nombre de temps d'écho doit être ajusté :

L'ajustement corrigé fonctionne via l'estimation d'un signal théorique à partir du signal original, lui-même divisé par la valeur absolue d'une fonction sinus cardinal de variable $x = (\gamma\Delta B0/2TE)$.

La valeur absolue d'une fonction sinus cardinal est caractérisée par la présence de minima locaux sur l'axe des abscisses. Ces minima locaux peuvent être plus ou moins distants les uns des autres, dépendamment de la valeur que prend la variable de la fonction sinus cardinal.

Une valeur forte de $\Delta B0$ induit par exemple une augmentation du nombre de minima locaux observés sur une même fenêtre de temps.

Le signal théorique, pour tout point (TE) s'approchant d'un minimum local, peut alors se retrouver fortement perturbé par une sur-estimation de sa valeur réelle.

Cette sur-estimation, localisée sur certains TE, peut alors entraîner des erreurs d'ajustement qui se répercutent sur la valeur finale de $T2^*$ estimée.

Il a été défini arbitrairement que toute valeur de T2* inférieure à 0 ms ou supérieure à 30 ms devait être considérée comme « valeur aberrante ».

L'effet de la suppression ou de la conservation de ces valeurs ne peut pas être négligé et devra être évalué.

Expression des résultats :

Il a été émis l'hypothèse que la présence de valeurs aberrantes pouvait éventuellement être corrigée par l'expression des résultats sous forme de médiane \pm espace interquartile : les médianes étant moins sensibles aux valeurs extrêmes dans une distribution. L'effet de l'expression des résultats (moyenne vs. médiane) ne peut pas être négligé et devra être évalué.

Résumé des causes liées aux méthodes :

La minimisation de l'incertitude de mesure liée à l'utilisation (combinée ou non) des différentes méthodes de post-traitement doit être évaluée.

SYNTHESE DE L'ANALYSE

L'analyse des causes potentielles d'incertitudes indiquées dans le diagramme d'Ishikawa a permis de mettre en évidence les causes pouvant être considérées comme négligeables après l'application maîtrisée d'actions correctives (Table 9). Les causes restantes sont considérées comme influentes et doivent être évaluées (Table 10).

BRANCHE	CAUSES NON RETENUES	ACTIONS CORRECTIVES
Opérateur	Gestion d'anesthésie	Suivi et ajustement rigoureux
Méthodes	Qualité de la carte de champ B0	Gestion optimale de l'anesthésie : Pas d'erreur tolérée concernant la synchronisation respiratoire
	Modification de protocole	Aucune modification de protocole
Matériel	Dérives et défaillances	Contrôles qualité journaliers + courte période d'évaluation
Souris	Volume de plaque	Critère d'inclusion des souris : V minimum de plaque segmentable = 2,5 mm ³ / jeu de données (≈ 250 voxels)
	Tolérance à l'anesthésie	Gestion optimale de l'anesthésie
	Agents de contraste	Aucun agents de contraste
Environnement	Température, pression, hygrométrie	Relevés journaliers

Table 9: Résumé des causes considérées comme négligeable après l'application d'actions correctives

BRANCHE	CAUSES RETENUES		ACTIONS A MENER
Opérateur	Positionnements	Répétabilité	Evaluation de la répétabilité
		Reproductibilité	Evaluation de la reproductibilité
	Segmentation	Répétabilité	Evaluation de la répétabilité
		Reproductibilité	Evaluation de la reproductibilité
Méthodes	Méthodes de post-traitement		Evaluation de chaque méthode de post-traitement
Matériel	Temps de commutation des gradients		Etude isolée d'influence
Souris	Hétérogénéités de champ B0		Etude de l'absence de correction du $\Delta B0$ en post traitement
Environnement	-		-

Table 10: Résumé des causes considérées comme influentes restant à évaluer

Résumé :

La prise en compte de l'ensemble des actions correctives et des actions menées permet d'établir un cahier des charges fixant les conditions nécessaires pour l'évaluation de l'incertitude de mesure du protocole d'imagerie.

Ce cahier des charges permet ensuite la mise en œuvre d'un protocole expérimental d'évaluation de l'incertitude de mesure.

Quel(s) objectif(s) :

Évaluer l'incertitude de mesure de la méthode d'imagerie, selon les critères de répétabilité et de reproductibilité de mesure imposés par la méthode, dans le cadre d'un suivi longitudinal du T2* de la plaque d'athérome.

Quels sujets :

Selon le critère d'inclusion des souris mis en place, le volume de plaque « segmentable » doit être au minimum de 2,5 mm³, ce qui représente un total d'environ 250 voxels segmentables sur chaque jeu de données.

Conditions d'acquisition des données :

Il a été prévu 10 triplicats (soit 30 jeux de données) par souris sur une période totale d'évaluation de 2 mois avec :

- Une gestion rigoureuse de l'anesthésie durant toutes les séquences d'acquisition
- Des contrôles qualités effectués quotidiennement durant cette période
- Aucun agent de contraste injecté
- Aucune erreur tolérée concernant la synchronisation respiratoire durant les acquisitions des cartes de champ B0
- Aucune modification des paramètres de séquence

Conditions de post-traitement des données :

Un algorithme de post-traitement regroupant toutes les méthodes à évaluer doit être premièrement développé.

La performance de chaque méthode doit être évaluée via un « gage R&R » avec des valeurs de sigma fixées à 1, 1,5, 1,7, 2 et 3 (correspondant respectivement à 68,2%, 86,6%, 91,1%, 95,4% et 99,7% de précision d'évaluation). Une valeur de pourcentage R&R inférieure à 30% est admise conforme et acceptable.

Le potentiel de diminution d'incertitude de mesure du T2* de toutes les combinaisons de méthodes de post-traitement doit être étudié selon les critères de répétabilité et de reproductibilité via un plan d'expériences (16 conditions par critère au total).

Le plan d'expérimentation et les réponses attendues est illustré sur la Figure 54.

Expérience	Correction de mouvements	Ajustement corrigé du T2*	Suppression des valeurs aberrantes	Reproductibilité		Répétabilité	
				Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*	Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*
1	Non	Non	Non				
2	Oui	Non	Non				
3	Non	Oui	Non				
4	Oui	Oui	Non				
5	Non	Non	Oui				
6	Oui	Non	Oui				
7	Non	Oui	Oui				
8	Oui	Oui	Oui				

Réponses expérimentales attendues

Figure 54: Plan d'expérimentation et réponses expérimentales attendues concernant les différents paramètres de post-traitement à évaluer

Un seul opérateur a été jugé préférable dans un premier temps pour minimiser les incertitudes dues à la segmentation. Les incertitudes de segmentation intra et inter opérateurs, l'effet du temps de commutation des gradients et l'effet d'absence de correction du T2* sont des éléments annexes qui seront à évaluer individuellement.

b.

MESURES

Quelle est la nature et l'ampleur du problème ?

i. Protocole d'évaluation mis en œuvre :

Le protocole d'évaluation mis en œuvre a déjà été détaillé dans la partie « matériels et méthode ».

Le plan d'expérimentation et les réponses ayant été obtenues sont illustrées dans la

Table 11.

Expérience	Correction de mouvements	Ajustement corrigé du T2*	Suppression des valeurs aberrantes	Reproductibilité		Répétabilité	
				Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*	Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*
1	Non	Non	Non	9.2181	8.08308	8.0351	6.61654
2	Oui	Non	Non	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
3	Non	Oui	Non	10.0367	9.45088	7.26223	6.18364
4	Oui	Oui	Non	7.1355	6.94087	2.71022	3.23387
5	Non	Non	Oui	9.25207	8.16843	8.06959	6.73957
6	Oui	Non	Oui	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
7	Non	Oui	Oui	10.1524	8.66263	7.38746	6.01805
8	Oui	Oui	Oui	7.12286	6.78783	2.71564	3.18758

Table 11: Plan d'expérimentation et réponses expérimentales obtenues concernant les différents paramètres de post-traitement à évaluer

Il peut premièrement être observé que les valeurs d'incertitudes de répétabilité sont toutes inférieures à celles retrouvées dans les mesures de reproductibilité. Ces résultats suggèrent une influence significative des variations de positionnement de la souris entre chaque manipulation à l'IRM.

Il peut ensuite être remarqué que les valeurs mesurées pour les conditions avec correction de mouvement sont inférieures aux conditions sans correction de mouvement. Bien qu'il soit encore difficile d'interpréter ces résultats à cette étape, les tendances observées suggèrent une influence de la correction de mouvement sur la diminution des incertitudes de répétabilité et de reproductibilité.

ii. Segmentations inter et intra-opérateur :

Les résultats représentés ci-dessous sont exprimés en pourcentage de variation des mesures (CV). Les termes « Outliers » et « No Outliers » correspondent respectivement aux conditions avec valeurs aberrante et aux conditions sans valeurs aberrante (après leur suppression).

Reproductibilité

Inter-opérateur

	Avec correction de mouvement		Sans correction de mouvement		
	T2* classique	T2* corrigé	T2* classique	T2* corrigé	
Moyenne	2,852	4,134	7,665	8,537	Outliers
	2,852	3,986	7,976	8,005	No Outliers
Médiane	2,139	3,440	9,113	9,268	Outliers
	2,139	3,473	9,209	8,849	No Outliers

Les valeurs de reproductibilité de segmentation inter-opérateur sont toutes inférieures à 4,2% pour les méthodes avec correction de mouvement.

Intra-opérateur

	Avec correction de mouvement		Sans correction de mouvement		
	T2* classique	T2* corrigé	T2* classique	T2* corrigé	
Moyenne	2,397	3,110	8,366	8,198	Outliers
	2,397	3,436	8,921	8,121	No Outliers
Médiane	1,859	2,944	9,682	9,541	Outliers
	1,859	2,968	9,815	8,674	No Outliers

Les valeurs de reproductibilité de segmentation intra-opérateur sont toutes inférieures à 3,5% pour les méthodes avec correction de mouvement.

Répétabilité

Intra-opérateur

	Avec correction de mouvement		Sans correction de mouvement		
	T2* classique	T2* corrigé	T2* classique	T2* corrigé	
Moyenne	0,703	1,468	0,764	1,008	Outliers
	0,703	1,629	0,555	0,285	No Outliers
Médiane	1,061	1,990	0,022	0,681	Outliers
	1,061	1,975	0,132	0,098	No Outliers

Les valeurs de répétabilité de segmentation intra-opérateur sont toutes inférieures à 2% quelles que soient les méthodes utilisées.

iii. Temps de commutation des gradients :

Le temps de commutation des gradients a été remarqué comme étant un paramètre susceptible d'avoir un effet non négligeable sur la diminution du mouvement des images durant les temps d'écho. D'après les explications données sur l'ajustement corrigé du T2* dans la partie « matériels et méthodes », une diminution du mouvement des images engendrerait, en théorie, une diminution de l'incertitude de mesure.

Afin d'étudier l'effet du temps de commutation des gradients sur l'incertitude de mesure, plusieurs séquences ont été répétées à la suite, sans modifier la position de la souris dans l'aimant. Les Figures 55 et 56 représentent les coefficients de variation individuels de chaque mesure appartenant aux séries d'acquisition effectuées en triplicats (n = 7). Ces coefficients de variation ont été représentés en fonction du temps de commutation des gradients.

La Figure 55 correspond aux résultats issus d'un ajustement corrigé des valeurs de T2*.

La Figure 56 correspond aux résultats issus d'un ajustement classique des valeurs de T2*.

Coefficient de variation de chaque mesure en fonction du temps de commutation des gradients

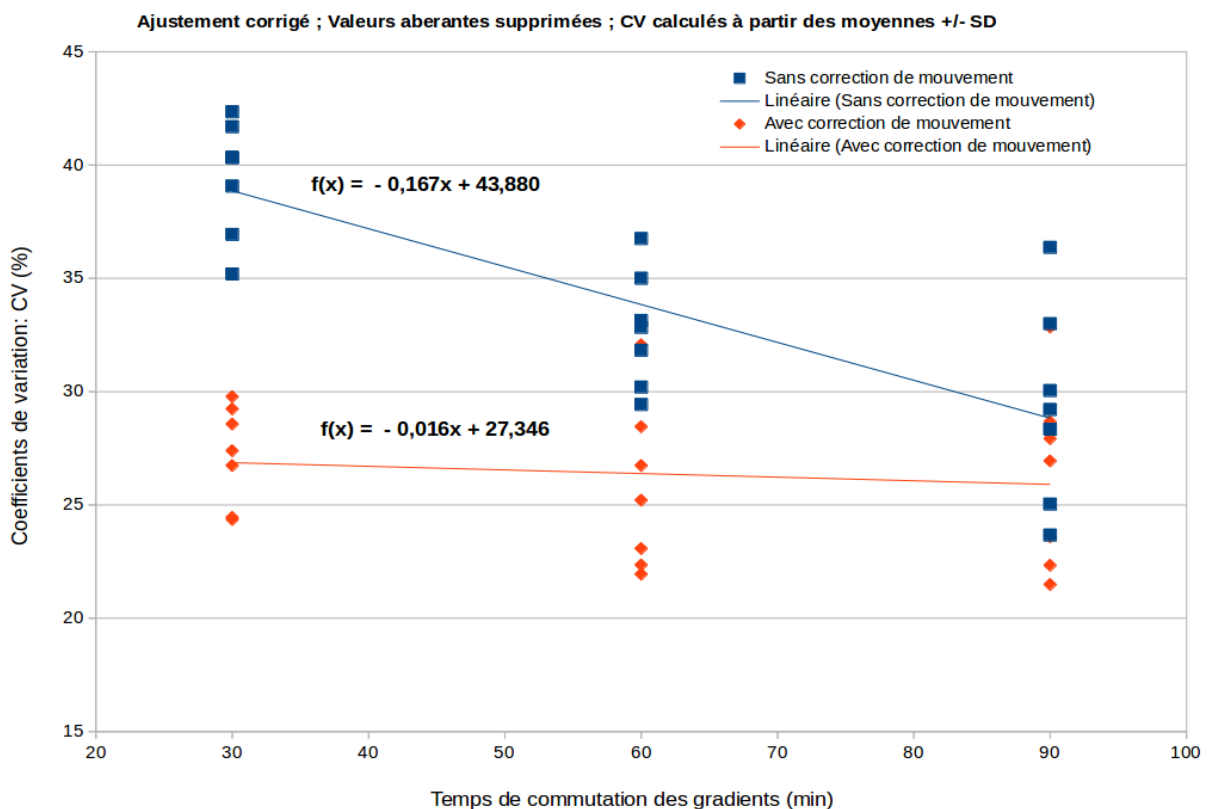


Figure 55: Effet du temps de commutation des gradients sur les coefficients de variations de mesures individuelles de T2* (méthodes avec ajustement du T2* corrigé)

Coefficient de variation de chaque mesure en fonction du temps de commutation des gradients

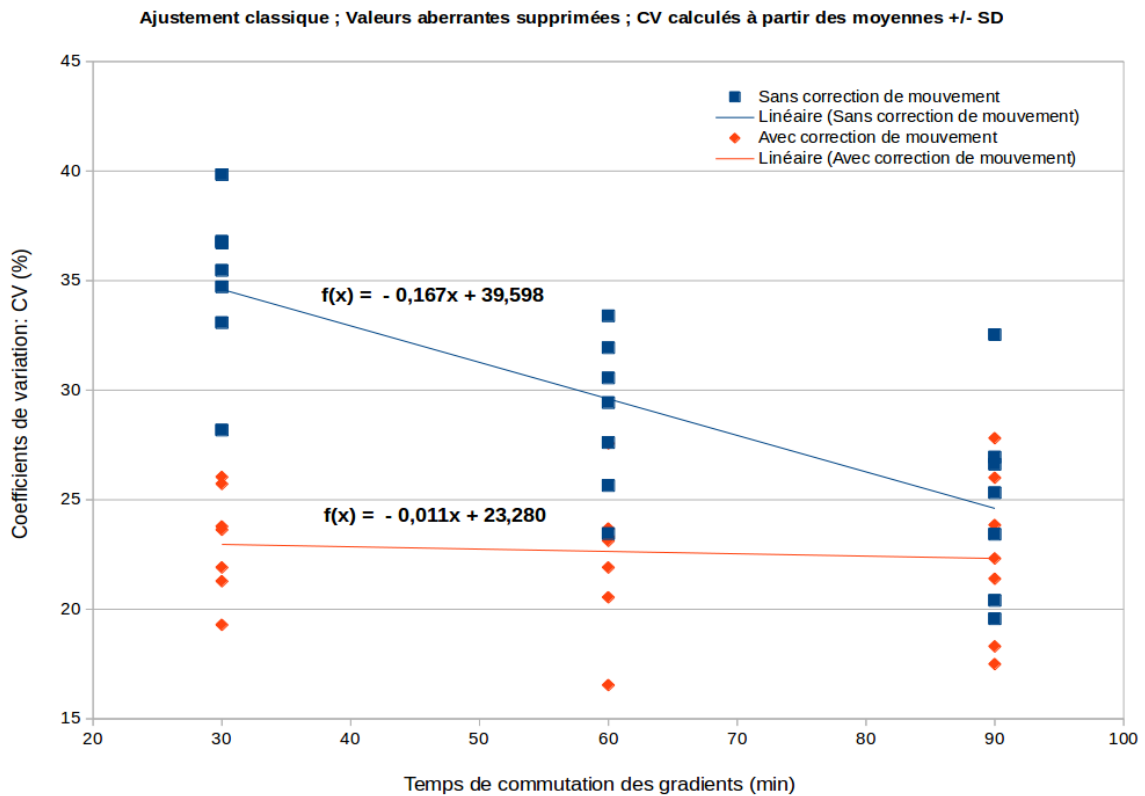


Figure 56: Effet du temps de commutation des gradients sur les coefficients de variations de mesures individuelles de T2* (méthodes avec ajustement classique)

Les résultats représentés sur chaque figure sont issus de deux méthodes de post-traitement :

- **Sans** correction de mouvement / Valeurs moyennes / Sans valeurs aberrantes
- **Avec** correction de mouvement / Valeurs moyennes / Sans valeurs aberrantes

Il peut être remarqué sur chaque figure que les coefficients de variation (CV) des méthodes n'utilisant pas la correction de mouvement semblent diminuer avec le temps de commutation des gradients : le coefficient directeur de la pente est égal à -0.167. Il peut aussi être remarqué que la correction de mouvement semble stabiliser les valeurs de CV dès la première séquence : le coefficient directeur de la pente est diminué d'un facteur 10 pour la Figure 55 et d'un facteur 15 pour la Figure 56. La correction de mouvement effectuée en post-traitement permet de diminuer fortement l'incertitude générée par des gradients « à froid ».

Le profil de distribution des données sur les deux figures sont similaires. L'effet du type d'ajustement du T2* (classique ou corrigé) semble non influent à ce stade.

Ces observations permettent de conclure que l'effet de diminution du mouvement des images (et donc d'incertitude) peut être maîtrisé naturellement par un temps de commutation des gradients prolongé ou artificiellement via une correction de ces mouvements en post-traitement.

iv. Synthèse pour l'évaluation de l'incertitude de mesure (appelée incertitude-type composée) :

L'incertitude-type composée (notée $u_c(y)$) peut être définie comme la somme des toutes les incertitudes-types faisant parties du protocole d'imagerie.

Chaque cause relevée précédemment est caractérisée par une incertitude-type (un écart-type) qui lui est propre. Autrement dit, l'incertitude-type composée peut être définie comme la somme cumulée de l'écart-type respectif (σ) de chaque cause.

Il a été vu précédemment que certaines causes d'incertitudes de mesures avaient été admises, à priori et de façon empirique, comme étant négligeables (volume de la plaque et variables dues à l'environnement de mesure notamment).

D'autres causes d'incertitude sont en revanche à considérer à postériori de l'acquisition des données et de leur post-traitement :

- Aucune dérive d'instrumentation n'a été relevée durant la période d'évaluation. Cette cause d'incertitude a donc été négligée.
- Aucune erreur notable concernant la synchronisation respiratoire durant les séquences d'acquisition et les mesures de cartes B0 n'a été reportée.
- La gestion de l'anesthésie de la souris (fréquence respiratoire et température) a été contrôlée rigoureusement durant tout le protocole d'acquisition. Il a été décidé de ne pas considérer cette cause d'incertitude comme significative.
- D'après les résultats obtenus sur les incertitudes de segmentations, il a été considéré que ces causes d'incertitude seraient négligeables.
- Il a été vu que l'effet de minimisation de l'incertitude de mesure lié au temps de commutation des gradients peut être totalement compensé dès la première séquence par la correction de mouvement (appliquée durant la phase de post-traitement). Il a par conséquent été considéré que cet effet ne serait pas pris en compte.

Toutes les causes citées ci-dessus ne sont donc pas considérées comme des facteurs intervenant dans le calcul de l'incertitude-type composée.

Les seules causes d'incertitudes non-négligeables et évaluables restantes sont celles liées aux méthodes de post-traitement des données.

Chaque méthode de post-traitement est à considérer comme une combinaison entre plusieurs facteurs étudiés. Chaque méthode (combinaison) peut être modélisée mathématiquement comme la somme cumulée du niveau adopté par chaque facteur :

Une méthode de post-traitement

=

Critère étudié (reproductibilité ou répétabilité) + Correction de mouvement (avec ou sans) +
Ajustement du T2* (classique ou corrigé) + Valeurs aberrantes (suppression ou conservation)
+ Expression des résultats (moyenne ou médiane)

Chaque facteur étudié ayant sa propre valeur d'incertitude-type (encore inconnue à ce stade), la mesure du coefficient de variation pour chaque méthode de post-traitement revient à évaluer leur incertitude-type composée respective précédemment décrite. Il y a donc autant d'incertitudes-types composées à évaluer qu'il y a de méthodes de post-traitement (ou de combinaison de facteurs).

L'évaluation de la performance et de la robustesse de chaque méthode est ici rendue possible par le test « gage R&R » à partir de chaque incertitude-type composée déterminée.

v. Performance et robustesse de chaque méthode :

La Figure 57 et la Figure 58 illustrent les pourcentages R&R calculés pour chaque méthode de post-traitement en fonction du niveau de σ adopté.

La Figure 57 représente les résultats issus d'un post-traitement à partir des valeurs médianes.

La Figure 58 représente les résultats issus d'un post-traitement à partir des valeurs moyennes.

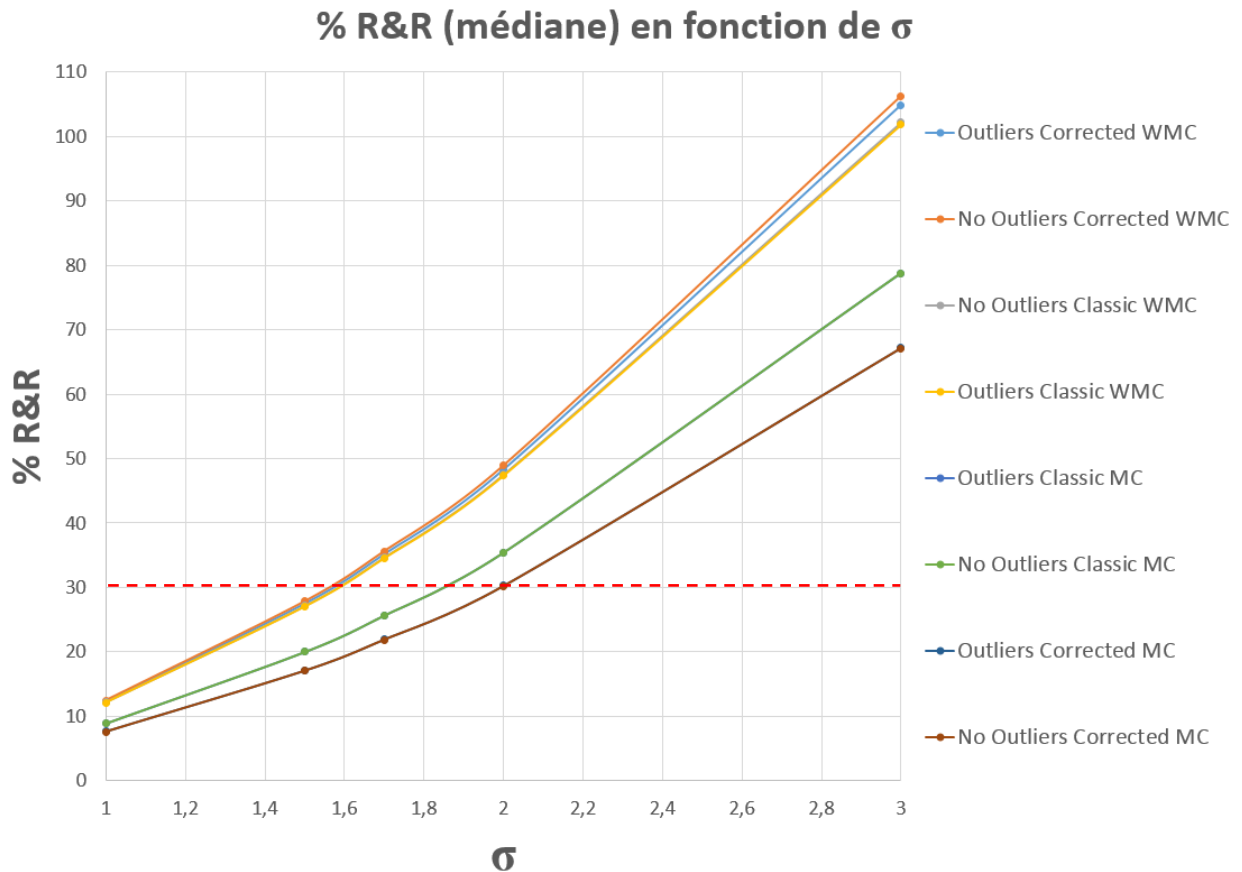


Figure 57: Valeurs de gage R&R (en %) de chaque méthode de post-traitement (à partir des valeurs médianes) en fonction du facteur d'élargissement σ

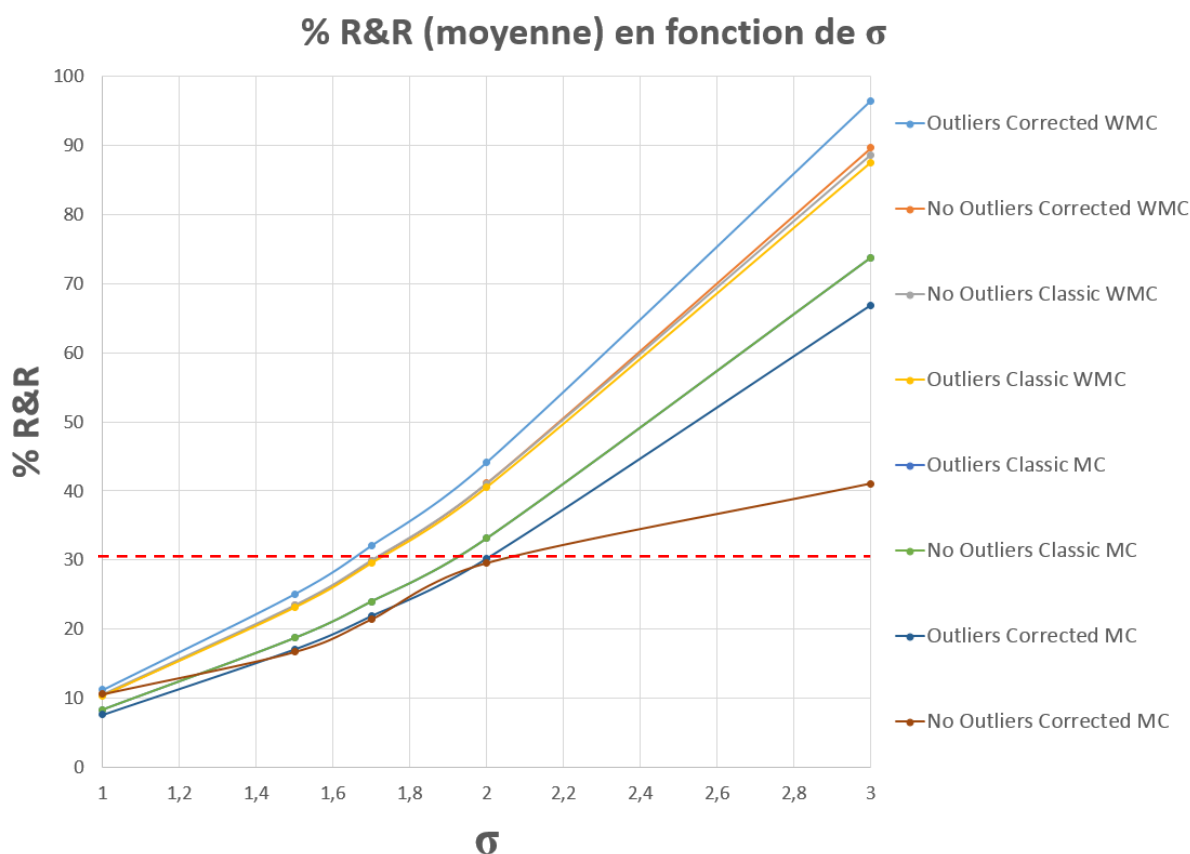


Figure 58: Valeurs de gage R&R (en %) de chaque méthode de post-traitement (à partir des valeurs moyennes) en fonction du facteur d'élargissement σ

La légende des conditions testées est résumée dans la Table 12 :

Conditions	Suppression des valeurs aberrantes	Ajustement du T2* corrigé	Correction de mouvement
Avec	« No Outliers »	« Corrected »	« MC »
Sans	« Outliers »	« Classic »	« WMC »

Table 12: Abréviations utilisées dans les figures

Chaque valeur de pourcentage R&R permet d'évaluer le niveau de performance pour une méthode d'analyse donnée, et selon une valeur de σ donnée. La valeur critique (ou seuil limite d'acceptabilité) de chaque méthode a été fixée pour une valeur de R&R égale à 30%. Autrement dit toute valeur de pourcentage R&R inférieure à 30 %, pour une méthode donnée, signifie que cette méthode est jugée acceptable car suffisamment performante selon les critères de répétabilité et de reproductibilité. La robustesse de mesure de la méthode est évaluable selon le

niveau de σ établi. Selon la Figure 59 et d'après la démarche 6σ , la robustesse de mesure attribuée à l'utilisation d'une méthode augmente d'autant plus que le niveau de sigma fixé est élevé.

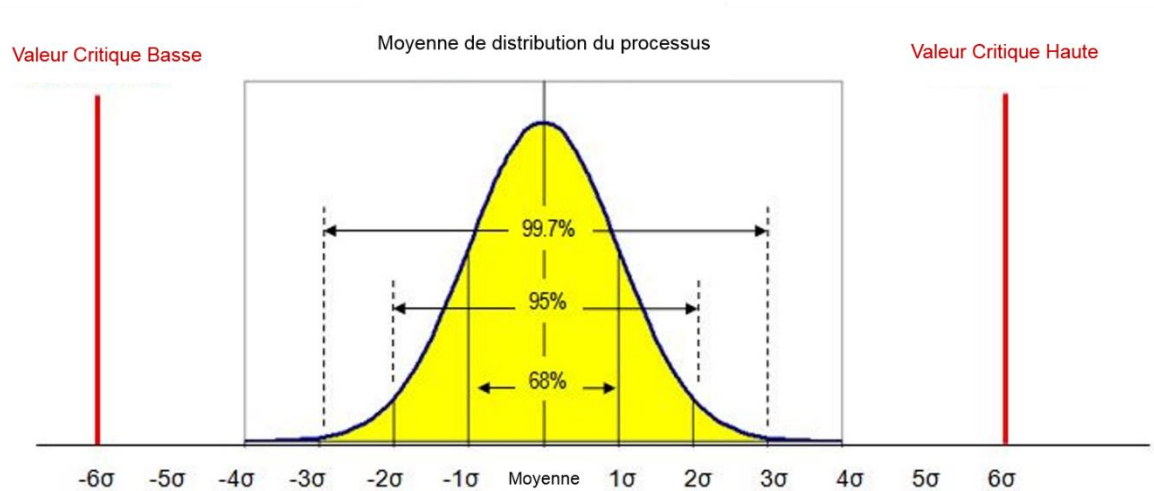


Figure 59: Illustration de la robustesse de mesure selon le niveau de sigma fixé

Les valeurs de pourcentages R&R ont été calculées pour des valeurs de sigma fixées à 1, 1,5, 1,7, 2 et 3 (correspondant respectivement 68,2%, 86,6%, 91,1%, 95,4% et 99,7% de robustesse de mesure).

Il peut être remarqué sur les deux figures que toutes les méthodes utilisant la correction de mouvement respectent les critères d'acceptation fixés jusqu'à un niveau de σ fixé à 1,7 (soit 91,1% de robustesse de mesure). Cela permet d'affirmer que toutes les méthodes utilisant la correction de mouvement sont fiables en considérant une incertitude de 8,9%.

Sur chaque figure, seules deux méthodes sont capables de maintenir un pourcentage R&R sous le seuil limite d'acceptabilité fixé lorsque la valeur de σ est égale à 2 :

- **Avec** valeurs aberrantes / Ajustement du T2* corrigé / Avec correction de mouvement
- **Sans** valeurs aberrantes / Ajustement du T2* corrigé / Avec correction de mouvement

Ces deux méthodes peuvent donc être jugées acceptables en termes de répétabilité et de reproductibilité en considérant un niveau de robustesse de 95,4% (soit 4,6% d'incertitude). Autrement dit, ces deux méthodes garantissent une robustesse de mesure telle que sur 100 jeux de données traités, seuls environ 5 résultats seraient susceptibles de varier.

Au-delà de 2σ , aucune méthode n'est capable de démontrer des niveaux de performances suffisants en termes de répétabilité et de reproductibilité : les valeurs de pourcentage de R&R sont toutes supérieures à 30% quel que soit les conditions.

Il peut en revanche être remarqué que la Figure 58 présente un pourcentage R&R d'environ 40% à 3σ pour la méthode :

« Sans valeurs aberrantes / Ajustement du T2* corrigé / Avec correction de mouvement / expression des résultats en valeurs moyennes »

Cette valeur est inférieure à celle des autres méthodes pour le même niveau de robustesse (99,7%). Cette méthode a donc été considérée comme la meilleure candidate parmi toutes celles présentées pour effectuer des mesures répétables, reproductibles et robustes de T2*.

Selon les résultats indiqués dans le plan d'expérimentation (Table 11), les valeurs d'incertitudes de répétabilité et de reproductibilité pour cette méthode sont respectivement égales à 3,188 % et à 6,788 %.

Ces valeurs d'incertitudes seront utilisées pour représenter et interpréter graphiquement les résultats de mesure de T2* de la plaque avant et après injection d'agent de contraste.

c. ANALYSE

Quelles sont les causes profondes de ce problème ?

- i. Etude quantitative de facteurs (effets principaux et effets d'interactions) :

4 plans factoriels complets à deux niveaux avec trois facteurs étudiés ont été effectués à l'aide du logiciel de planification expérimentale AZURAD® (Marseille, France).

4 types de réponses expérimentales ont donc été renseignées dans le tableau du plan d'expérimentation du logiciel, à partir des résultats obtenus précédemment (Figure 60).

Expérience	Correction de mouvements	Ajustement corrigé du T2*	Suppression des valeurs aberrantes	Reproductibilité		Répétabilité	
				Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*	Incertitude issue des valeurs médianes de T2*	Incertitude issue des valeurs moyennes de T2*
1	Non	Non	Non	↓	↓	↓	↓
2	Oui	Non	Non	↓	↓	↓	↓
3	Non	Oui	Non	↓	↓	↓	↓
4	Oui	Oui	Non	Réponses expérimentales à renseigner			
5	Non	Non	Oui	↓	↓	↓	↓
6	Oui	Non	Oui	↓	↓	↓	↓
7	Non	Oui	Oui	↓	↓	↓	↓
8	Oui	Oui	Oui	↓	↓	↓	↓

Figure 60: Saisie des réponses expérimentales dans le tableau de plan d'expérimentation

Les coefficients de sensibilité de chaque facteur ont été calculés par une méthode de régression basée sur le critère des moindres carrés. L'effet principal de chaque facteur et les effets d'interaction ont été évalués selon le degré de significativité de leur coefficient de sensibilité. Le degré de significativité de chaque coefficient a été calculé selon un test de Student bilatéral ($\alpha = 0,05$). Le calcul de la variance de l'erreur expérimentale a été réalisé à partir d'une variance expérimentale connue et d'un nombre de degré de liberté (DDL) spécifique :

Calcul de la variance expérimentale :

La variance expérimentale a été estimée à partir de la formule de l'écart-type relatif (<https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html> , consultés en 07/2019). L'écart-type relatif peut être vu en quelque sorte comme une « incertitude de l'incertitude » calculé sur la base de la grandeur d'une série de mesures. Il peut être calculé selon la formule suivante :

$$s(q) = [2(n-1)]^{-1/2} = [2 \times (10 - 1)]^{-1/2} = 0,2357$$

Avec $s(q)$ l'écart-type relatif et n la grandeur de chaque série mesurée.

La variance expérimentale est égale au carré de l'écart-type relatif soit :

$$\text{Variance}_{(\text{exp})} = (s(q))^2 = 0,0555$$

Calcul du nombre de degré de liberté :

Le nombre de degré de liberté a aussi été calculé selon les recommandations du GUM (8). Pour un ajustement par méthode des moindres carrés de m paramètres pour n données, le nombre de degré de liberté de l'incertitude-type de chaque paramètre est $\nu = n - m$ soit $\nu = 10 - 3 = 7$.

Les résumés des calculs statistiques effectués pour chaque condition expérimentale à évaluer sont visibles sur les annexes 4 à 8.

La dernière étape concerne l'interprétation du traitement à partir des graphiques des effets (Figure 61) et des diagrammes des effets d'interaction (Figure 62) pour chaque type de réponse expérimentale.

Effets principaux :

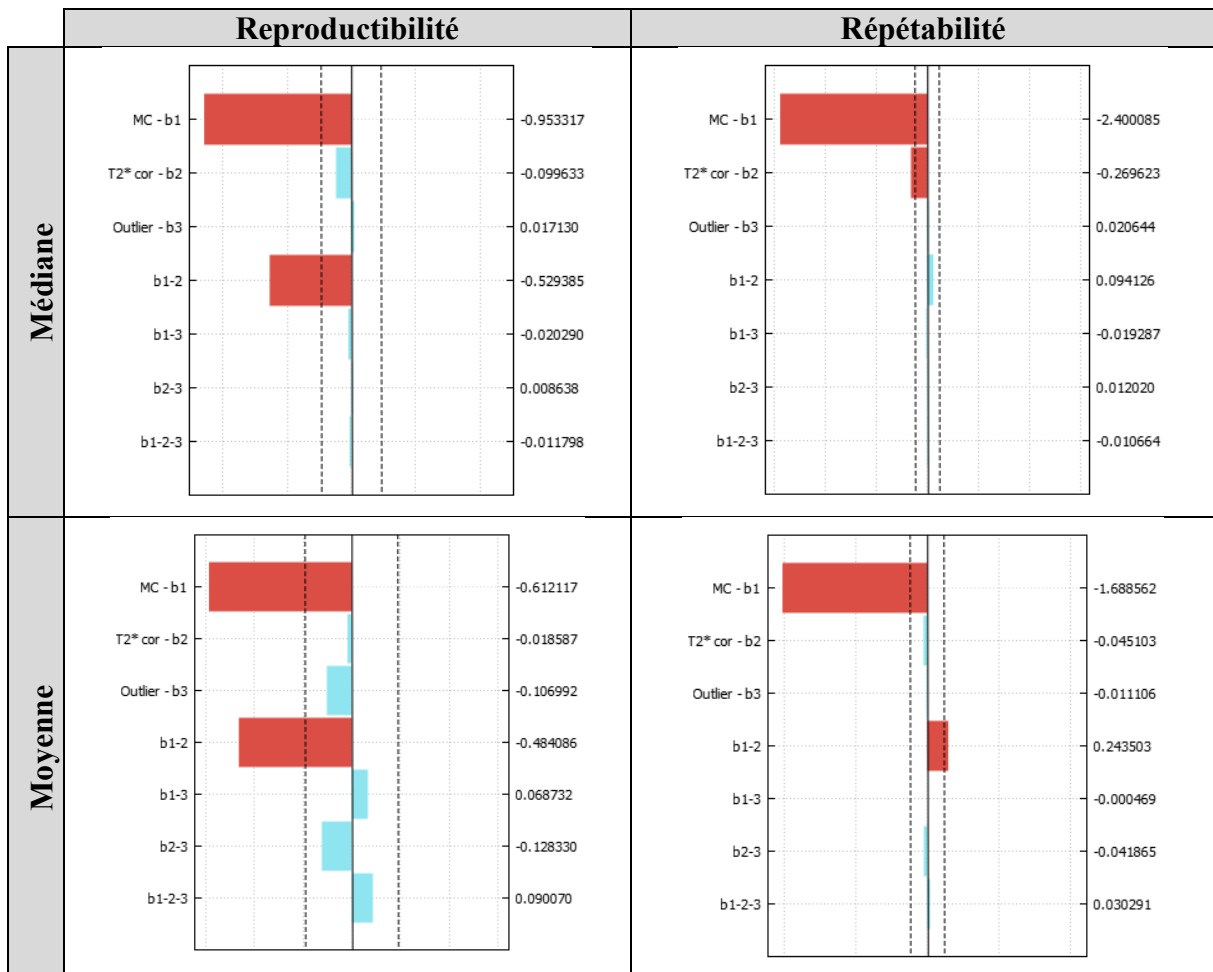


Figure 61: Graphiques des effets évalués pour la reproductibilité et la répétabilité du protocole d'imagerie à partir des résultats issus des valeurs médianes et des valeurs moyennes

Les paramètres ayant été étudiés sont l'effet de la correction de mouvement (« *MC-b1* »), de l'ajustement corrigé du T2* (« *T2* cor -b2* »), et de la suppression des valeurs aberrantes (« *Outlier-b3* »). Tous les effets d'interactions ont aussi été étudiés et représentés :

- Effet de correction de mouvement associé à un ajustement corrigé du T2* (« *b1-2* »)
- Effet de correction de mouvement associé à la suppression des valeurs aberrantes (« *b1-3* »)
- Etc...

Les valeurs de coefficient de chaque modèle sont indiquées à la droite de chaque graphique. Les valeurs négatives des coefficients correspondent à un effet de diminution de l'incertitude de mesure. Les seuils de significativité sont indiqués sur chaque graphique en pointillés. Les barres rouges indiquent un effet significatif et les barres bleues indiquent un effet non significatif.

Il peut être remarqué pour toutes les conditions que le facteur « correction de mouvement » est marqué d'un effet principal majoritaire de diminution de l'incertitude de mesure. Ce facteur est ici à considérer comme étant le plus influent sur la diminution d'incertitude de mesure. Un effet d'interaction entre la correction de mouvement et l'ajustement corrigé de T2* existe pour les conditions de reproductibilité. Cette association de facteurs exerce une influence significative de diminution de l'incertitude de mesure. Cet effet est le deuxième plus influent après l'effet principal dû au facteur « correction de mouvement ».

Les conditions de répétabilité sont aussi marquées par un effet principal de diminution d'incertitude avec le facteur « ajustement corrigé du T2* » pour les résultats obtenus à partir des valeurs médianes. Un effet d'interaction d'augmentation de l'incertitude de mesure peut enfin être observé pour l'association des facteurs « correction de mouvement » et « ajustement corrigé du T2* » pour les résultats obtenus à partir des valeurs moyennes. Ces deux effets, bien que significatifs, restent très faibles comparés à l'effet isolé de correction de mouvement. La suppression des valeurs aberrantes n'est pas un facteur à considérer comme ayant une influence significative quelle que soit la méthode utilisée.

Effets d'interaction :

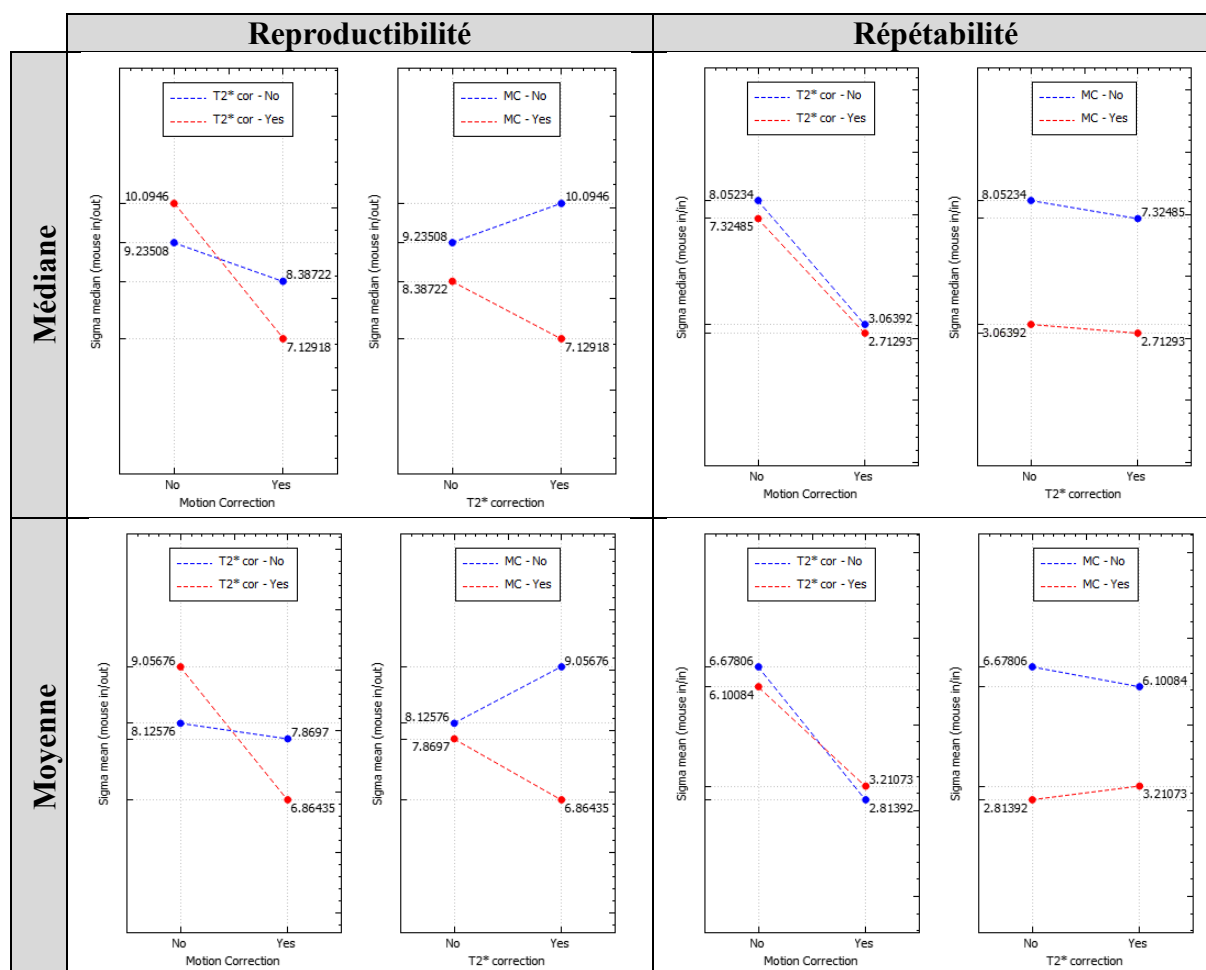


Figure 62: Diagrammes des effets d'interaction pour la reproductibilité et la répétabilité du protocole d'imagerie à partir des résultats issus des valeurs médianes et des valeurs moyenne

Les diagrammes d'interactions représentent l'évolution des réponses expérimentale mesurées en fonction du niveau pris par chaque facteur. L'interprétation des diagrammes des effets des interactions repose sur l'analyse du parallélisme des droites. Deux droites parallèles signent une absence d'interaction (la réponse augmente ou diminue en fonction du facteur représenté en abscisse indépendamment du niveau du second facteur). A l'inverse, deux droites non parallèles indiquent une interaction "forte" entre les deux facteurs représentés.

Il est ainsi remarqué que de fortes interactions existent entre les facteurs « correction de mouvement » et « ajustement corrigé du T2* » pour les conditions de reproductibilité. Ces interactions entraînent une diminution de l'incertitude de mesure lorsque les deux facteurs sont utilisés ensemble.

Cette interaction est retrouvée de façon beaucoup plus modérée pour la condition de répétabilité (résultats exprimés en valeurs moyennes). Les résultats exprimés en valeurs médiane montrent en revanche une absence d'interaction entre les deux facteurs pour la condition répétabilité.

2. Injection in-vivo de particules (preuve de concept) :

Différent type de particules ont été injectées dans des souris ApoE^{-/-}. Le faible nombre de souris ne permettra pas d'émettre de conclusion concernant une éventuelle accumulation des particules au niveau de la plaque d'athérome. Cependant, ces résultats préliminaires feront l'objet d'études complémentaires visant à confirmer les tendances observées ci-dessous. Les interprétations des résultats issus des figures suivantes sont donc à considérer comme des preuves de concept sur la capacité du protocole d'imagerie mis en place pour mesurer correctement le T2* de la plaque d'athérome.

a. Nanoparticules de 2 nm

Les particules NP-PEG1K-OH ont été injectées dans 3 souris ApoE^{-/-} avec une concentration en fer fixée à 3 mg/kg. Le diamètre hydrodynamique de ces particules est égal à 20 nm. Les valeurs de T2* ont été évaluées jusqu'à 48h00 post-injection et sont représentées sur la Figure 63.

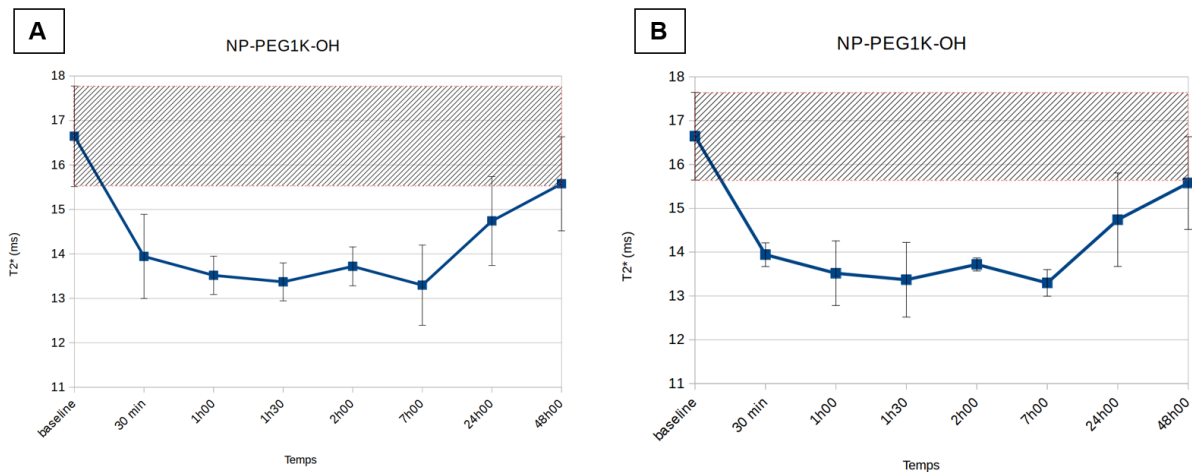


Figure 63: Valeurs de T2* de la plaque d'athérome avant (baseline) et après injection des NP-PEG1K-OH (n = 3) représentées avec : (A) incertitudes de mesures relatives (B) écarts-types inter-souris

Les « barres d'erreurs » en (A) représentent l'incertitude de mesure relative de chaque point. Ces valeurs sont calculées à partir des incertitudes de répétabilité et de reproductibilité déterminées précédemment. Les « barres d'erreurs » en (B) représentent l'écart-type des résultats inter-souris (n = 3). Il peut être ainsi remarqué que la valeur de T2* basale moyenne de la plaque diminue brutalement dès les 30 premières minutes après injection puis atteint une

valeur plateau jusqu'à 7h00 post-injection. Le T2* de la plaque revient ensuite progressivement et quasi-totalement à sa valeur d'origine entre 24h00 et 48h00 post-injection.

Au regard des incertitudes de mesure pour chaque point, la diminution des valeurs de T2* suivi d'un retour quasi-total à des valeurs « basales » suggère une accumulation éventuelle des agents de contraste au sein de la plaque d'athérome entre 30 minutes et 7h00 post-injection. Il peut ensuite être supposé que les agents de contraste sont éliminés progressivement de la plaque entre 7h00 et 48h00 post-injection.

Ces résultats préliminaires semblent indiquer une tendance à l'accumulation des agents de contraste au sein de la plaque d'athérome sur une fenêtre comprise entre 30 minutes et 7h00 post-injection.

b. Nanoflowers OH ou SCE5

Les nanoflowers non-fonctionnalisées (NF-PEG4K-OH) ont été injectées sur une souris à une concentration en fer fixée à 3 mg/kg. Les nanoflowers fonctionnalisées (NF-PEG4K-SCE5) ont été injectées sur une deuxième souris à la même concentration en fer. Le diamètre hydrodynamique des particules est égal à 50 nm. Les valeurs de T2* ont été évaluées jusqu'à 18 jours post-injection et sont représentées sur la Figure 64 en (A) pour les particules non-fonctionnalisées et en (B) pour les particules fonctionnalisées.

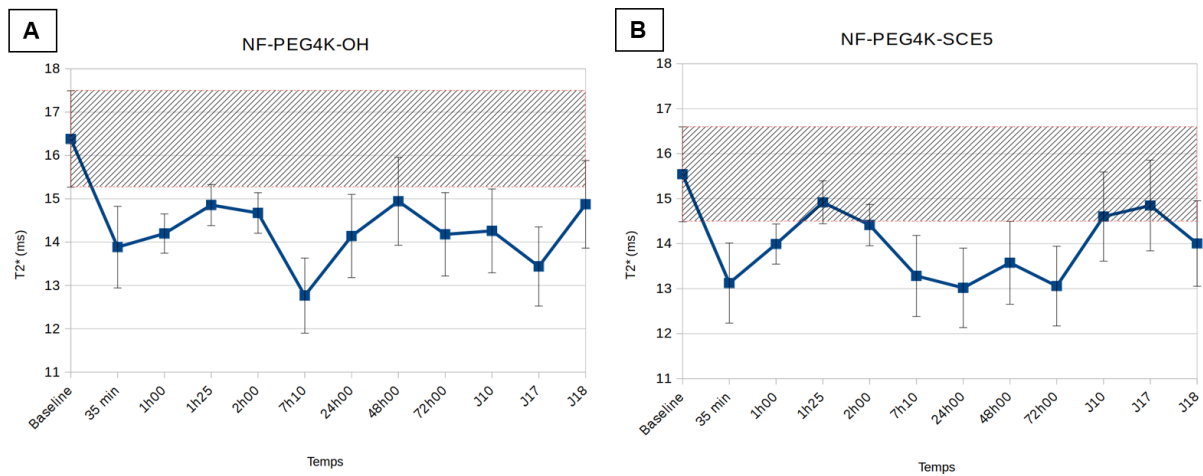


Figure 64: Valeurs de T2* de la plaque d'athérome avant (baseline) et après injection des : (A) NF-PEG4K-OH (n = 1) ; (B) NF-PEG4K-SCE5 (n = 1)

Les « barres d'erreurs » représentent l'incertitude de mesure relative de chaque point. Il peut être remarqué sur les deux figures que le profil des valeurs de T2* est similaire jusqu'à 7h00 post-injection :

- La valeur de T2* basale diminue dès les 35 premières minutes post-injection
- Le T2* de la plaque ré-augmente progressivement jusqu'à 1h25 après injection puis semble diminuer légèrement à 2h00
- Le T2* re-diminue à 7h00 post-injection

Les points d'acquisitions suivants montrent ensuite des différences de profils des valeurs de T2* selon le type de particules :

- Pour les particules non fonctionnalisées, le T2* de la plaque semble ré-augmenter jusqu'à 48h00 pour finalement osciller autour d'une valeur plateau jusqu'à 18 jours post-injection. Les points à 48h00 et J18 montrent un chevauchement des zones

d'incertitudes de mesure avec le point initial, à la différence des points situés dans cet intervalle pour lesquels les valeurs de T2* sont toutes en dehors.

- Pour les particules fonctionnalisées, le T2* de la plaque semble se stabiliser dans une zone de limite basse entre 7h00 et 72h00 post-injection. Les valeurs de T2* remontent finalement dans la zone d'incertitude de mesure initiale à partir de J10 jusqu'à J18.

Le faible nombre de souris pour chaque lot de particule testée ne permet pas de conclure sur une éventuelle accumulation des agents de contraste au sein de la plaque d'athérome. Cependant, la similarité des profils de valeurs de 12 mesures indépendantes sur 24 reste un point intéressant à souligner, d'autant plus que les souris et les particules injectées sont différentes.

Les particules diffèrent par leur chimie de surface (greffage ou non par des scFv). Cependant il doit être rappelé que les particules-SCE5 ont un rendement de greffage d'environ 30% et que la distribution de taille d'un lot n'est jamais totalement uniforme. Il existe ainsi dans ce lot des particules non greffées possédant une conformation chimique et des distributions de tailles similaires aux NF-PEG4K-OH.

Les souris diffèrent intrinsèquement par leur composition moléculaire intra-plaque. Cependant, le critère de sélection des souris mis en place (volume de plaque) et le régime alimentaire commun des souris sont des éléments qui permettent d'émettre l'hypothèse que les différences de composition de plaque entre souris sont négligeables.

Partant de ces postulats, plusieurs hypothèses empiriques concernant la biodistribution des particules permettraient d'expliquer les observations précédentes :

- Les plus petites particules s'accumulent au sein de la plaque durant les premières minutes post-injection (jusqu'à 35 minutes) puis sont éliminées rapidement avec le torrent circulatoire (entre 35 minutes et 1h25 post-injection).

NF-PEG4K-OH :

- A partir de 1h25 et jusqu'à 7h00 post injection, un phénomène d'accumulation passif a lieu pour les particules NF-PEG4K-OH ayant la même taille que les fenestrations de la plaque d'athérome (vasa-vasorum).
- Les particules sont ensuite éliminées lentement avec le torrent circulatoire mais sont remplacées par d'autres particules : un état d'équilibre apparaît entre 24h00 et J18.

NF-PEG4K-SCE5 :

- A partir de 1h25 et jusqu'à 72h00 post-injection, un phénomène d'accumulation actif a lieu pour les particules NF-PEG4K-SCE5 : ces particules se fixent sur les récepteurs de

la plaque exprimant la GPIIbIIIa activée (de façon spécifique) ou sur d'autres récepteurs (de façon non spécifique)

- Les particules restent accumulées au sein de la plaque jusqu'à 72h00 post injection puis sont éliminées progressivement

La Figure 65 est un résumé des profils de valeurs de T2* de la plaque post-injection des deux types de particules.

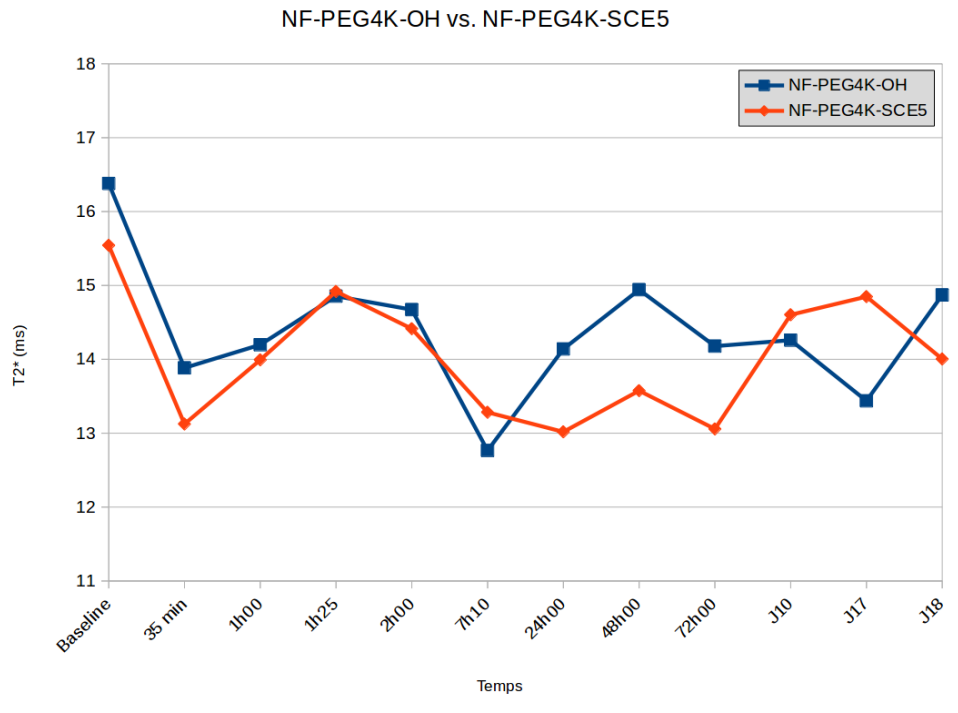


Figure 65: Comparaison des profils des valeurs de T2* de la plaque d'athérome avant (baseline) et après injection des NF-PEG4K-OH et des NF-PEG4K-SCE5 (n = 1)

Les hypothèses ci-dessus ont été posées par empirisme et sont donc à considérer avec précaution. Ces résultats, bien qu'intéressants, sont préliminaires et devront faire l'objet d'études plus approfondies afin de pouvoir confirmer les hypothèses émises.

C. REFERENCES :

1. Pinho SLC, Pereira GA, Voisin P, Kassem J, Bouchaud V, Etienne L, et al. Fine Tuning of the Relaxometry of γ -Fe₂O₃@SiO₂ Nanoparticles by Tweaking the Silica Coating Thickness. ACS nano. 2010;4(9):5339-49.
2. Deramchia K. Interrogation de la plaque d'athérome par phage- -display in vivo une approche pour un ciblage moléculaire à l'aide d'anticorps humains armés pour l'imagerie et la thérapie 2010.
3. Schwarz M, Rottgen P, Takada Y, Le Gall F, Knackmuss S, Bassler N, et al. Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin alphaIIb beta3 designed by subtractive selection from naive human phage libraries. Faseb J. 2004;18(14):1704-6.
4. Port JD, Pomper MG. Quantification and minimization of magnetic susceptibility artifacts on GRE images. J Comput Assist Tomogr. 2000;24(6):958-64.
5. Dahnke H, Schaeffter T. Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T2 relaxometry. Magn Reson Med. 2005;53(5):1202-6.
6. Sigovan M, Bessaad A, Alsaïd H, Lancelot E, Corot C, Neyran B, et al. Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE^{-/-} mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. Invest Radiol. 2010;45(11):702-7.
7. Klug G, Kampf T, Ziener C, Parczyk M, Bauer E, Herold V, et al. Murine atherosclerotic plaque imaging with the USPIO Ferumoxtran-10. Frontiers in bioscience (Landmark edition). 2009;14:2546-52.
8. Box GE, Hunter WG, Hunter JS. Statistics for experimenters. 1978.

Discussion et perspectives :

Malgré tous les progrès médicaux effectués durant ces dernières décennies concernant le diagnostic, la prise en charge et le traitement de l'athérosclérose, les complications cardiovasculaires liées à cette pathologie restent la principale cause de mortalité au niveau mondial. La compréhension et la mise en évidence des mécanismes moléculaires induisant la rupture de la plaque d'athérome est depuis plusieurs années un champ d'investigation très actif. Dans ce domaine, l'imagerie moléculaire par IRM est particulièrement adaptée pour des études longitudinales de la plaque chez l'homme ou l'animal grâce à son absence de rayonnements ionisants et sa bonne résolution spatiale. Dans le but de caractériser la plaque d'athérome *in vivo*, par IRM et à l'échelle moléculaire, il est souvent nécessaire d'utiliser des agents de contraste (de type USPIOs par exemple) en combinaison avec des protocoles d'imagerie adaptés.

Bien que certains USPIOs aient été approuvés par les autorités de régulation durant des années, leur utilisation en clinique est devenue de plus en plus limitée et ceci s'est traduit par un retrait progressif du marché de la majorité des USPIOs (1, 2). A ce jour, seuls le ferumoxytol et le ferucarbotran (Resovist® / Cliavist®) sont encore utilisables en clinique (1, 3). Le développement de nouveaux USPIOs est actuellement un axe de recherche qui semble cependant représenter un intérêt majeur pour l'imagerie moléculaire. Dans ce cadre, Wang et al. ont récemment souligné l'importance d'une amélioration des protocoles d'imagerie IRM (acquisition et post-traitement) pour l'évaluation et la quantification de la concentration des USPIOs au sein des tissus/organes (1). Le développement et l'évaluation de nouveaux agents de contraste nécessitant d'abord des essais pré-cliniques, il est à ce jour primordial de valider des protocoles d'imagerie adaptés au petit animal.

Le projet présenté ici a tenté d'apporter des solutions aux problèmes soulevés par la recherche et le développement de nouveaux agents de contraste appliqués à l'imagerie moléculaire.

Au cours de cette thèse, l'objectif général a été de développer différents outils pour l'imagerie non-invasive permettant la caractérisation pré-clinique de la plaque d'athérome chez le petit animal (protocole d'imagerie + agents de contraste ciblant).

La première phase du projet a permis la synthèse et la caractérisation de différents agents de contraste (USPIOs) ayant des propriétés multimodales dédiées à l'IRM et à l'imagerie proche infrarouge.

Dans un second temps, un travail a été consacré à la production d'anticorps humains recombinants spécifiques de la plaque d'athérome (scFv) et à leur fonctionnalisation sur les USPIOs par différentes voies de greffage.

Dans une optique de démarche qualité s'inspirant de la méthode « Six Sigma », un protocole d'imagerie paramétrique par IRM a ensuite été développé et validé afin de permettre une caractérisation robuste du T2* de la plaque d'athérome chez des souris ApoE^{-/-}.

Au cours d'une dernière étape, la cinétique d'accumulation des agents de contraste ciblant a été étudiée *in vivo* chez la souris ApoE^{-/-} à partir du protocole d'imagerie validé.

A. Nanoparticules d'oxyde de fer :

La synthèse des USPIOs a été conditionnée par un cahier des charges établi selon différents critères abordés dans l'introduction : la relaxivité des particules, la furtivité vis-à-vis du système réticulo-endothélial, les propriétés de ciblage passif, les propriétés de ciblage actif.

A partir de ces spécifications, trois types d'USPIOs ont été synthétisés PEGylés et caractérisés :

- Des SPC qui sont un ensemble de nanoparticules d'oxyde de fer structurées « en grappe », et qui permettent d'offrir un grand nombre de particules superparamagnétiques localement. Les SPC ont une taille moyenne hydrodynamique de 125 nm.
- Des Nanoflowers (NF) qui sont des particules ayant une structure cristalline particulière qui leur permet d'obtenir des relaxivités augmentées comparées à des particules classiques (4, 5). Les nanoflowers ont une taille moyenne hydrodynamique de 48 nm.
- Des nanoparticules (NP) de petite taille hydrodynamique (20 nm) qui permettent de répondre à des questions de pharmacocinétique et d'accumulation au sein de la plaque via le vasa-vasorum (6, 7).

Une relaxivité élevée permet une diminution des concentrations d'agent de contraste injectable tout en ayant un contraste équivalent. Les mesures de relaxivité ont toutes été effectuées à 4.7T. Les relaxivités r2 et r2* à 4.7 T des SPC sans PEG (étape pré-couche de silice) est équivalente aux résultats obtenus par Brisset et al. sur du ferumoxtran-10 (8). Ces valeurs sont cependant inférieures à celles reportées par Rohrer et al. dans une matrice eau à 37°C pour le Resovist® (9). Nos valeurs de relaxivités diminuent entre l'étape « pré-couche de silice » et l'étape « SPC-

PEG ». Cette diminution des valeurs de relaxivité impacte de façon plus marquée les valeurs de relaxivité r_2 que les valeurs r_2^* . Ceci peut être expliqué par le fait qu'une couche supplémentaire de silice est ajoutée entre les deux étapes. Nos résultats semblent en accord avec l'étude menée en 2010 par Pinho et al. qui ont montré une influence négative de l'épaisseur de la couche de silice sur la relaxivité des nanoparticules (10).

Les valeurs de relaxivité r_2 et r_2^* des nanoflowers sont très importantes comparées à celles des SPC, à celles du ferumoxtran-10 (8), ou au r_2 du Resovist® (9). Ce type de nanoparticules présente donc un intérêt particulier pour les études *in vivo* puisqu'en plus de leurs relaxivités importantes, elles présentent un diamètre hydrodynamique moindre comparée au SPC (ce qui peut permettre une amélioration de la pharmacocinétique et du ciblage passif). Ces deux facteurs font de ces particules un outil d'imagerie à fort potentiel pour l'imagerie moléculaire. La relaxivité des nanoparticules de petite taille (20 nm) doit être encore caractérisée via le système de mesure thermostaté mis au point durant cette thèse. L'intérêt principal d'un tel dispositif de mesure repose sur sa capacité à faire varier la température des échantillons afin de se rapprocher au mieux des valeurs de relaxivités expérimentales après injection *in vivo*. Le deuxième avantage de ce système est qu'il a été conçu de façon à limiter la formation de bulles d'air autour des échantillons, qui peuvent induire localement des artefacts de susceptibilité magnétique et perturber la mesure des taux de relaxation des échantillons inclus dans les puits ($R = 1/T$). Les échantillons étant des USPIOs qui induisent eux-mêmes des hétérogénéités locales de champ magnétique, il était important pour leur caractérisation, de concevoir un système permettant de s'affranchir au mieux de toute interférence de mesure liée à des causes externes. Différents systèmes de mesure de relaxivité inspirés de ces spécifications ont déjà été reportés dans la littérature (11, 12). Le système développé durant ce projet présente cependant certaines limites qui doivent être soulignées et qui concerne la préparation des échantillons qui peut s'avérer longue et fastidieuse (mélange eau/agarose 1% (v/v)). Celle-ci requiert un chauffage continu des mélanges afin d'éviter la réticulation à température ambiante de l'agarose : une attention particulière doit aussi être portée sur la répétabilité des gestes lors de l'inclusion des échantillons dans chaque puits afin d'éviter toute présence de bulles d'air. En somme, ce dispositif de mesure représente tout de même un outil de caractérisation des particules intéressant, au regard du faible nombre de publications traitant de la relaxivité d'USPIOs à 4.7T. Les résultats présentés, bien que préliminaires, ont montré la faisabilité d'étude des relaxivités des USPIOs à 4.7T et à différentes températures.

Les valeurs de relaxivités devront, à terme, être utilisées *in vivo* pour évaluer la concentration des particules accumulées au sein de la plaque d'athérome (13). Des études complémentaires

seront cependant nécessaires afin d'évaluer des variations de relaxivités des particules suite à leur internalisation dans des cellules (par exemple des macrophages, comme rapporté dans l'étude de Brisset et al. (8)).

Dans ce sens, la toxicité cellulaire induite par une exposition aiguë aux nanoparticules devra être évaluée *in vitro* via des essais tels que le test MTT (qui est un dosage colorimétrique mesurant la viabilité cellulaire) (14).

L'amélioration de la furtivité des nanoparticules en fonction de la densité de greffage en PEG sera un paramètre à étudier *in vivo* en mesurant l'accumulation au cours du temps des particules d'oxyde de fer au niveau du foie (qui est l'organe principal responsable de l'élimination de nanoparticules). Cette étude sera menée prochainement par IRM. La biodistribution des particules bi-modales (IRM/Fluorescence) peut être étudiée en confrontant les images IRM et les images de fluorescence. D'autres organes d'épuration tels que la rate, les reins, les poumons ou les intestins peuvent être impliqués dans l'élimination des nanoparticules. La fluorescence de ces organes peut être évaluée dans le temps afin d'observer la cinétique d'élimination des particules (15). L'imagerie PET est une technique plus sensible que l'IRM, et qui est préférentiellement utilisée pour les études de pharmacocinétique par imagerie. Cette technique pourrait éventuellement être utilisée à condition de marquer les particules par un isotope radioactif, comme dans l'étude de Millon et al. menée sur le lapin en 2013 (16).

Les propriétés de ciblage passif et actif *in vivo* des NF et des NP au niveau de la plaque d'athérome a été évaluée de façon préliminaire par IRM sur des souris ApoE^{-/-}. Cette étude fera l'objet d'une partie détaillée en fin de discussion.

B. Production des scFv et fonctionnalisation des USPIOs :

1. Production des scFv :

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle complexe qui présente un nombre important de marqueurs moléculaires pouvant faire office de cibles pour la détection de la plaque d'athérome à risque de rupture. Dans ce projet, deux fragments d'anticorps (scFv) ont été produits : le H2.1-LPETG et le SCE5-LPETG.

Le H2.1-LPETG est un anticorps qui a été précédemment identifié au sein de l'équipe par la biotechnologie de phage-display *in vivo* et qui présente une bonne reconnaissance de la plaque d'athérome à risque de rupture à la fois dans les modèles animaux et dans les biopsies humaines (17, 18). Durant cette thèse, le H2.1-LPETG a été produit par culture cellulaire et sa réactivité

a été testée sur des coupes d'aorte de souris et de coronaires humaines. Cependant, ce scFv produit et purifié au cours de cette thèse et envoyé dans le laboratoire de Christoph Hagemeyer en Australie, n'a pas été utilisé pour les études de greffage pendant la réalisation de ma mobilité. La collaboration avec l'équipe du Dr. Hagemeyer est toujours d'actualité. Ainsi, le H2.1-LPETG pourra prochainement faire l'objet d'études complémentaires avec les NP citées plus haut.

L'anticorps avec lequel nous avons réalisé les premières preuves de concept est le SCE5-LPETG, anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activée utilisé régulièrement par l'équipe du Dr. Hagemeyer. La réactivité de cet anticorps pour les plaquettes activées a été démontrée à plusieurs reprises au cours de leurs différents travaux (19-21). La réactivité de ce scFv n'a pas été reconstruite par IHC durant cette thèse mais des expérimentations antérieures dans notre laboratoire avaient montré, pour cet anticorps également, une bonne reconnaissance de la plaque d'athérome. La fixation du SCE5-LPETG sur des plaquettes activées a en revanche été testée ($n = 1$) au cours d'expériences de cytométrie en flux effectuées après le greffage enzymatique.

2. Greffage site-spécifique (Melbourne) :

Un protocole de greffage du SCE5-LPETG sur les SPC a été mis au point à partir du savoir-faire de l'équipe du Dr. Hagemeyer. Nos résultats préliminaires tendent à montrer que la fixation du SCE5 sur les SPC via la sortase est sous-optimale. Les tendances observées devront être confirmées en reproduisant les expériences menées à Melbourne. Cependant ces premiers résultats laissent supposer qu'il serait nécessaire soit de développer d'autres stratégies de greffage, soit d'utiliser des nanoparticules de plus petite taille.

Le rendement de greffage n'a pas été mesuré. Ce point restera à éclaircir lors des prochaines expériences par des analyses quantitatives des gels d'électrophorèse.

3. Greffage via la méthode ester de NHS-amines :

Il a été effectué plusieurs greffages du SCE5 sur les particules de type nanoflower (NF). Le rendement de greffage obtenu n'est pas pleinement satisfaisant (entre 50% et 30% de rendement selon le nombre d'anticorps greffés). Une hypothèse peut être émise quant à la présence du LPETG qui pourrait encombrer les sites réactifs utilisés pour la conjugaison du fragment à la surface des NPs. Dans ce cas une idée serait d'allonger quelques bras espaceurs, à base de macromolécules de PEG hétérobifonctionnels utilisés pour le couplage, de façon à faire ressortir

les sites de liaison (maléimides) de la couronne de PEG de la NP. L'autre option serait de retravailler l'étape préliminaire de thiolation à l'iminothiolane dans le cas où les conditions usuelles (excès d'un facteur 20 en réactif de Traut) seraient déplacées. A partir de ces hypothèses, une étude d'optimisation du protocole de greffage pourrait être entreprise afin de limiter au maximum la perte des scFv utilisés.

Des expériences de cytométrie en flux ont été effectuées par la suite dans le but d'étudier la fixation spécifique des particules sur des cellules CHO exprimant l' α IIb β 3 activée. L'expression des récepteurs sur ces cellules n'a pu être vérifiée par immuno-marquage avec l'anticorps commercial, PAC1, une IgM strictement spécifique de l' α IIb β 3 activée.

En dépit d'un manque de contrôles négatifs et positifs (NF-mutant et PAC1), les résultats préliminaires présentés sont encourageants, avec une reconnaissance des cellules CHO exprimant les récepteurs α IIb β 3 activés (à un faible taux certainement) supérieure pour les NF fonctionnalisées avec le SCE5 que pour le SCE5 libre. Il serait important de refaire ces expériences en présence de tous les contrôles nécessaires afin de conclure sur la spécificité de fixation des particules greffées avec le SCE5.

Une autre perspective d'étude (plus simple) serait d'utiliser des plaquettes activées afin d'uniformiser les expériences menées à Melbourne avec celles menées à Bordeaux. Le SCE5-LPETG est un scFv spécifique de l' α IIb β 3 activée. Ce récepteur est exprimé au niveau des plaquettes activées. Les plaquettes activées sont retrouvées au niveau des plaques d'athérome dites « hémorragiques ». Ce type de plaque ne semble pas apparaître de façon naturelle sur des modèles de souris ApoE^{-/-} (22). Cependant, un modèle de souris présentant ce type de plaque a été développé au sein de l'équipe du Dr. Hagemeyer (23). Ce modèle repose sur la double ligature partielle de l'artère carotide gauche durant 6 semaines. La perturbation de flux sanguin engendrée par la ligature induit la formation de plaques hémorragiques. Des essais *in vivo* de fixation spécifique des SPC-SCE5 devront être menés sur ce modèle.

C. Protocole d'imagerie :

Au cours de ce projet, un protocole d'imagerie paramétrique par IRM a été développé et validé dans le cadre de la caractérisation de la plaque d'athérome *in vivo* chez la souris ApoE^{-/-}.

La validation des protocoles d'imagerie est un axe de recherche trop souvent négligé mais qui présente un intérêt majeur, particulièrement en imagerie moléculaire, où les notions de répétabilité et de reproductibilité conditionnent fortement l'interprétation des résultats.

Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit d'effectuer des études *in vivo*, où les facteurs de variabilité augmentent et engendrent des incertitudes de mesure potentiellement significatives qui peuvent nuire aux résultats finaux. De façon générale, il paraît crucial de mener des études de validation à plus grande échelle (répétabilité / reproductibilité intra et inter-laboratoire) afin de solutionner, au moins partiellement, le problème actuel de « crise de reproductibilité » qui semble être un frein à l'avancée des connaissances dans tout domaine scientifique (24).

Quelques études récentes en IRM tendent à essayer de résoudre ce problème en publiant de plus en plus des protocoles d'imagerie paramétrique validés (25-28). Cependant, il semble qu'aucun protocole dédié à l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome chez le petit animal n'ait encore été validé à ce jour (au sens de répétabilité et de reproductibilité). De même, la robustesse (autrement appelé « capacité ») des protocoles est un paramètre qui, à notre connaissance, n'est pas encore étudié dans le domaine de l'imagerie moléculaire. C'est pourtant à partir de cette capacité que tout résultat isolé issu d'un protocole de mesure peut être évalué avec un certain degré de confiance. Ce paramètre semble particulièrement utile en recherche fondamentale, où la plupart des tâches consistent à travailler sur des données à visée exploratoire, afin de valider les résultats présentés.

L'étude menée au cours de ce projet est en ce sens innovante et permettra éventuellement d'adresser plus finement le ciblage moléculaire d'USPIOs au niveau de la plaque d'athérome. Le protocole d'imagerie mis au point (procédure d'acquisition + méthodes de post-traitement) repose sur une méthode de mesure quantitative de la valeur basale du T2* de la plaque. Ce protocole a été évalué dans son ensemble, en essayant d'être le plus exhaustif possible en ce qui concerne l'identification des facteurs d'incertitude de mesure. Une part importante du travail d'évaluation a été consacrée à la mesure des incertitudes de répétabilité et de reproductibilité des différents protocoles. Un algorithme de post-traitement des données a été développé pour permettre la mesure finale du T2*. Cet algorithme a permis la comparaison de l'incertitude générée par différentes méthodes de post-traitement. La capacité de chaque

méthode de post-traitement a été évaluée via la démarche 6 sigma en s'appuyant sur le test GageR&R (29, 30). Le protocole final a été déterminé à partir du niveau de robustesse des résultats issus du GageR&R.

La répétabilité et la reproductibilité du protocole sélectionné *in fine* ont respectivement été évaluées à $\pm 3,188\%$ et $\pm 6,788\%$. Le protocole d'imagerie permet d'effectuer des mesures répétables et reproductibles avec un niveau de robustesse maximal de 95,4% (mesures à $\pm 2\sigma$). Au regard du grand nombre de facteur d'influence répertoriés dans le diagramme d'Ishikawa, ces résultats sont satisfaisants et montrent la faisabilité du protocole à évaluer de façon fiable le T2* de la plaque d'athérome sur un modèle de souris ApoE^{-/-}.

Cependant la capacité de ce protocole d'imagerie à quantifier (ou estimer) la concentration de particules éventuellement accumulées au sein de la plaque d'athérome *in vivo* n'a pas encore été étudiée. Un travail supplémentaire reste donc à faire concernant ce point. Dans cette optique, il serait par exemple intéressant d'effectuer des études de sensibilité de détection des particules, comme le rapporte Dahnke et al. dans leur étude de menée en 2005 (31).

Il est nécessaire de rappeler que le protocole d'imagerie proposé dans cette thèse n'a pas vocation à se substituer aux méthodes de validation habituellement décrites dans la littérature, notamment les confirmations d'adressage des USPIOs à la plaque d'athérome par corrélation avec les données histologiques (32-34). Au contraire, ce protocole est à considérer comme étant totalement complémentaire à ces méthodes, et vise à appuyer le degré de validité des résultats présentés.

Dans ce cadre, l'adressage *in vivo* des particules au sein de la plaque devrait toujours être confirmée *ex vivo* par des analyses histologiques après injection des agents de contraste. La concentration des particules accumulées dans la plaque d'athérome peut aussi être confirmée *ex vivo* par des méthodes d'analyse utilisant la spectrométrie de masse (ICP-MS) ou la spectrométrie par résonance électronique paramagnétique (RPE), comme cela a été réalisé dans la publication en annexe 10.

Bien que validé, il est important de souligner certaines limites du protocole qui laissent entrevoir de nouvelles perspectives d'études :

Il a été montré que les conditions [correction de mouvement (seule)] ou [correction de mouvement + correction des valeurs de T2*] influaient de manière significative sur la diminution des incertitudes de mesure. Le problème de mouvement d'image durant les temps

d'écho est le facteur qui induit directement le plus d'incertitude de mesure. Il a cependant été vu que le mouvement des images semblait être atténué par un temps de commutation des gradients prolongé. Le mouvement des images durant les temps d'échos semblerait lié aux paramètres de la séquence MGE utilisée (TE et intervalles inter-TE courts notamment). Les paramètres de séquences fixés imposent au spectromètre-imageur des temps de commutation de gradients très courts qui pourraient éventuellement être délétères pour la captation du signal. Le mouvement des images durant les temps d'échos étant le facteur le plus influent dans l'apparition de l'incertitude de mesure, des développements méthodologiques de séquences pourraient être entrepris dans le but de minimiser cet artefact dès l'étape d'acquisition du signal.

Durant ce protocole d'imagerie, un seuil d'exclusion des voxels a été fixé pour tout $SNR < 5$, ce qui permet de délimiter de façon semi-automatique la paroi vasculaire du sang (noir). Ce seuil d'exclusion peut cependant être considéré comme une des limites du protocole, en particulier après injection d'USPIOs à relaxivité $r2^*$ élevée. L'effet des USPIOs sur la paroi vasculaire peut entraîner une destruction locale du signal et certains voxels peuvent être automatiquement exclus du calcul de $T2^*$ par l'algorithme. Cette perte d'information peut alors potentiellement engendrer un effet de sur-estimation de la valeur réelle du $T2^*$ de la plaque. En considérant cette difficulté d'analyse des résultats, il serait dès-lors intéressant de combiner notre protocole avec les méthodes d'imagerie semi-quantitatives qui prennent en compte l'aire d'extinction du signal (32, 33) afin d'apporter une plus-value à l'interprétation des résultats.

Ceci soulève aussi un point du protocole qui pourrait être amélioré et qui concerne le mode de segmentation. Alors que le nombre de jeux de données à traiter peut vite devenir conséquent et que la segmentation est ici effectuée de manière manuelle (ce qui peut être long et fastidieux), il serait intéressant de tester l'apport d'une segmentation automatisée par un algorithme dédié sur l'amélioration de la précision de mesure (35).

Le protocole d'imagerie a montré sa faisabilité et a été premièrement validé au niveau de l'aorte abdominale. La croissance de la plaque d'athérome au niveau abdominal est cependant assez lente chez la souris $ApoE^{-/-}$ (souris âgées de 8 mois au moment de leur passage dans l'IRM). Une souris âgée de 8 mois est en général moins tolérante à l'anesthésie qu'une souris plus jeune, ce qui est une seconde limite majeure du protocole d'imagerie. La croissance de la plaque d'athérome semble en revanche beaucoup plus rapide au niveau de la crosse aortique des souris $ApoE^{-/-}$ (34). En considérant la correction des hétérogénéités de champ magnétique appliquée durant notre étude, de nouvelles perspectives peuvent être envisagées concernant un redéveloppement du protocole au niveau de cette zone anatomique. D'autres facteurs d'incertitudes seront en revanche à reconsidérer afin de montrer la faisabilité de ce

nouveau protocole. La crosse aortique est par exemple fortement soumise aux mouvements induits par les battements cardiaques et par la respiration : une double synchronisation (respiratoire et cardiaque) serait nécessaire et impliquerait des changements de paramètres de séquences. La crosse aortique est située au niveau des poumons qui induisent de fortes hétérogénéités de champ magnétique : l'effet de la correction du ΔB_0 en post-traitement serait donc ici un paramètre à étudier plus en profondeur.

En somme, bien que perfectible sur certains points, le protocole présenté dans cette thèse reste totalement exploitable et a montré sa faisabilité pour l'imagerie moléculaire de la plaque d'athérome chez le petit animal.

D. Cinétique d'accumulation des USPIOs au sein de la plaque :

Deux études menées en fin de projet ont mis en application le protocole d'imagerie précédemment développé et validé. Ces deux essais se sont concentrés sur des suivis longitudinaux des valeurs de T_2^* de la plaque avant et après injection d'USPIOs.

Des NP-PEG1K-OH non-fonctionnalisées de petite taille (20 nm) ont été injectées dans 3 souris ApoE^{-/-} lors du premier essai. Des nanoflowers (NF) non fonctionnalisées et fonctionnalisées avec du SCE5 ont été injectées sur 2 souris différentes lors d'un deuxième essai.

Au cours du premier essai, il a été observé une diminution des valeurs de T_2^* de la plaque entre 30 minutes et 7 heures post-injection, puis un retour progressif aux valeurs basales entre 24 heures et 48 heures post-injection. En considérant les valeurs d'incertitudes de mesures relatives et les écart-types inter-souris, les résultats présentés ici laissent supposer une accumulation locale d'USPIOs au sein de la plaque entre 30 minutes et 24 heures post-injection. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Briley-Saebo et al. qui ont mis en évidence l'entrée de nanoparticules de diamètre inférieure à 20 nm au niveau du vasa-vasorum chez le lapin 24 heures après l'injection des USPIOs (7). Bien que le vasa-vasorum semble être présent chez le lapin et l'homme (7, 36), aucune publication n'a encore pu mettre en évidence l'existence de ce réseau vasculaire chez la souris à notre connaissance. Les résultats préliminaires présentés ici laissent entrevoir la perspective de pouvoir caractériser la présence de vasa-vasorum chez la souris via un ciblage passif des NP-PEG1K-OH. Ces résultats devront cependant être confirmés prochainement par (a) un nombre de souris plus important, (b) des analyses histologiques (par

imagerie optique ou par RPE) de la plaque d'athérome permettant de mettre en évidence la présence locale d'USPIO.

Concernant le deuxième essai, une seule souris a été testée pour chacune des conditions (NF non fonctionnalisées et NF fonctionnalisées). Il est à ce stade difficile d'émettre des hypothèses fiables à partir des résultats présentés. Cependant, il peut être remarqué l'existence d'un profil cinétique similaire entre 30 minutes et 7 heures post-injection pour les deux conditions. Cette observation nous amène à penser qu'une accumulation transitoire des NF a eu lieu au sein de la plaque durant cette période et nous pourrions éventuellement attribuer la cause de cette accumulation à un effet de ciblage passif des particules. Même si les particules greffées avec le SCE5 sont susceptibles de cibler préférentiellement les thrombi, le modèle de souris utilisé ici n'est pas optimal pour l'apparition de ce genre de lésions au niveau de l'aorte abdominale (zone anatomique observée par IRM). De plus, il est probable qu'un effet transitoire de ciblage passif soit favorisé par une non-uniformité de distribution de taille des NF : les plus petites particules seraient alors à l'origine de la diminution momentanée du T2* de la plaque. Ces deux hypothèses pourraient éventuellement expliquer la similarité des profils de distribution des deux lots de particule entre 30 minutes et 7h post-injection. Il serait primordial de poursuivre cette étude sur un plus grand nombre de souris afin d'émettre des hypothèses plus robustes. Dans ce cadre, il serait nécessaire d'effectuer de futurs essais sur le modèle de souris développé par l'équipe de Christoph Hagemeyer afin d'évaluer le potentiel de ciblage actif des NF fonctionnalisées avec le SCE5 (23).

En définitive, même si des analyses histologiques seraient requises pour confirmer les résultats obtenus, ces deux études représentent un début de preuve de concept concernant la capacité du protocole d'imagerie à caractériser l'accumulation d'USPIOs de la plaque d'athérome.

De futures études permettront d'évaluer plus en profondeur les phénomènes de ciblage passif et actif des particules à partir de ce protocole. Les outils d'imagerie développés au cours de cette thèse laissent entrevoir des perspectives intéressantes pour l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose.

E. REFERENCES :

1. Wáng YXJ, Idée J-M. A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2017;7(1):88-122.
2. Wang Y-X. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Cellular Imaging and Targeted Therapy: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. *The World Scientific Encyclopedia of Nanomedicine and Bioengineering I. Frontiers in Nanobiomedical Research*. Volume 5: WORLD SCIENTIFIC; 2016. p. 29-51.
3. Wang Y-XJ. Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging. *World J Gastroenterol*. 2015;21(47):13400-2.
4. Hugounenq P, Levy M, Alloyeau D, Lartigue L, Dubois E, Cabuil V, et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012;116(29):15702-12.
5. Lartigue L, Hugounenq P, Alloyeau D, Clarke SP, Levy M, Bacri JC, et al. Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents. *ACS nano*. 2012;6(12):10935-49.
6. Lobatto ME, Fuster V, Fayad ZA, Mulder WJM. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(11):835-52.
7. Briley-Saebo KC, Mani V, Hyafil F, Cornily J-C, Fayad ZA. Fractionated feridex and positive contrast: In vivo MR imaging of atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2008;59:721-30.
8. Brisset JC, Desestret V, Marcellino S, Devillard E, Chauveau F, Lagarde F, et al. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T. *Eur Radiol*. 2010;20(2):275-85.
9. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*. 2005;40(11):715-24.
10. Pinho SLC, Pereira GA, Voisin P, Kassem J, Bouchaud V, Etienne L, et al. Fine Tuning of the Relaxometry of γ -Fe₂O₃@SiO₂ Nanoparticles by Tweaking the Silica Coating Thickness. *ACS nano*. 2010;4(9):5339-49.
11. Brown GC, Cowin GJ, Galloway GJ. A USPIO doped gel phantom for R₂* relaxometry. *MAGMA*. 2017;30(1):15-27.
12. Knobloch G, Colgan T, Wiens CN, Wang X, Schubert T, Hernando D, et al. Relaxivity of Ferumoxytol at 1.5 T and 3.0 T. *Invest Radiol*. 2018;53(5):257-63.
13. Kuhlperter R, Dahnke H, Matuszewski L, Persigehl T, von Wallbrunn A, Allkemper T, et al. R₂ and R₂* mapping for sensing cell-bound superparamagnetic nanoparticles: in vitro and murine in vivo testing. *Radiology*. 2007;245(2):449-57.
14. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2012;41(6):2323-43.
15. Adumeau L, Genevois C, Roudier L, Schatz C, Couillaud F, Mornet S. Impact of surface grafting density of PEG macromolecules on dually fluorescent silica nanoparticles used for the in vivo imaging of subcutaneous tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017;1861(6):1587-96.
16. Millon A, Dickson SD, Klink A, Izquierdo-Garcia D, Bini J, Lancelot E, et al. Monitoring plaque inflammation in atherosclerotic rabbits with an iron oxide (P904) and (18)F-FDG using a combined PET/MR scanner. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):339-45.

17. Deramchia K. Interrogation de la plaque d'athérome par phage- -display in vivo une approche pour un ciblage moléculaire à l'aide d'anticorps humains armés pour l'imagerie et la thérapie 2010.
18. Deramchia K, Jacobin-Valat MJ, Vallet A, Bazin H, Santarelli X, Sanchez S, et al. In vivo phage display to identify new human antibody fragments homing to atherosclerotic endothelial and subendothelial tissues [corrected]. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2576-89.
19. Bonnard T, Tennant Z, Niego B, Kanojia R, Alt K, Jagdale S, et al. Novel Thrombolytic Drug Based on Thrombin Cleavable Microplasminogen Coupled to a Single-Chain Antibody Specific for Activated GPIIb/IIIa. *Journal of the American Heart Association.* 2017;6(2).
20. Wang X, Palasubramaniam J, Gkanatsas Y, Hohmann JD, Westein E, Kanojia R, et al. Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. *Circ Res.* 2014;114(7):1083-93.
21. Hanjaya-Putra D, Haller C, Wang X, Dai E, Lim B, Liu L, et al. Platelet-targeted dual pathway antithrombotic inhibits thrombosis with preserved hemostasis. *JCI insight.* 2018;3(15).
22. Gargiulo S, Gramanzini M, Mancini M. Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Animal Models. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1511.
23. Chen Y-C, Bui Anh V, Diesch J, Manasseh R, Hausding C, Rivera J, et al. A Novel Mouse Model of Atherosclerotic Plaque Instability for Drug Testing and Mechanistic/Therapeutic Discoveries Using Gene and MicroRNA Expression Profiling. *Circ Res.* 2013;113(3):252-65.
24. Baker M. IS THERE A REPRODUCIBILITY CRISIS? *Nature.* 2016;533:452-4.
25. Waterton JC, Hines CDG, Hockings PD, Laitinen I, Ziemian S, Campbell S, et al. Repeatability and reproducibility of longitudinal relaxation rate in 12 small-animal MRI systems. *Magn Reson Imaging.* 2019;59:121-9.
26. Bachtiar V, Kelly MD, Wilman HR, Jacobs J, Newbould R, Kelly CJ, et al. Repeatability and reproducibility of multiparametric magnetic resonance imaging of the liver. *PLoS One.* 2019;14(4):e0214921.
27. Meloni A, Positano V, Keilberg P, De Marchi D, Pepe P, Zuccarelli A, et al. Feasibility, Reproducibility and Reliability for the T2* Iron Evaluation At 3T in Comparison with 1.5T. *Blood.* 2011;118(21):5301-.
28. Seif M, Leutritz T, Samson R, Curt A, Wheeler-Kingshott CAM, Freund P, et al. A multi-center study on fast full-brain quantitative multi-parameter mapping of R1, MT, and R2*: scan-rescan repeatability and inter-site reproducibility 2018.
29. Evans JR, Lindsay WM. *The management and control of quality: South-western Cincinnati, OH;* 2002.
30. Li MHC, Al-Refaie A. Improving wooden parts' quality by adopting DMAIC procedure. *Quality and Reliability Engineering International.* 2008;24(3):351-60.
31. Dahnke H, Schaeffter T. Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T2 relaxometry. *Magn Reson Med.* 2005;53(5):1202-6.
32. Burtea C, Ballet S, Laurent S, Rousseaux O, Dencausse A, Gonzalez W, et al. Development of a Magnetic Resonance Imaging Protocol for the Characterization of Atherosclerotic Plaque by Using Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Apoptosis-Targeted Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Derivatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(6):e36.

33. Sigovan M, Boussel L, Sulaiman A, Sappey-Marini D, Alsaïd H, Desbleds-Mansard C, et al. Rapid-clearance iron nanoparticles for inflammation imaging of atherosclerotic plaque: initial experience in animal model. *Radiology*. 2009;252(2):401-9.
34. Sigovan M, Bessaad A, Alsaïd H, Lancelot E, Corot C, Neyran B, et al. Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE^{-/-} mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2010;45(11):702-7.
35. Mansard CD, Canet Soulas EP, Anwander A, Chaabane L, Neyran B, Serfaty JM, et al. Quantification of multicontrast vascular MR images with NLSnake, an active contour model: in vitro validation and in vivo evaluation. *Magn Reson Med*. 2004;51(2):370-9.
36. Wang J, Chen H, Sun J, Hippe DS, Zhang H, Yu S, et al. Dynamic contrast-enhanced MR imaging of carotid vasa vasorum in relation to coronary and cerebrovascular events. *Atherosclerosis*. 2017;263(Supplement C):420-6.

ANNEXES

Annexe n°1 : Procédure d'acquisition (1/2)

Compte tenu de l'existence d'un nombre élevé d'étapes engendrant une variabilité de manipulation intra et inter-opérateur, chaque étape sera détaillée de la façon la plus exhaustive possible dans cette partie.

Chaque point relevé dans cette procédure est à considérer comme étant une source d'incertitude de mesure et doit être maîtrisé au mieux par l'opérateur.

Pour plus de clarté, cette procédure sera divisée en deux sous-parties.

Les paramètres des séquences RMN utilisées sont détaillés dans la Table 3.

I- Anesthésie et positionnement de la souris dans l'aimant :

- 1 - Anesthésie de la souris (induction à l'isoflurane 4 %, puis entretien à 1,5%)
- 2 - Positionnement de la souris sur le lit chauffé (en position étendue sur le ventre)
- 3 - Positionnement et fixation avec du ruban adhésif de la sonde de respiration au niveau dorsal-thoracique de la souris
- 4 - Positionnement de l'ensemble (lit + souris + sonde de respiration) sur le banc du scanner
- 5 - Positionnement et fixation avec du ruban adhésif de la sonde de température rectale
- 6 - Centrage de l'antenne réceptrice « tête de rat » au niveau du centre de l'aorte abdominale (situé à environ 1 cm à partir de la limite inférieure des poumons)
- 7 - Fixation (avec du ruban adhésif) de l'antenne de réception
- 8 - Centrage du banc :
 - a) Ajustement vertical de la position de l'antenne : le niveau est effectué à l'aide d'une règle et de repères visuels de part et d'autre de la cavité de l'aimant
 - b) Ajustement horizontal de la position de l'antenne (à l'aide d'un laser)
 - c) Ajustement de la profondeur d'insertion (à l'aide de l'échelle millimétrée du banc)
- 9 - Centrage de la souris dans la cavité de l'aimant
- 10 - Immobilisation de l'antenne d'émission (à l'aide d'un ballonnet)
- 11 - Séquence Flash (Localizer) :
 - Visualisation rapide du positionnement de la souris (aorte abdominale) dans l'aimant :
=> Obtention de 3 images :
 - a) 1 coupe axiale
 - b) 1 coupe sagittale
 - c) 1 coupe coronale
 - Si besoin, ajustement de la position de la souris de façon à **placer au mieux l'aorte abdominale au centre de l'aimant**
- 12 - Contrôle de l'anesthésie permanent et ajustement (**durant toute la procédure d'acquisition**)
=> Stabilisation de la fréquence respiratoire entre 45 et 50 respirations par minute.

Annexe n°1 : Procédure d'acquisition (2/2)

II- Positionnement des coupes et acquisition des données :

13 - Localisation plus précise de l'aorte abdominale à l'aide de 3 séquences Flash multi-coupes, dans les trois plans de l'espace (Coronal, Axial et Sagittal) :

=> Obtention de 3 jeux d'images :

- a) Séquence Flash Coronale (8 coupes)
- b) Séquence Flash Axiale (20 coupes)
- c) Séquence Flash Sagittale (8 coupes)

14 - Ajustement manuel de la position finale des coupes à partir des 3 séquences précédentes :

- a) Orienter les coupes perpendiculairement à l'aorte abdominale (sur les 3 jeux d'images)
- b) La première coupe axiale doit être située à la base des poumons. Les coupes suivantes sont dans le prolongement de la première, en direction des reins.

15 - Cartographie du champ magnétique B0 (B0 Map - synchronisation respiratoire activée) :

a) Définir un volume de shim qui couvre la région à imager (le volume paramétré par défaut couvre des dimensions de 50 x 50 x 1 mm³). **Positionner ce volume au niveau de l'aorte.**

b) Mesure du B0 Map => la respiration/anesthésie de la souris doit être stable.

16 - Séquence Multi-Échos de Gradient (MGE) multi-coupes :

- a) Calcul des coefficients de shim actif (troisième ordre) à partir du B0 Map
- b) Optimisation de l'homogénéité de champ au sein du volume de shim calculé
- c) Acquisition des données => la respiration/anesthésie de la souris doit être stable.

17 - Fin d'acquisition (**jeu d'images A**) : Sortir le banc de l'aimant

18 - Injection d'USPIO (injection sur le banc de l'IRM, ne pas déplacer l'antenne !)

19 - Réinsertion de la souris dans la cavité de l'aimant

20 - Acquisition des données => la respiration/anesthésie de la souris doit être stable.

21 - Fin d'acquisition (**jeu d'images B**) :

- OPTION 1 : Continuer les acquisitions (sans modifier le positionnement de la souris)
=> Répéter les étapes 19 et 20
- OPTION 2 : Sortir la souris de l'aimant
=> Passer à l'étape 22

22 - Coupure de l'anesthésie

23 - Contrôle qualité (une procédure interne au laboratoire existe)

24 - Établir la correspondance des coupes en comparant le jeu d'images A au jeu d'images B.

Annexe n°2 : Diagramme de la séquence multi-échos de gradient (1/2)

La Figure n° est un résumé des différentes étapes de la séquence utilisée. Un code couleur est utilisé pour le détail de chaque étape.

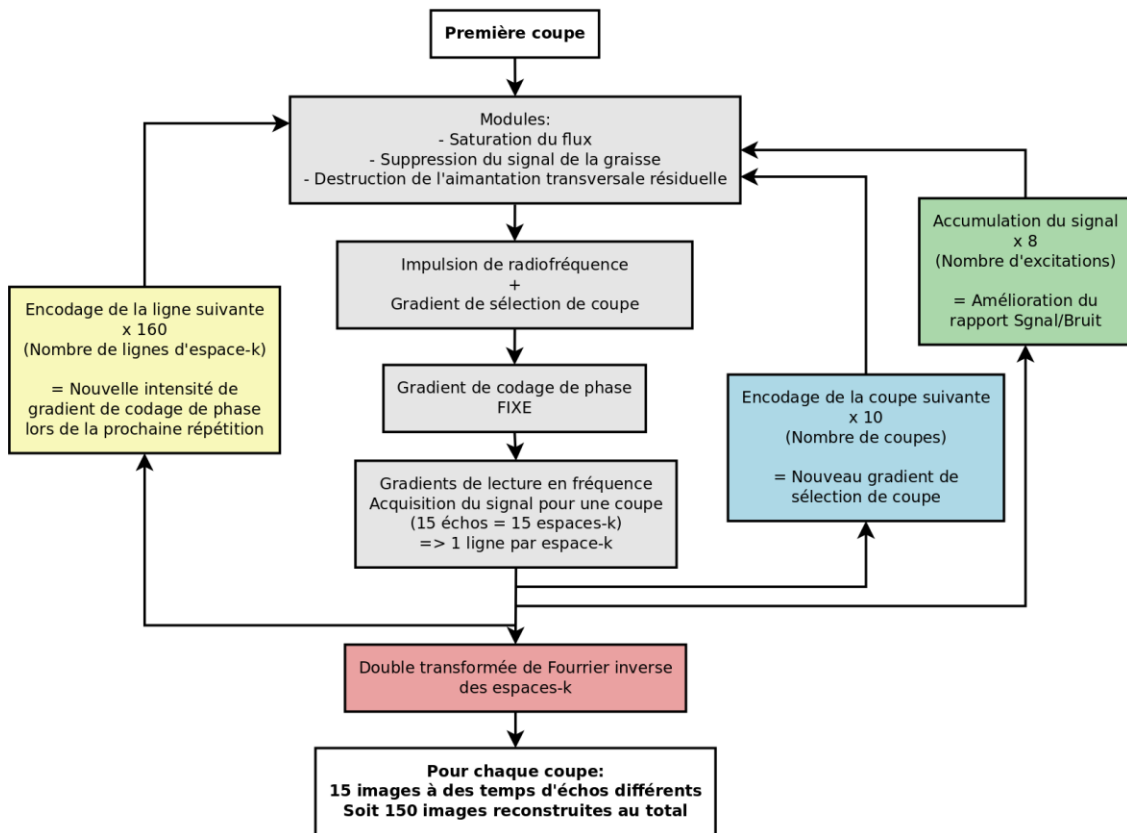


Diagramme de flux de la séquence multi-échos de gradient

Étape 1 : Cycle d'acquisition pour une coupe

Un cycle commence par trois modules visant à s'affranchir au mieux d'artefacts d'images :

- saturation du flux
- suppression du signal de la graisse
- destruction de l'aimantation transversale résiduelle

Ces modules seront détaillés dans la partie modules activés.

Une impulsion radiofréquence et un gradient de sélection de coupe sont ensuite appliqués en même temps, ce qui permet une excitation sélective pour une coupe.

Un gradient de phase va ensuite permettre de coder, de façon identique sur un cycle, la position de la ligne à remplir dans les différents espaces-k à acquérir juste après cette étape.

L'inversion successive de la polarité des gradients de lectures permet finalement d'acquérir le signal RMN selon différents échos qui seront encodés en fréquence dans leur espace-k respectifs.

Chaque cycle permet l'acquisition de 15 échos par coupe, il y a donc 15 espaces-k différents à remplir.

En résumé chaque cycle permet, grâce à une même intensité de gradient de phase donnée, le remplissage d'une ligne sur chacun des espaces-k codants pour les différents temps d'écho d'une coupe.

La figure n° est une portion de chronogramme représentant un cycle d'acquisition de données pour une coupe.

Annexe n°2 : Diagramme de la séquence multi-échos de gradient (2/2)

Étape 2 : Encodage de la coupe suivante

Lorsque l'étape 1 se termine, l'acquisition des 15 échos de la coupe suivante commence en suivant la même procédure.

La séquence code pour 10 coupes différentes, l'étape 1 est donc répétée 10 fois.

Lors du passage d'une coupe à la suivante, seule l'intensité du gradient de sélection de coupe varie.

L'intensité du gradient de codage de phase reste ici identique quelque-soit la coupe excitée : la position de la ligne des espaces-k à remplir est la même pour les échos de toutes les coupes.

Étape 3 : Accumulation de signal

Les étapes 1 et 2 sont répétées 8 fois (NEX = 8). Ceci permet d'améliorer le rapport signal-sur-bruit du signal final encodé dans les espaces-k.

Étape 4 : Encodage de la ligne suivante

Lorsque l'encodage du dernier écho de la dernière coupe se termine, les étapes 1 à 3 se répètent mais avec une nouvelle intensité de gradient de phase.

Ce pas de phase (nouvel encodage de phase) permet de remplir une nouvelle ligne d'espace-k avec le signal provenant des échos de chaque coupe excitée.

Toutes ces étapes sont répétées autant de fois qu'il y a de lignes dans l'image finale (ici 160 lignes donc 160 répétitions avec des encodages de phase différents).

Étape 5 : Formation de l'image

La double transformée de Fourier inverse de ces espaces-k permettra enfin la reconstruction complète des images.

150 images au total (10 coupes x 15 échos) devront donc être reconstruites durant l'étape de post-traitement.

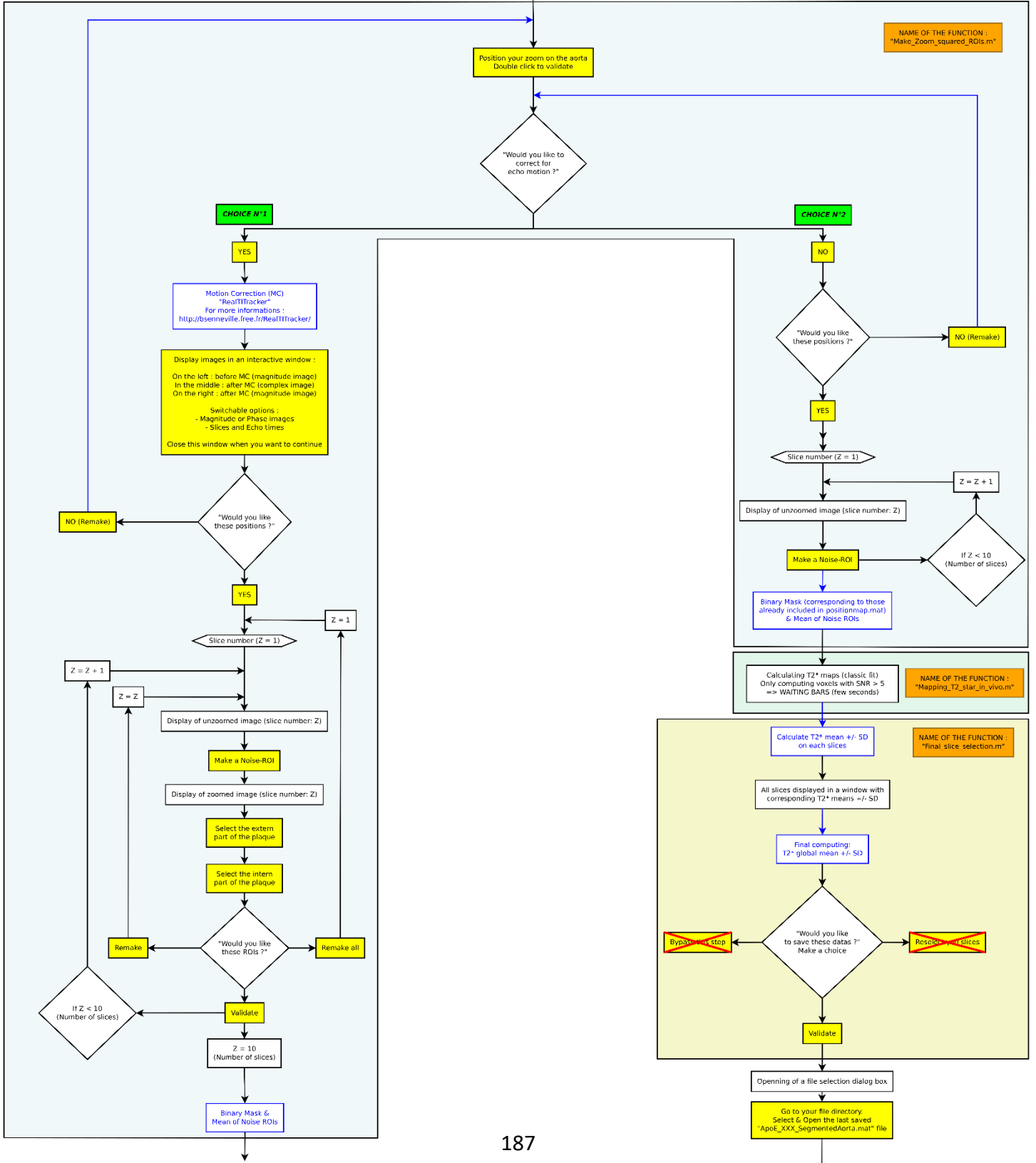
Annexe n°3 : Diagramme de flux de l'algorithme de post-traitement (1/3)

Colors signification :

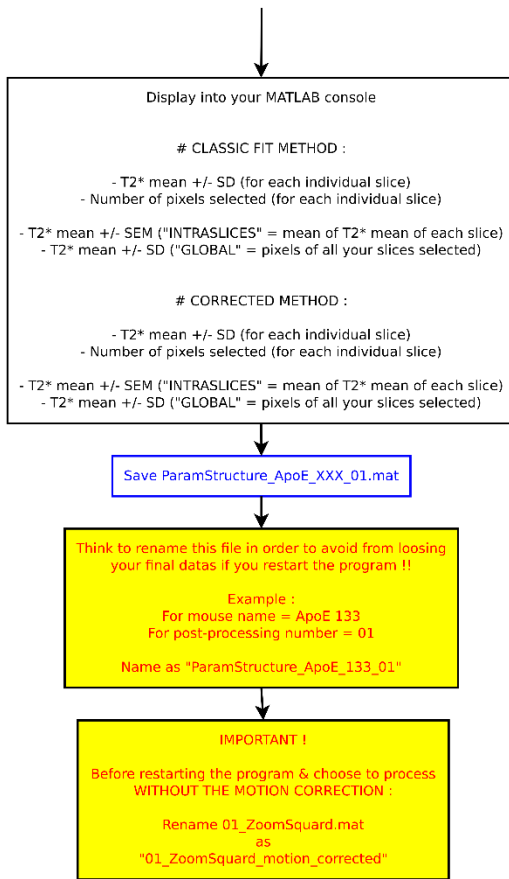
- Backside of the program (not visible)
- User interface
- User action
- User action (WARNING)
- Main steps of the program

Symbols signification :

- Decision
- Process
- Preparation



Annexe n°3 : Diagramme de flux de l'algorithme de post-traitement (3/3)



Annexe n°4 : Domaine expérimental, matrice d'expériences et plan d'expérimentation issus du logiciel AZURAD®

Domaine expérimental

	Nombre de niveaux	Nom / Valeur	Nom abrégé	Unité	Type
Facteur 1	2	Motion Correction	MC		Qualitatif
Niveau 0		No			
Niveau 1		Yes			
Facteur 2	2	T2* correction	T2* cor		Qualitatif
Niveau 0		No			
Niveau 1		Yes			
Facteur 3	2	Outlier removing	Outlier		Qualitatif
Niveau 0		No			
Niveau 1		Yes			

Matrice d'expériences et réponses

Expérience	X1	X2	X3	Sigma median (mouse in/out)	Sigma mean (mouse in/out)	Sigma median (mouse in/in)	Sigma mean (mouse in/in)
1	-1	-1	-1	9.2181	8.08308	8.0351	6.61654
2	1	-1	-1	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
3	-1	1	-1	10.0367	9.45088	7.26223	6.18364
4	1	1	-1	7.1355	6.94087	2.71022	3.23387
5	-1	-1	1	9.25207	8.16843	8.06959	6.73957
6	1	-1	1	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
7	-1	1	1	10.1524	8.66263	7.38746	6.01805
8	1	1	1	7.12286	6.78783	2.71564	3.18758

Plan d'expérimentation et réponses

Expérience	Motion Correction	T2* correction	Outlier removing	Sigma median (mouse in/out)	Sigma mean (mouse in/out)	Sigma median (mouse in/in)	Sigma mean (mouse in/in)
1	No	No	No	9.2181	8.08308	8.0351	6.61654
2	Yes	No	No	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
3	No	Yes	No	10.0367	9.45088	7.26223	6.18364
4	Yes	Yes	No	7.1355	6.94087	2.71022	3.23387
5	No	No	Yes	9.25207	8.16843	8.06959	6.73957
6	Yes	No	Yes	8.38722	7.8697	3.06392	2.81392
7	No	Yes	Yes	10.1524	8.66263	7.38746	6.01805
8	Yes	Yes	Yes	7.12286	6.78783	2.71564	3.18758

Annexe n°5 : Résumés statistiques du plan d'expérience mené pour la condition de mesure
« reproductibilité des résultats exprimés en valeurs médiane »

Estimations et statistiques des coefficients - Sigma median (mouse in/out)

	Valeur
Ecart-type de la réponse	0.2356905
R²	1.000
R²A	N.A
Nombre DDL	7

Coefficients - Sigma median (mouse in/out)

	Coefficients	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp	p value %	
b0	8.711516		0.083329	104.543419		
b1	-0.953317	1.000000	0.083329	-11.440380	< 0.100000	***
b2	-0.099633	1.000000	0.083329	-1.195662	27.075651	
b3	0.017130	1.000000	0.083329	0.205568	84.297867	
b1-2	-0.529385	1.000000	0.083329	-6.352941	< 0.100000	***
b1-3	-0.020290	1.000000	0.083329	-0.243493	81.460527	
b2-3	0.008638	1.000000	0.083329	0.103659	92.034711	
b1-2-3	-0.011798	1.000000	0.083329	-0.141584	89.139711	

Analyse de la variance - Sigma median (mouse in/out)

	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	p value %	
Régression	9.5992681	7	1.3713240	24.6863008	0.0200823	***
Résidus	0.3888500	7	0.0555500			
Total	9.9881181	14				

Résidus - Sigma median (mouse in/out)

	Yexp.	Ycalc.	Différence	Normée	dU
Expérience 1	9.2180975	9.2180975	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 2	8.3872174	8.3872174	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 3	10.0367293	10.0367293	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 4	7.1355003	7.1355003	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 5	9.2520654	9.2520654	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 6	8.3872174	8.3872174	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 7	10.1524410	10.1524410	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 8	7.1228594	7.1228594	0.0000000	0.0000000	1.0000000

Annexe n°6 : Résumés statistiques du plan d'expérience mené pour la condition de mesure
« reproductibilité des résultats exprimés en valeurs moyenne »

Estimations et statistiques des coefficients - Sigma mean (mouse in/out)

	Valeur
Ecart-type de la réponse	0.2356905
R²	1.000
R²A	nan
Nombre DDL	7

Coefficients - Sigma mean (mouse in/out)

	Coefficients	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp	p value %	
b0	7.979141		0.083329	95.754477		
b1	-0.612117	1.000000	0.083329	-7.345767	< 0.100000	***
b2	-0.018587	1.000000	0.083329	-0.223057	82.986044	
b3	-0.106992	1.000000	0.083329	-1.283968	24.001520	
b1-2	-0.484086	1.000000	0.083329	-5.809321	< 0.100000	***
b1-3	0.068732	1.000000	0.083329	0.824830	43.666975	
b2-3	-0.128330	1.000000	0.083329	-1.540032	16.744846	
b1-2-3	0.090070	1.000000	0.083329	1.080894	31.557056	

Analyse de la variance - Sigma mean (mouse in/out)

	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	p value %	
Régression	5.2009915	7	0.7429988	13.3753158	0.1439452	**
Résidus	0.3888500	7	0.0555500			
Total	5.5898415	14				

Résidus - Sigma mean (mouse in/out)

	Yexp.	Ycalc.	Différence	Normée	dU
Expérience 1	8.0830835	8.0830835	-0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 2	7.8696971	7.8696971	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 3	9.4508801	9.4508801	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 4	6.9408703	6.9408703	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 5	8.1684340	8.1684340	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 6	7.8696971	7.8696971	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 7	8.6626322	8.6626322	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 8	6.7878319	6.7878319	-0.0000000	0.0000000	1.0000000

Annexe n°7 : Résumés statistiques du plan d'expérience mené pour la condition de mesure
« répétabilité des résultats exprimés en valeurs médiane »

Estimations et statistiques des coefficients - Sigma median (mouse in/in)

	Valeur
Ecart-type de la réponse	0.2356905
R²	1.000
R²A	nan
Nombre DDL	7

Coefficients - Sigma median (mouse in/in)

	Coefficients	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp	p value %	
b0	5.288511		0.083329	63.465300		
b1	-2.400085	1.000000	0.083329	-28.802459	< 0.100000	***
b2	-0.269623	1.000000	0.083329	-3.235637	1.433938	*
b3	0.020644	1.000000	0.083329	0.247739	81.144634	
b1-2	0.094126	1.000000	0.083329	1.129565	29.587579	
b1-3	-0.019287	1.000000	0.083329	-0.231461	82.357702	
b2-3	0.012020	1.000000	0.083329	0.144246	88.937105	
b1-2-3	-0.010664	1.000000	0.083329	-0.127968	90.177278	

Analyse de la variance - Sigma median (mouse in/in)

	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	p value %	
Régression	46.7441618	7	6.6777374	120.2112943	0.0000935	***
Résidus	0.3888500	7	0.0555500			
Total	47.1330118	14				

Résidus - Sigma median (mouse in/in)

	Yexp.	Ycalc.	Différence	Normée	dU
Expérience 1	8.0350962	8.0350962	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 2	3.0639229	3.0639229	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 3	7.2622321	7.2622321	-0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 4	2.7102156	2.7102156	-0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 5	8.0695920	8.0695920	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 6	3.0639229	3.0639229	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 7	7.3874616	7.3874616	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 8	2.7156413	2.7156413	0.0000000	0.0000000	1.0000000

Annexe n°8 : Résumés statistiques du plan d'expérience mené pour la condition de mesure
« **répétabilité des résultats exprimés en valeurs moyenne** »

Estimations et statistiques des coefficients - Sigma mean (mouse in/in)

	Valeur
Ecart-type de la réponse	0.2356905
R²	1.000
R²A	N.A
Nombre DDL	7

Coefficients - Sigma mean (mouse in/in)

	Coefficients	F. Inflation	Ecart-Type	t.exp	p value %	
b0	4.700887		0.083329	56.413463		
b1	-1.688562	1.000000	0.083329	-20.263759	< 0.100000	***
b2	-0.045103	1.000000	0.083329	-0.541261	60.511694	
b3	-0.011106	1.000000	0.083329	-0.133274	89.772703	
b1-2	0.243503	1.000000	0.083329	2.922186	2.227060	*
b1-3	-0.000469	1.000000	0.083329	-0.005628	99.566623	
b2-3	-0.041865	1.000000	0.083329	-0.502410	63.079552	
b1-2-3	0.030291	1.000000	0.083329	0.363507	72.695593	

Analyse de la variance - Sigma mean (mouse in/in)

	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	p value %	
Régression	23.3229118	7	3.3318445	59.9791996	0.0010187	***
Résidus	0.3888500	7	0.0555500			
Total	23.7117618	14				

Résidus - Sigma mean (mouse in/in)

	Yexp.	Ycalc.	Différence	Normée	dU
Expérience 1	6.6165356	6.6165356	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 2	2.8139243	2.8139243	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 3	6.1836356	6.1836356	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 4	3.2338744	3.2338744	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 5	6.7395747	6.7395747	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 6	2.8139243	2.8139243	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 7	6.0180500	6.0180500	0.0000000	0.0000000	1.0000000
Expérience 8	3.1875759	3.1875759	0.0000000	0.0000000	1.0000000

Annexe n°9 :

Les travaux de Mélusine Larivière ont fait l'objet d'un article accepté qui est présenté ci-dessous. J'ai été impliqué dans ce travail à plusieurs niveaux durant ma thèse. J'ai par exemple participé à fournir des résultats in vivo sur des souris témoins (BL6/J) (acquisition des données par IRM + traitement des images). J'ai aussi participé aux extractions d'aortes ainsi qu'aux acquisitions et analyses des données ex vivo à 7 T sur des aortes de souris témoins. Ces données sont disponibles dans les Supplementary datas.

Multimodal molecular imaging of atherosclerosis: Nanoparticles functionalized with scFv fragments of an anti- α IIb β 3 antibody

Mélusine Larivière^{‡a}, Cyril Samuel Lorenzato^{‡a}, Laurent Adumeau^b, **Samuel Bonnet^a**, Audrey Hémadou^a, Marie-Josée Jacobin-Valat^a, Abdelmajid Noubhani^c, Xavier Santarelli^c, Laetitia Minder^{d,e}, Carmelo Di Primo^{d,f}, Stéphane Sanchez^a, Stéphane Mornet^b, Jeanny Laroche-Traineau^{a§}, Gisèle Clofent-Sanchez^{a§}.*

^a Centre de Résonance Magnétiques des Systèmes Biologiques, CNRS UMR5536, F-33076 Bordeaux,

^b CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ICMCB, UMR 5026, F-33600 Pessac,

^c Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac,

^d Université de Bordeaux, CNRS UMS 3033, INSERM US 001, Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, F-33600 Pessac,

^e Institut Bergonié, SIRIC BRIO, 229 Cours de l'Argonne, F-33076 Bordeaux,

^f Université de Bordeaux, Laboratoire ARNA, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux

[‡] These authors contributed equally, ML and CSL are first coauthors

[§] These authors contributed equally, JLT and GCS are senior coauthors,

* corresponding author.

Word count:

Abstract = 148; Complete manuscript word count = 4981 words; Number of references = 37, Number of figures = 5; Number of tables = 1.

Authors contributions:

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Author information

Corresponding author

Cyril Samuel Lorenzato, PhD

Institution: Centre de Résonance Magnétiques des Systèmes Biologiques (CRMSB), CNRS
UMR5536

Mail address: 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Tel: +33547304267

Fax: +33557574556

E-mail address: cyril.lorenzato@u-bordeaux.fr.

Authors emails:

melusinelariviere@gmail.com; cyril.lorenzato@gmail.com; laurent.adumeau@cbni.ucd.ie;
samuel.bonnet@rmsb.u-bordeaux.fr; audrey.hemadou@orange.fr; marie-josee.jacobin@rmsb.u-bordeaux2.fr;
noubhani@bordeaux-inp.fr; xavier.santarelli@bordeaux-inp.fr; l.minder@iecb.u-bordeaux.fr;
carmelo.diprimo@inserm.fr; stephane.sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr; stephane.mornet@icmcb.cnrs.fr;
jeanny.laroche@rmsb.u-bordeaux.fr; gisele.clofent-sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr.

Sources of funding

This study was achieved within the context of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-0057 and also supported by two public grants from the French “Agence Nationale de la Recherche” within the context of the Investments for the Future Program, the PCV program, named IMATHABIO and the SVSE5 program, named ATHERANOS, referenced ANR-13-BSV5-0018 SVSE5.

Abstract

Due to the wealth of actors involved in the development of atherosclerosis, molecular imaging based on the targeting of specific markers would substantiate the diagnosis of life-threatening atheroma plaques. To this end, TEG4 antibody is a promising candidate targeting the activated platelets (integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) highly represented within the plaque. In this study, scFv antibody fragments were used to functionalize multimodal imaging nanoparticles. This grafting was performed in a regio-selective way to preserve TEG4 activity and the avidity of the nanoparticles was studied with respect to the number of grafted antibodies. Subsequently, taking advantage of the nanoparticle bimodality, both near infrared fluorescence and magnetic resonance imaging of the atheroma plaque were performed in the ApoE^{-/-} mouse model. Here we describe the design of the targeted nanoparticles, and a quantification method for their detection in mice, both *ex vivo* and *in vivo*, highlighting their value as a potential diagnosis agent.

Keywords

Atherosclerosis, bimodal imaging, scFv antibody fragments, directed conjugation, SPIO, near infrared fluorescence (NIRF).

Background

Atherosclerosis is one of the most important health conditions worldwide, from which originate the majority of acute cardio-vascular events. Official statistics state that 17.5 million people die each year from cardio-vascular diseases (CVD), 80% of all CVD deaths being due to heart attacks and strokes.[1]

Atherosclerosis gradually develops for fifty or more years throughout the life of an individual under the influence of multiple -lifestyle, environmental, and genetic- factors. It leads to chronic ischemic complications or acute lethal events like myocardial infarction or stroke.

The pathogenesis of atherosclerosis depends on 1/ an increased level of circulating atherogenic lipoproteins,[2] and 2/ local immuno-inflammatory factors.[3,4]

Primary intimal lesions develop under the influence of local hemodynamic stress, usually at the branching points of major arteries. There, low-density lipoproteins (LDL) accumulate on the endothelial surface, forming structures called fatty streaks, which in turn trigger the recruitment, activation, and differentiation of monocytes into macrophages.[5,6] Reactive oxygen species resulting from the inflammatory environment react with LDL to form oxidized LDL (oxLDL): when oxidized, ApoB binds scavenger receptors of macrophages, thus leading to the formation of LDL-laden macrophages called foam cells.[7] Activated endothelial cells and platelets express adhesion molecules such as P-selectin and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1) mediating the interaction with leukocytes and their subendothelial accumulation. Platelets bear glycoproteins GPIb α responsible for their adhesion to the vessel wall, GP α IIb β 3 responsible for their aggregation and thrombus formation and GPIV (CD36) which binds oxLDL,[8,9] contributing to the development of the plaque.[10] In a recent study, we underlined the presence of platelets not only in thrombi and intraplaque hemorrhage, as expected, but also in atheroma burden, around necrotic areas and neovessels, shedding light on the rationale for targeting platelets within atherosclerotic lesions.[11]

Indeed, atheroma burden assessment in the clinics nowadays relies on a combination of clinical signs, biological factors, and imaging. The methods currently used to locate the lesions are mostly invasive intravascular imaging. On the other hand, non-invasive imaging only detects local stenosis. Current development efforts are thus directed towards molecular imaging, able to assess not only the anatomical structure of the plaque, but also its activity: inflammation state, fibrosis, calcification, *etc.*[12]

Taking advantage of the rich plaque composition, previous works have studied the feasibility of addressing various kinds of nanocarriers to the plaque, in order to deliver either therapeutic factors or imaging contrast agents. Mostly, this targeting was achieved either passively, using the outermost layer of coating of the injected objects,[13,14] or with surface-conjugated peptides.[15,16]

In this regard, TEG4, a monoclonal human antibody targeting integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, selected by phage display technology,[17] has previously been used as a full IgG targeting agent for molecular imaging. We first demonstrated that TEG4 targets platelets in atheroma lesions both *in vitro* and *ex vivo*. We also showed that iron oxide-based nanoparticles (VUSPIO for Versatile UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide[18]) functionalized with TEG4 were still able to bind platelets both *in vitro* and *ex vivo*, and could be detected by transmission electron microscopy and magnetic resonance imaging (MRI).[11]

In this study, we investigated the effect of multivalent, site-specific grafting of single chain variable fragment (scFv) antibody fragments of the platelet-reactive TEG4 antibody on the reactivity of functionalized VUSPIO nanoparticles. Compared to full IgGs (150 kDa), scFv fragments (35 kDa) present a reduced size, which makes them more suitable for functionalizing relatively small nanoparticles (90 nm), and allows increasing the particle valence, *via* the conjugation of several fragments. In this regard, to better control the antibody-to-probe conjugation ratio and the fragment orientation, this scFv was engineered to present 2 terminal cysteines that allowed for site-directed grafting to maleimide residues on the surface of the nanoparticle[19]. Indeed, usual conjugation strategies involve the reaction of amine side chains of the antibodies, which may be a good strategy for full IgG but presents the risk to degrade the binding sites of smaller antibody fragments and impede their reactivity. Avidity and reactivity of the functionalized nano-object were assessed *in vitro* by surface plasmon resonance (SPR) on purified integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and immunohistochemistry (IHC) on fixed atheromatous tissue, and confirmed the expected benefit of multifunctionalization.

In addition, fluorochromes were attached to the surface of the VUSPIO to allow for a multimodal near-infrared fluorescence (NIRF) – MRI detection. The potential for bimodal imaging of the lesions by NIRF and MRI measurements was thus explored by *ex vivo* injections in aortas of ApoE^{-/-} model mice, which were highly promising, showing potential for the object as a biocompatible, atheroma-specific diagnosis agent. Upon *in vivo* injection in the same model, efficient targeting with functionalized nanoparticle could be demonstrated 20 min after injection, and up to 24 hours.

Nowadays, atherosclerosis imaging remains a challenge, although several teams have described methods for MRI detection of atheroma with passive[20–22] or targeted[23–25] contrast agents. In addition to these studies, which allowed for preclinical advances in MR-based atherosclerosis imaging, we here propose a robust way to overcome the limitations exhibited by classical image-based interpretation, and to assess the presence of the lesions in a statistically significant and reproducible manner. Our results were analyzed thanks to a custom-made *in silico* method, allowing for a semi-quantitative evaluation of the binding.

Methods

Animal models

Animal studies were approved under the N° 50120192-A by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux, France. Adult male New Zealand rabbits (NZW) were obtained from Charles Rivers Laboratories, fed a fat atherogenic diet including 0.3% cholesterol for 8 months and subjected to surgeries to trigger the formation of complex plaques with intramural thrombi. Briefly, rabbits were subjected to two surgeries: (1) the mechanical removal of endothelial cells of the thoracic and abdominal aortic areas carried out by pulling back a Fogarty probe 4F along the endothelium. Then, two months later, (2) an angioplasty under radioscopic control with the aid of a balloon (20 mm long and 4.5 mm in diameter) inflated every 2 cm from the region of renal arteries to iliac bifurcation. Healthy rabbits from the same strain and provider were used as control.

ApoE^{-/-} mice were obtained from Charles River Laboratories and fed a high-cholesterol diet (0.15% cholesterol, Avogadro Western diet, Safe, Augy, France) for 21 weeks to allow for the development of atherosclerotic lesions. The atheroma plaque development in individual mice was followed-up by MRI (see *infra*). Wild-type control C57BL6 mice were used as a negative control (Charles River Laboratories, St Germain sur l'Arbresle, France).

Site specific multivalent grafting onto VUSPIO nanoparticles

VUSPIO nanoparticles synthesis was performed as described by Mornet *et al.* [2,3] After near-infrared-emitting dye (DyLight™ 800 Maleimide, Thermo Scientific, Illkirch, France) labeling, the primary amine terminal groups were converted into maleimide functions to allow for scFv grafting. A heterobifunctional NHS-PEG-maleimide spacer arm was first grafted on the surface amines of the VUSPIO nanoparticle and then reacted with the “activated” scFv. A fixed quantity of VUSPIO particles was mixed with increasing quantities of scFv so as to obtain theoretical scFv-to-VUSPIO molar ratios of 4 (R4, N = 4), 8 (R8, N = 3), 16 (R16, N = 6) and 32 (R32, N = 6). Commercially available irrelevant IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) were conjugated as described in Jacobin-Valat *et al.* [3] to produce a control VUSPIO-IgG. A detailed protocol is available in Supporting Information.

Avidity measurement

Surface plasmon resonance (SPR) experiments on purified α IIb β 3 integrin (Enzyme Research Laboratories, Swansea, UK) were carried out with a Biacore T200 instrument using CM5 sensor chips (GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, France) and HBS-Ca running buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.005% v/v Surfactant P20). Calcium ions were added to allow the good folding of the α IIb β 3 integrin complex.

Purified α IIb β 3 was immobilized by amine coupling following the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Aulnais-s-bois, France). After 2200 resonance units (RU) of ligand were immobilized, the scFv and VUSPIO-scFv samples were injected over the immobilized target at a flow rate of 20 μ L/min for 2 min. VUSPIO-scFv particles, differing in the number of ligands per nanoparticle (R8, R16, R32), were injected sequentially from the highest to the lowest dilution factor. The scFv alone was injected at 100 μ g/mL as a control for its affinity to α IIb β 3.

Reactivity assessment

The reactivity of TEG4-2c scFv alone, and after grafting to the VUSPIO was confirmed by IHC on paraffin-embedded sections of arterial tissue from atherosclerotic and healthy rabbits, ApoE^{-/-} mice and human patients (see Supporting Information).

After the sections were deparaffinized, rehydrated, and heat mediated antigen retrieval was performed, VUSPIO 0 or VUSPIO-TEG4 corresponding to R8, R16 and R32 ratios were applied to the slides, diluted to the same iron concentration so as to compare the avidity of the VUSPIO in each batch. TEG4-2c scFv alone was applied to the slides in concentrations matching the calculated scFv content in each VUSPIO dilution to compare their reactivity. Following overnight incubation, a secondary HRP-conjugated antibody specific to 6His (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France; working dilutions 1:250) was applied to the sections. Finally, after staining was performed by adding the peroxidase substrate diaminobenzidine (DAB substrate kit, Eurobio/ABCys, Les Ulis, France), slides were counterstained in hematoxylin, dehydrated and mounted. Quantification was made using the IHC Profiler Open Source Plugin (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096801>).

Ex vivo imaging procedure

ApoE^{-/-} mice fed a high fat diet or control C57BL/6 wild-type mice were terminally anaesthetized by inhalation of isoflurane (Belamont, Nicholas Piramal Limited, London, UK). The aorta was exposed and immediately washed by intra-cardiac injection of PBS heparin (3 mL, 50 UI/mL; Sanofi Aventis, Vitry-sur-Seine, France), followed by PBS alone (10 mL). Then a solution of either multivalent VUSPIO-TEG4, VUSPIO-IgG or PBS was injected through the left ventricle and incubated for 20 min before rinsing with PBS. The heart and aorta were then removed and fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% v/v (Eurobio, Les Ulis, France) for subsequent imaging.

Fluorescence images were acquired using the Fluobeam 800 imaging device (Fluoptics, Grenoble, France), using 200 and 1000 ms exposure times.

After embedding in agarose gel (0.8% w/v) in a tube, high resolution MR imaging was performed on a horizontal 7T Biospec system (Bruker, Ettlingen, Germany). A 72-mm birdcage resonator was used for RF transmission and the Bruker quadrature Rat Brain coil was used for RF reception. T₂^{*} maps were calculated from a RF-spoiled multi gradient echo (MGE) images (repetition time TR = 1000 ms, first echo time TE = 3.2 ms, ΔTE = 3.6 ms, number of echoes = 15, α = 30°, spatial resolution = 0.075² x 0.25 mm³, NEx = 32, 12 slices).

In vivo imaging procedure

Animals were anaesthetized with 2% isoflurane (Belamont, Nicholas Piramal Limited, London, UK) in air for all imaging procedures. For MRI acquisitions, the isoflurane rate was adjusted overtime in order to maintain the monitored respiration rate to 60 bpm.

After at least 5 months of diet, the atheroma plaque burden in individual mice was evaluated by MRI on a horizontal 4.7 T Biospec system (Bruker, Ettlingen, Germany). Abdominal aorta was imaged in order to confirm the presence of atheroma plaques.

In animals with detectable atherosclerosis, multivalent fluorescent VUSPIO-TEG4 particles were injected in a quantity corresponding to 4 mg of iron per kg of body weight ($4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Mice were imaged by MRI and fluorescence imaging. Basal images before injection were acquired for each *in vivo* technique. Non-injected and VUSPIO 0-injected mice served as controls. Images were acquired before, after 20 min and 24 h following the injection of nanoparticles. Comparison of MR signal before and after injection was based on the estimation of $R2^*$ ($= 1/T2^*$) for each voxel.

After the last image was acquired, the animals were humanely killed and dissected, while fluorescence imaging was performed at the Vivoptic facility in Bordeaux, using the Fluobeam imager (see supra). A blood sample was immediately retrieved from the cava vein and all remaining blood washed from the circulatory system and organs with a 3 mL PBS heparin (50 U/mL), followed by a 10 mL PBS intracardiac perfusion.

Results

Site specific multivalent grafting onto VUSPIO nanoparticles

Site-specific conjugation was conducted via the two terminal cysteines on the scFv fragment and the maleimide residues on the surface of the VUSPIO nanoparticle[1] according to the workflow presented in Figure 1.

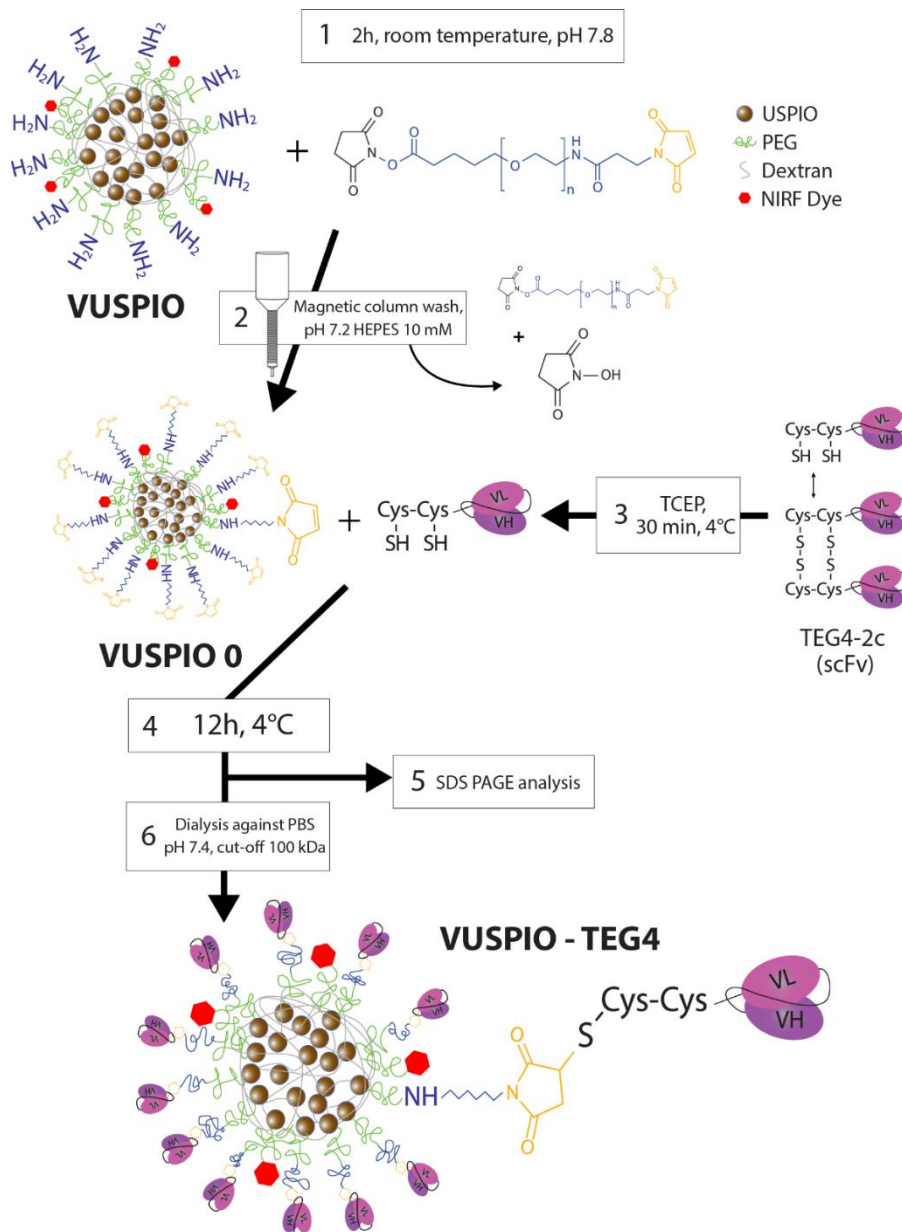


Figure 66: Schematic workflow for the conjugation process. 1: an excess NHS-PEG-mal is reacted onto the surface amines of the particle, 2: the VUSPIOs are washed on a magnetic column to remove the unreacted PEG and stop the reaction, 3: scFvs are activated by reduction with TCEP, 4: activated scFvs react with the surface maleimide of the VUSPIO for 12 h, 5: the grafting yield is determined by gel analysis before 6: the

Avidity measurement

The avidity of the TEG4-2c scFv before and after grafting to the VUSPIO was assessed by surface plasmon resonance (SPR) sensing on purified α IIb β 3 integrin coated with around 2000 RU (2 ng/mm²). This protein density was chosen to reflect endogenous α IIb β 3 receptor densities at the surface of activated platelets (1.7 ng/mm² considering a molecular weight of 250 kDa for α IIb β 3 and 50,000 α IIb β 3 per platelet with a diameter of 2 μ m). scFv alone being monovalent, they should exhibit lower affinity (no avidity) compared to their bivalent, full IgG counterpart. However, their smaller size allowing for the grafting of several fragments, resulting multivalency should benefit to the global avidity of the nanoparticle.[6] To confirm this, each VUSPIO-scFv sample was diluted according to its iron content, in order to assess the expected increase in avidity for each ratio (Supporting Information).

Dilutions of ratios R8, R16 and R32 were injected sequentially, from the highest to the lowest dilution factor, as shown in Figure 2A. All three ratios exhibited a similar concentration-dependence of the binding profile. The representative curves obtained for the 1/6 dilution, corresponding to a same order of magnitude of iron concentration (between 4.5 and 7.5 mM), are shown by Figure 2B, together with the sensorgram corresponding to a 100 μ g/mL concentration of free scFv prepared in solution. The SPR association curves of the multivalent VUSPIO-scFv did not reach equilibrium and continued to show gradual increase during the 2 min association phase. The association/dissociation curves represent a quicker association and higher maximum bound analyte for the R32 compared to the R16, itself superior to the R8. The great influence of the avidity effect was clearly highlighted with the R32 batch, which showed a higher association rate compared to other batches, for the same order of magnitude of VUSPIO particles concentration. Additionally, R16 and R32 batches, although they were tested at similar scFv concentrations (7.8 and 12.8 μ g/mL respectively), exhibited different behaviors. All three batches showed low to no dissociation compared to TEG4-2c scFv alone (Figure 2B). Free scFv behaved quite differently from multivalent VUSPIO-scFv batches with fast association and dissociation rates.

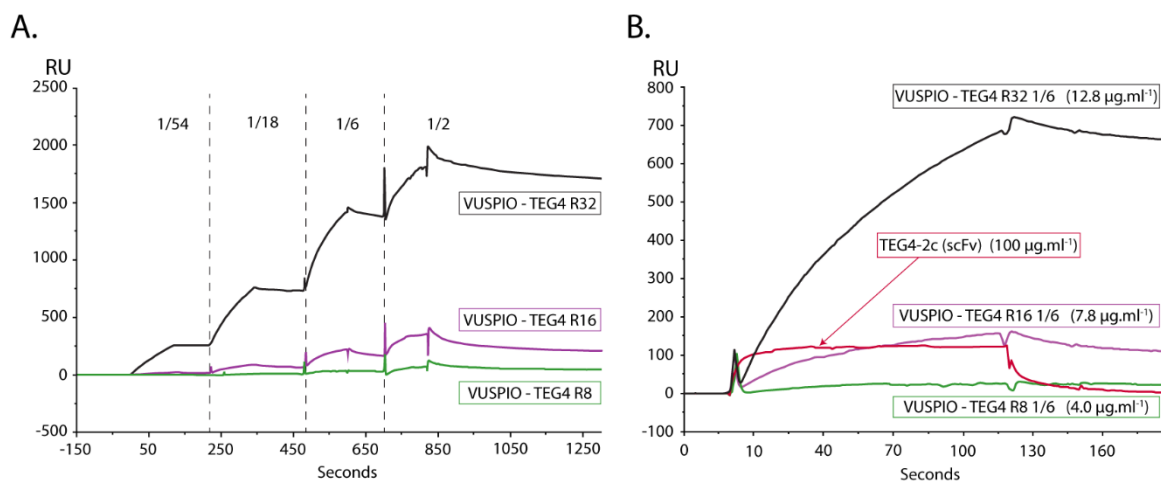


Figure 67: SPR analysis of the VUSPIO-TEG4 particles. A: Signal accumulation from each ratio measured at increasing iron concentration. B: Comparison of the 4.5 - 7.5 mM iron concentration (1/6 dilution) for R8, R16 and R32 conjugation ratios. Data from sequential injections was extracted to construct this graph.

SPR sensing confirmed that the VUSPIO-TEG4 binding avidity increased with the number of grafted scFv. The multivalence obtained thanks to an optimized grafting of scFv fragments on the VUSPIO nanoparticle can greatly increase the binding affinity of the monovalent TEG4-2c scFv. However, the resulting sensorgrams could not be fitted using a Langmuir binding model and an dissociation equilibrium constant could not be determined from these experiments because of multivalent interactions, *i.e.* different molecules of scFv on the same nanoparticle resulting in a pseudo-irreversible binding (95% of the binding remaining after 7 min), a phenomenon previously described.[7–9]

Reactivity assessment

Immunohistochemistry experiments were conducted to assess, on pathological tissues, both the TEG4-2c reactivity after the grafting process and the benefit of multifunctionalization. Immunohistochemistry showed that VUSPIO-scFv retained the reactivity of the unconjugated antibody. Indeed, upon incubation on atherosclerotic rabbit aorta slices, a specific staining of the areas of platelets accumulation in the atheroma plaque was observed (Figure 3). Oppositely, when incubated with bare VUSPIO particles or VUSPIO-IgG control particles (previously shown in Jacobin-Valat *et al.* [11]), no staining could be observed. Moreover, when tested on healthy rabbit, VUSPIO-TEG4 R32 did not accumulate in the healthy aorta. Similarly to the Biacore experiments, while the quantity of VUSPIO incubated on the slices remained constant, the staining intensity increased with the valence of the particles R8, R16, R32. The reactivity of TEG4-2c scFv in areas of platelet accumulation was also confirmed by immunofluorescence co-staining on paraffin-embedded sections of arterial tissue from mouse, rabbit and human (see Figures S1, S2, S3 Supporting Information) to assess inter-

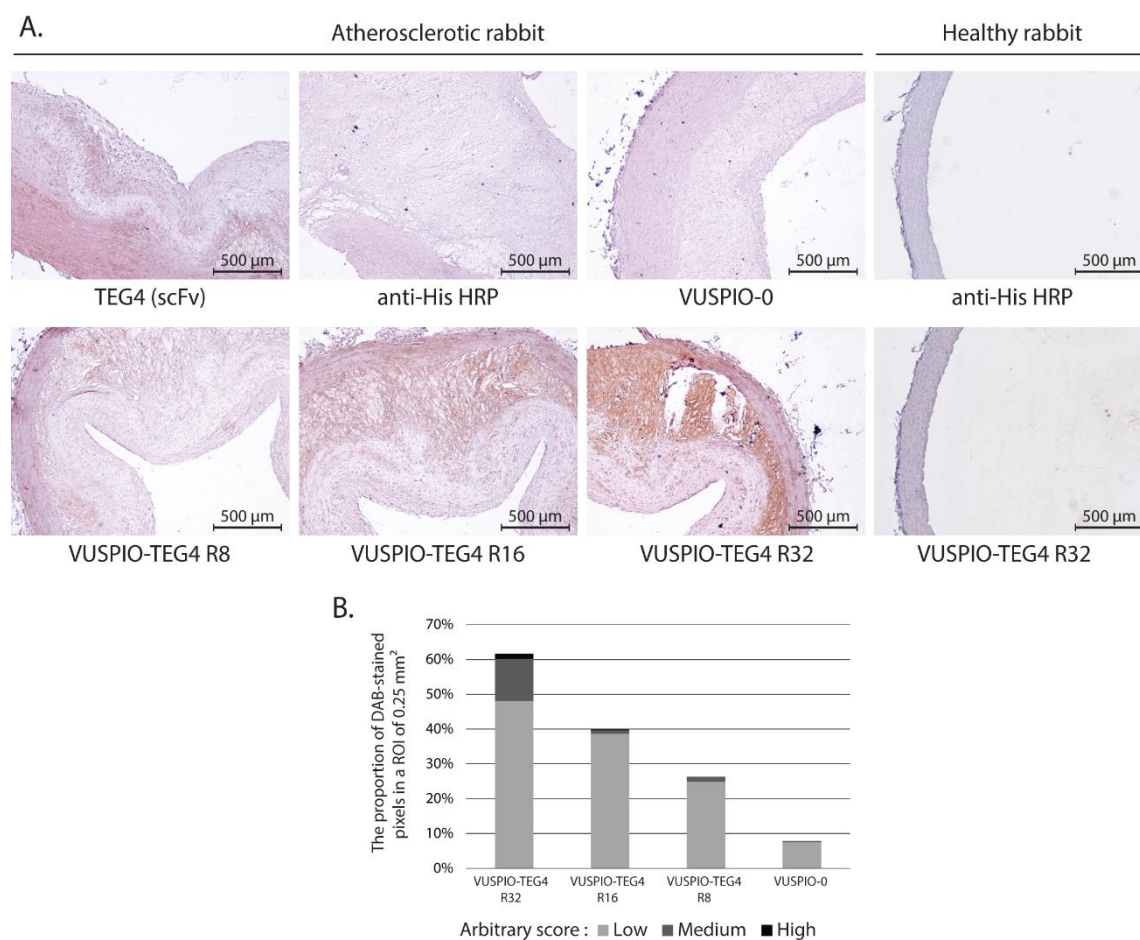


Figure 68: A-Reactivity evaluation of VUSPIO-TEG4. IHC analysis on atherosclerotic rabbit aorta of VUSPIO alone, 8 scFv-to-VUSPIO, 16 scFv-to-VUSPIO and 32 scFv-to-VUSPIO ratios. IHC analysis was also performed on sections of control rabbits with VUSPIO-TEG4 R32. The unconjugated TEG4-2c scFv was used as a positive control. The secondary anti-His HRP-labelled antibody alone was used as a negative control. B-Quantification was made using the IHC Profiler Open Source Plugin.

(<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096801>).

species cross reactivity, allowing for potential further translation to clinical studies.

Ex vivo imaging

Ex vivo experiments were performed in order to confirm the ability of the multivalent-functionalized VUSPIO to access its target on a freshly resected aorta. Taking advantage of the bimodal imaging agent, both fluorescent and MR images of the aortas were acquired and compared. Figure 4A shows ApoE^{-/-} mice aortas either uninjected (Control) or injected with multivalent functionalized-VUSPIO (TEG4-2c scFv or IgG) or VUSPIO 0. Each panel corresponds, from left to right, to the fluorescent image, the 7T MR image and zoomed MR images. Dashed line boxes on fluorescence and MR images delineate the same locations on the aorta, which are zoomed for better visualization of the color scale in MR. On zoomed areas, dashed black arrows point to the normal vessel wall, black arrows to the atheroma plaque, and white arrow to the accumulation of the targeted contrast agent in atherosclerotic structures. Note that the dashed red circles point out air bubbles entrapped in the agarose gel.

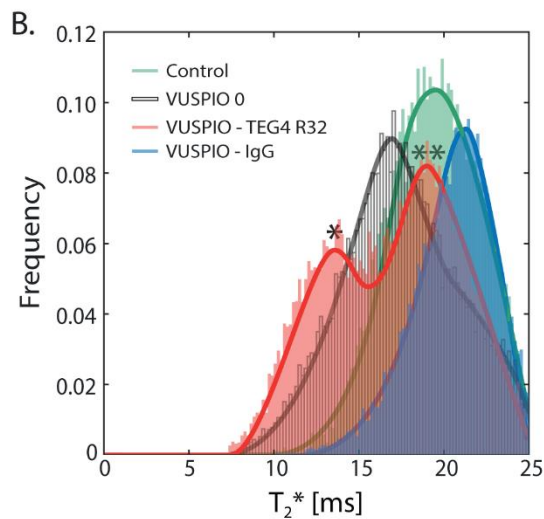
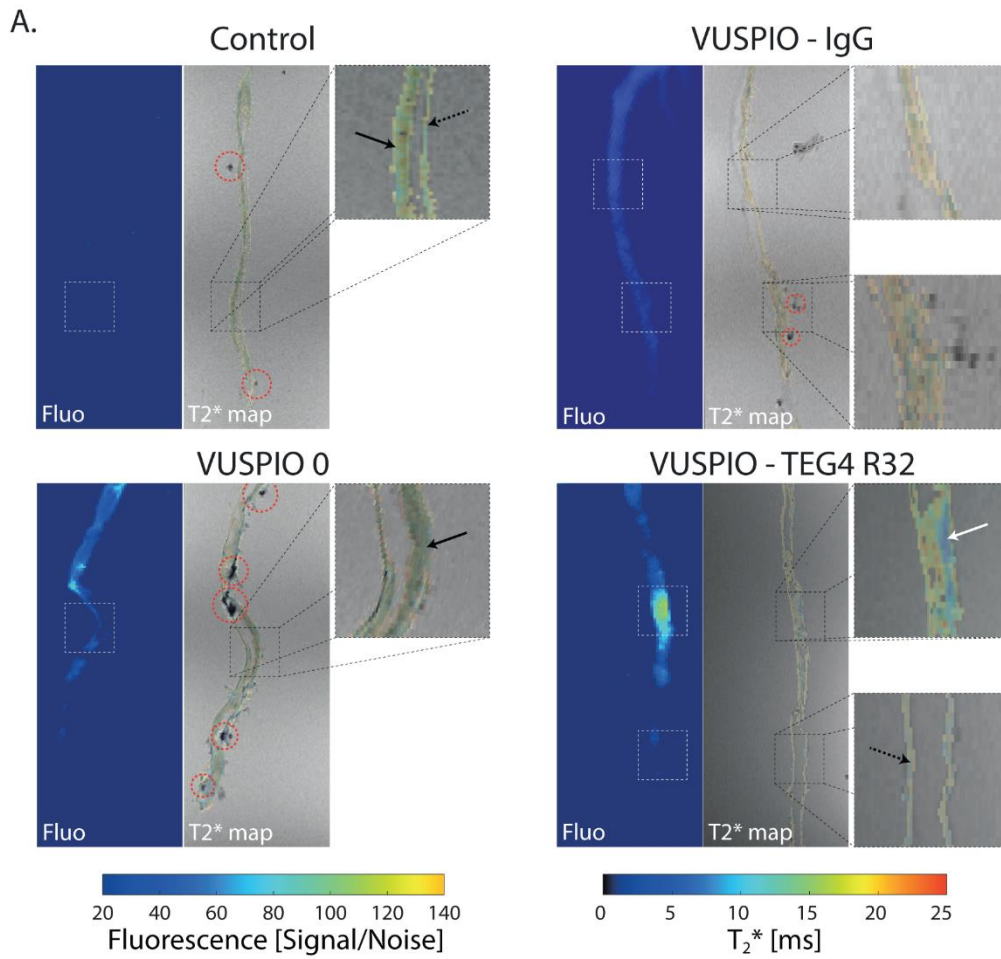


Figure 69: Fluorescent and MR images of atherosclerotic aorta. A: Signal to noise ratio of fluorescence images (left) and their corresponding MRI magnitude images with segmented T_2^* maps overlay (right) obtained from uninjected mice (control), after the injection of VUSPIO 0, VUSPIO-IgG and VUSPIO-TEG4 R32. B: Distribution of T_2^* originated from the segmented maps. Two peaks are clearly distinguishable after the injection of VUSPIO TEG4 R32 (*: mean $T_2^* \approx 13$ and **: mean $T_2^* \approx 19$).

No fluorescent signal was measured in the absence of injection, as demonstrated in the Control panel. Both VUSPIO-IgG and VUSPIO 0 led to a low but detectable fluorescence signal that tended to decrease from the top to the bottom of the aorta, corresponding to the injection flow direction. Here it should be pointed out that localized but small fluorescence signals were sometimes observed (see VUSPIO 0 panel). These fluorescence signals were always found to colocalize with the presence of air bubbles (red dashed circles on MR images) entrapped into the aorta, as clearly evidenced by the corresponding T_2^* -weighted MRI. On the contrary, intense fluorescence signals were measured in the VUSPIO-TEG4 R32, which exactly corresponded to the plaque location (white arrow). The intimal thickening of the aorta, characteristic of an atherosclerotic plaque, was present in all mice (black arrows). Indeed, MR images resolution allowed for an anatomic discrimination of either the presence (plain arrows) or the absence (dashed arrows) of atheroma plaques (Figure 4A), easily distinguished by the intimal thickening. However, these anatomically different areas presented quite similar segmented mean T_2^* values. This makes T_2^* maps suitable for the detection of VUSPIO nanoparticles, which accumulation is known to induce a drop in the T_2^* signal. Differences in behavior were obtained between targeted and untargeted particles. Indeed, after VUSPIO-TEG4 R32 injection, a local decrease of the T_2^* colocalized with an intense fluorescence signal, which was not observed after VUSPIO 0 or VUSPIO-IgG injection. Similarly, upon VUSPIO-TEG4 R32 injection in age-matched C57BL6 mice on a normal chow diet, no hyposignal was observed (Figure S6 in Supporting Information). The decrease in the T_2^* value was only measured where atheroma plaque was present, as shown in the zoomed image of VUSPIO-TEG4 R32. Even if slightly dependent on the mice, as demonstrated in Figure 4B, the control ($T_2^* = 19.1 \pm 3.2$ ms), the VUSPIO 0 (20.9 ± 2.6 ms) and the VUSPIO-IgG (18.9 ± 4.3 ms) segmented mean T_2^* values were homogenous. In contrast, thanks to the local accumulation of iron oxide nanoparticles, a sub- T_2^* population (white arrow) with a clear decrease in the T_2^* values (≈ 13 ms) was detected upon injection of VUSPIO-TEG4 R32.

In vivo imaging

The ability of the multivalent VUSPIO-TEG4 R32 to access its target *in vivo* was assessed by MRI by characterizing its accumulation 20 min and 24 h post-injection. Afterwards, fluorescence-based biodistribution studies and accumulation in lesions in the aorta were assessed *ex vivo*.

Figure 5A shows the R_2^* maps measured at the plaque level in ApoE^{-/-} mice injected with either VUSPIO-TEG4 R32 or VUSPIO 0 at 4 mg.kg⁻¹ of iron. Twenty minutes after the injection of VUSPIO-TEG4 R32, measured R_2^* signal tended to increase due to the accumulation of the MR contrast agent. The same was observed at 24 h although the increase was less prominent. In contrast, no measurable R_2^* change was observed after VUSPIO 0 injection. Because of the absence of plaques in the aorta, no accurate segmentation of pixels corresponding to an atheroma plaque was possible before and after the injection of VUSPIO-TEG4 R32 in control C57BL6 mice (Figure S8 in Supporting Information). Figure 5B presents the resulting mean R_2^*

values of at least 6 slices from 6 independent ApoE^{-/-} mice. A significant increase of R_2^* was confirmed at 20 min post injection ($p = 0.0001$). This difference was also found significant compared to the mean R_2^* measured consecutively to the injection of VUSPIO 0. No significant differences were found 24h after injection ($p = 0.068$). Nevertheless, this p value, although above the significance threshold, was relatively small compared to the corresponding p value measured with the VUSPIO 0 ($p = 0.95$), accounting for a slight persistence of the VUSPIO-TEG4 within the plaque at 24 h post-injection.

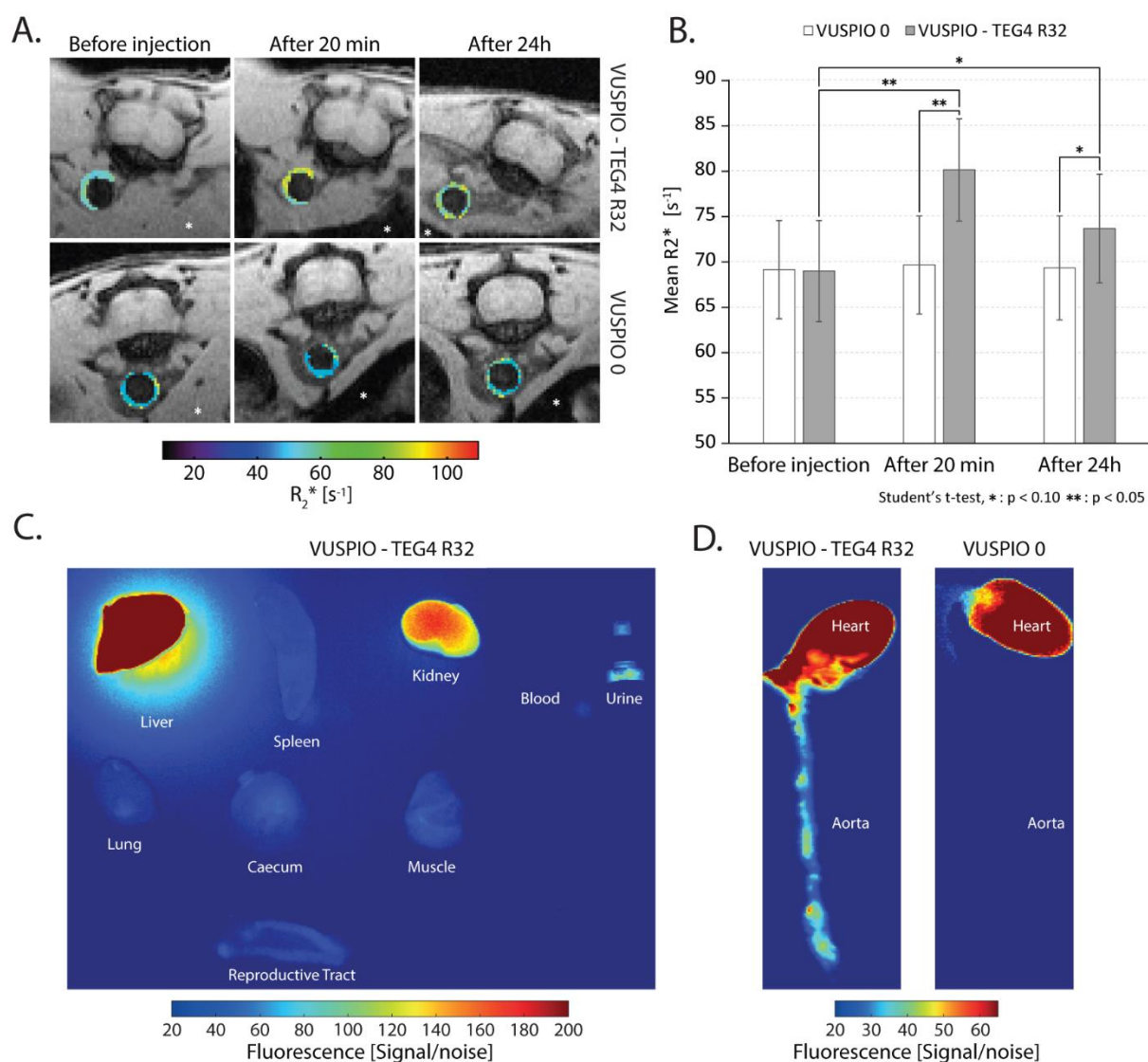


Figure 70: In vivo injection of VUSPIO TEG4 R32 compared to VUSPIO 0. A: Segmented relaxation rate R_2^* maps overlaid on their corresponding magnitude images obtained before and after the injections, *Indicates the liver. B: Mean segmented R_2^* values measured on at least 6 slices of $N = 6$ mice for VUSPIO TEG4 R32 and $N = 3$ mice for VUSPIO 0. C, D: Nanoparticles fluorescence biodistribution imaging in dissected organs. Statistical analysis of the fluorescence distribution is shown in Table 1.

Fluorescence biodistribution studies showed a clear advantage in the uptake of multivalent targeted VUSPIOs in the aorta compared to untargeted ones. Figure 5C-D shows a typical

fluorescence distribution after 24 h in a multivalent VUSPIO-TEG4-injected ApoE^{-/-} mice. The most intense signals were displayed by the liver, kidneys, and urine, which is relevant with nanoparticles elimination pathways. All particles had been cleared from the blood and did not distribute into the lungs or muscles. Interestingly, the extremely strong signal in the liver creates a halo that impedes correct signal detection from the other organs; therefore, the biodistribution image had to be acquired in the absence of the liver. Figure 5D shows a comparison of the fluorescence signal of aortas in VUSPIO-TEG4-injected and VUSPIO 0-injected mice. Note that the scale of the image was adjusted to emphasize the fluorescence found located all along the aorta for the VUSPIO-TEG4. Using the same scale failed to demonstrate fluorescence along the aorta of a VUSPIO 0-injected mouse. Statistical results are summarized in Table 1. No significant biodistribution difference was observed between the injection of targeted VUSPIO and VUSPIO 0 except for the VUSPIO-TEG4-injected aorta, which showed a relative fluorescence signal twice as intense as the signal detected in the aorta injected with VUSPIO 0.

Table 13: Biodistribution of the relative fluorescence signals measured 24h post injection.

Organ	Liver	Kidney	Heart	Spleen	Aorta
VUSPIO-TEG4	Sat. S.	100 ± 8.9 %	50.4 ± 18.7 %	30.3 ± 7.7 %	16.7 ± 5.0 %
VUSPIO 0	Sat. S.	100 ± 7.8 %	46.1 ± 23.6 %	29.9 ± 5.85 %	7.8 ± 3.4 %
P value (Student's T-Test)	N/A	0.86	0.81	0.94	0.04

Discussion

In a previous study, we showed that TEG4, a human antibody selected by phage display against platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, and produced under a full rIgG4 format, was able to recognize atheroma plaques in mouse, rabbit and human alike.[11] Here we used a smaller format, TEG4-2c scFv, engineered to harbor terminal cysteines which allowed for oriented and site specific grafting to the terminal maleimide functions borne by VUSPIO nanoparticles.[19] Surface plasmon resonance experiments showed that this newly engineered format was able to bind to its target, the purified integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, both unconjugated and after conjugation to nanoparticles, justifying the interest of this oriented grafting. It was further proven by immunofluorescence experiments that this format maintained its reactivity to atheroma lesions as it was shown to label the same structures as a commercial anti-CD41 antibody (see Supporting Information), both before and after conjugation.

In this previous study, we also described the conjugation of TEG4, as a full rIgG4 format, to VUSPIO nanoparticles.[11] Although this particle, called VUSPIO-TEG4 rIgG4, was able to recognize platelets and atheroma *in vitro*, *in vivo* binding could not be demonstrated. A possible reason for this was that, with an average of only one antibody per VUSPIO, the avidity

of the particle was not sufficient to ensure persistent homing *in vivo*. Therefore, in the present study, the TEG4-2c scFv format was chosen in order to minimize the steric hindrance of the targeting agent and consequently to allow for increasing the conjugation ratio. Here, we achieved a maximum ratio of 16 scFv per VUSPIO and we demonstrated the positive influence of this multifunctionalization on both the contrast agent avidity on integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and the atheroma plaque recognition *in vitro*. Indeed, free TEG4-2c scFv were found to rapidly dissociate from the $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -functionalized surface in SPR. In contrast, multivalent VUSPIO-TEG4 hardly dissociated from the target, suggesting near irreversible interactions on immobilized $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. The sensorgrams obtained when the multivalent VUSPIO-TEG4 batches were injected sequentially at increasing concentrations could not be fitted with a 1:1 model of interaction, highlighting a complex binding reaction that likely involves avidity effects and a pseudo-rolling mechanism on the sensor chip. Note that the latter was coated with around 2000 RU (2 ng/mm^2) of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ integrin, a protein density chosen to reflect endogenous $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ receptor densities at the surface of activated platelets, and thus to reflect the *in vivo* interaction of VUSPIO-TEG4 encountering activated platelets in atheroma. Multivalent interactions (multiple ligands to multiple receptors) between nanoparticles and their targets are indeed a well-known mechanism adopted by living organisms to facilitate the attachment of pathogens to host cells or immune cells to vascular endothelium.[31,32] In our case, multivalence should benefit to *in vivo* targeting with an improvement of the retention time at the lesion site.

Subsequently, the observed *in vitro* behavior of VUSPIO-TEG4 was confirmed by immunohistochemistry experiments. We showed an improvement in atheroma plaques labeling when increasing the ratio between TEG4-2c scFv and VUSPIO nanoparticles (Supporting Information).

Homing of VUSPIO-TEG4 to atherosclerotic lesions was then demonstrated by *in situ* targeting assessment in ApoE^{-/-} mice. Taking advantage of the dual imaging modality offered by the VUSPIO platform, an MRI protocol combined with NIRF imaging was established to permit successive quantifications of: 1/ the MR signal modulation (R_2^* map) mediated by the iron oxide nanoparticles and 2/ the fluorescence signal arising from the near infrared fluorochromes appended to the VUSPIO. A specific contrast agent-driven R_2^* enhancement of the atheroma plaques was detected by MRI at 7 T, confirmed by a matching NIRF signal distribution and consistent with the observed atherosclerotic lesions pattern.

Finally, the potential of VUSPIO-TEG4 as an atheroma-targeting contrast agent was evaluated *in vivo*. In this study, *in vivo* axial MR images were acquired in the abdominal region for two main reasons. First, it allowed us to minimize the MR motion artifacts that could corrupt the R_2^* measurements, *e.g.* the heart beating. Second, at this level, the aorta is surrounded by the paraspinal muscles and by the liver, which limit the presence of constant magnetic field variation (ΔB_0), usually produced by air filled organs such as the lungs or the stomach, responsible for an artificial increase of R_2^* . MR imaging highlighted a statistically significant

R_2^* enhancement in the plaque 20 min after injection ($p = 0.0001$), which persisted 24 h after injection, although with a p -value of 0.059. In addition, biodistribution studies performed in *in vivo*-injected animals tended to prove a real benefit from VUSPIO multivalent functionalization on plaque recognition 24 h after injection.

The property of the contrast agents to accumulate into the lesions during a given period of time is still a matter of debate: in 2008, a study by Briley-Saebo *et al.*[22] hypothesized that, in order to enter the plaque, rigid objects like USPIO (ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles) had to be small enough to fit through the vascular fenestrae of the impaired endothelium. The estimated maximum size was reported to be this of native lipoproteins, up to 25 nm. Later, lipid-coated USPIO (LUSPIO), inferior to 20 nm in size, and functionalized with antibodies targeting oxidation specific epitopes, showed a superior accumulation in plaque macrophages than their non-targeted counterpart.[25] In addition, they showed a superior MR signal attenuation than either targeted or untargeted lipid-coated superparamagnetic iron oxide, theoretically more potent but displaying a size between 35 and 40 nm, which was hypothesized to impair their accumulation into the plaque. On the other hand, gadolinium (Gd)-loaded micelles, although superior to 100 nm in size, were still able to squeeze through assumed 25 nm diameter pores and be taken up by macrophages.[33,34] Hence, the size but also the flexibility of nanoparticles are to be considered when looking at their ability to enter the plaque and it is not clear whether 25 nm is a clear-cut limit for fenestration in the mouse model. Accordingly, the VUSPIO hydrodynamic size of approximately 90 nm before functionalization may constitute a limitation to their entrance through the vascular fenestrae. Interestingly, the diameter distribution of VUSPIO follows a Gaussian model, meaning that a fraction of the injected particles may be small enough to enter the plaque. In addition, in the case of our study with TEG4-2c scFv targeting activated platelets, the particle, if not internalized, could bind to the arterial wall of atheroma lesions. However, it is likely that the stringency of arterial blood flow disturbs the particles binding, decreasing the number of attached VUSPIO-TEG4 nanoparticles at the lesion site over time. This could explain the decrease in contrast enhancement after 24 h by MRI. Is it noteworthy that, in the perspective of the clinical application of the object, an imaging sequence 20 minutes after injection could reveal more manageable than 24 h later. Nevertheless, as a perspective to overcome retention time issues, formulation improvements should work at increasing the power of PEGylation[35] and decreasing the mean size of the nanoparticles in order to exhibit longer circulation times and favor entering within the plaque, respectively.

Acknowledgment

This work has benefited from the Vivoptic imaging platform supported by France Life Imaging. More particularly, we would like to thank C. Genevois for her technical support. This work has benefited from the facilities and expertise of the Biophysical and Structural Chemistry platform (BPCS) at IECB, CNRS UMS3033, Inserm US001, Bordeaux University <http://www.iecb.u-bordeaux.fr/index.php/fr/plateformestecnologiques>. The microscopy

was done in the Bordeaux Imaging Center a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The help of Sébastien Marais is acknowledged. We would like to thank the Haut-Lévêque Hospital in Pessac, France, for providing the human biological material.

Associated content

Supporting Information Available

Details of the TEG4-2c scFv production, are provided. Immunofluorescence on mouse, rabbit and human tissue, as well as co-staining, are then presented. The full protocol for Site specific multivalent grafting onto VUSPIO nanoparticles and Conjugation ratio measurement is also included, as well as the details for Avidity measurement experiments. Finally, Relaxivity measurements and Data analysis and processing are detailed.

Abbreviations

scFv, single-chain variable fragment; ApoB, Apolipoprotein B; ApoE^{-/-} mouse, Apolipoprotein E knockout mouse; SPR, surface plasmon resonance; IHC, immunohistochemistry; NIRF, near infrared fluorescence; MRI, magnetic resonance imaging; (V)USPIO, (Versatile) Ultrasmall superparamagnetic iron-oxide; LDL, low-density lipoproteins; IMAC, Immobilized metal affinity chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

References

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* [Internet]. (2017). Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/early/2017/01/25/CIR.0000000000000485>.
2. Tsimikas S, Miyanohara A, Hartvigsen K, *et al.* Human Oxidation-Specific Antibodies Reduce Foam Cell Formation and Atherosclerosis Progression. *J. Am. Coll. Cardiol.* [Internet]. 58(16), 1715–1727 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230644/>.
3. Ponnuswamy P, Van Vré EA, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: spotlight on B- and T-cells. *Vascul. Pharmacol.* 56(5–6), 193–203 (2012).
4. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(5), 969–979 (2011).
5. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, *et al.* Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(13), 5134–5138 (1990).
6. Vora DK, Fang Z-T, Liva SM, *et al.* Induction of P-Selectin by Oxidized Lipoproteins Separate Effects on Synthesis and Surface Expression. *Circ. Res.* [Internet]. 80(6), 810–818 (1997). Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/80/6/810>.
7. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons From Sudden Coronary Death A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* [Internet]. 20(5), 1262–1275 (2000). Available from: <http://atvb.ahajournals.org/content/20/5/1262>.
8. Insull Jr. W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am. J. Med.* [Internet]. 122(1, Supplement), S3–S14 (2009). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934308010176>.
9. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in Inflammation and Atherogenesis. *Front. Immunol.* [Internet]. 6 (2015). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351644/>.
10. Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, *et al.* Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34(3), 571–580 (2014).
11. Jacobin-Valat M-J, Laroche-Traineau J, Larivière M, *et al.* Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by

- magnetic resonance imaging. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* [Internet]. 11(4), 927–937 (2015). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S154996341500012X>.
12. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, *et al.* Imaging Atherosclerosis. *Circ. Res.* [Internet]. 118(4), 750–769 (2016). Available from: <http://circres.ahajournals.org/content/118/4/750>.
 13. Lobatto ME, Calcagno C, Millon A, *et al.* Atherosclerotic Plaque Targeting Mechanism of Long-Circulating Nanoparticles Established by Multimodal Imaging. *ACS Nano.* 9(2), 1837–1847 (2015).
 14. Beldman TJ, Senders ML, Alaarg A, *et al.* Hyaluronan Nanoparticles Selectively Target Plaque-Associated Macrophages and Improve Plaque Stability in Atherosclerosis. *ACS Nano.* 11(6), 5785–5799 (2017).
 15. Bruckman MA, Jiang K, Simpson EJ, *et al.* Dual-Modal Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Atherosclerotic Plaques in Vivo Using VCAM-1 Targeted Tobacco Mosaic Virus. *Nano Lett.* [Internet]. 14(3), 1551–1558 (2014). Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/nl404816m>.
 16. Kheiriloom A, Kim CW, Seo JW, *et al.* Multifunctional Nanoparticles Facilitate Molecular Targeting and miRNA Delivery to Inhibit Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice. *ACS Nano* [Internet]. 9(9), 8885–8897 (2015). Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.5b02611>.
 17. Jacobin M-J, Laroche-Traineau J, Little M, *et al.* Human IgG monoclonal anti-alpha(IIb)beta(3)-binding fragments derived from immunized donors using phage display. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 168(4), 2035–2045 (2002).
 18. Mornet S, Portier J, Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J. Magn. Mater.* [Internet]. 293(1), 127–134 (2005). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030488530500140X>.
 19. Vallet-Courbin A, Larivière M, Hocquellet A, *et al.* A Recombinant Human Anti-Platelet scFv Antibody Produced in *Pichia pastoris* for Atheroma Targeting. *PloS One* [Internet]. 12(1), e0170305 (2017). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170305>.
 20. Chu B, Ferguson MS, Chen H, *et al.* MRI Features of the Disruption-Prone and the Disrupted Carotid Plaque: A Pictorial Essay. *JACC Cardiovasc. Imaging* [Internet]. 2(7), 883–896 (2009). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793180/>.
 21. Petibon Y, El Fakhri G, Nezafat R, Johnson N, Brady T, Ouyang J. Towards coronary plaque imaging using simultaneous PET-MR: a simulation study. *Phys. Med. Biol.* [Internet].

59(5), 1203–1222 (2014). Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/59/5/1203/meta>.

22. Briley-Saebo KC, Mani V, Hyafil F, Cornily J-C, Fayad ZA. Fractionated feridex and positive contrast: In vivo MR imaging of atherosclerosis. *Magn. Reson. Med.* [Internet]. 59(4), 721–730 (2008). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrm.21541>.

23. Michalska M, Machtoub L, Manthey HD, *et al.* Visualization of Vascular Inflammation in the Atherosclerotic Mouse by Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Vascular Cell Adhesion Molecule-1-Specific Nanoparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* [Internet]. 32(10), 2350–2357 (2012). Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.112.255224>.

24. Makowski MR, Forbes SC, Blume U, *et al.* In vivo assessment of intraplaque and endothelial fibrin in ApoE^{-/-} mice by molecular MRI. *Atherosclerosis* [Internet]. 222(1), 43–49 (2012). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915012000123>.

25. Briley-Saebo KC, Cho YS, Shaw PX, *et al.* Targeted Iron Oxide Particles for In Vivo Magnetic Resonance Detection of Atherosclerotic Lesions With Antibodies Directed to Oxidation-Specific Epitopes. *J. Am. Coll. Cardiol.* [Internet]. 57(3), 337–347 (2011). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3095034/>.

26. Vauquelin G, Charlton SJ. Exploring avidity: understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands. *Br. J. Pharmacol.* 168(8), 1771–1785 (2013).

27. Hong S, Leroueil PR, Majoros IJ, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM. The Binding Avidity of a Nanoparticle-Based Multivalent Targeted Drug Delivery Platform. *Chem. Biol.* [Internet]. 14(1), 107–115 (2007). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552106004716>.

28. Mourtas S, Canovi M, Zona C, *et al.* Curcumin-decorated nanoliposomes with very high affinity for amyloid- β 1-42 peptide. *Biomaterials*. 32(6), 1635–1645 (2011).

29. Li M-H, Choi SK, Leroueil PR, Baker JR. Evaluating binding avidities of populations of heterogeneous multivalent ligand-functionalized nanoparticles. *ACS Nano*. 8(6), 5600–5609 (2014).

30. Vallet-Courbin A, Larivière M, Hocquellet A, *et al.* A Recombinant Human Anti-Platelet scFv Antibody Produced in *Pichia pastoris* for Atheroma Targeting. *PLOS ONE*. 12(1), e0170305 (2017).

31. Lee RT, Lee YC. Affinity enhancement by multivalent lectin–carbohydrate interaction. *Glycoconj. J.* 17(7–9), 543–551 (2000).

32. Mammen M, Choi S-K, Whitesides GM. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(20), 2754–2794 (1998).
33. Briley-Saebo KC, Amirbekian V, Mani V, *et al.* Gadolinium mixed-micelles: Effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magn. Reson. Med.* [Internet]. 56(6), 1336–1346 (2006). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrm.21094/abstract>.
34. Maiseyeu A, Mihai G, Kampfrath T, *et al.* Gadolinium-containing phosphatidylserine liposomes for molecular imaging of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 50(11), 2157–2163 (2009).
35. Adumeau L, Genevois C, Roudier L, Schatz C, Couillaud F, Mornet S. Impact of surface grafting density of PEG macromolecules on dually fluorescent silica nanoparticles used for the in vivo imaging of subcutaneous tumors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* [Internet]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416517300442>.
36. Adumeau L. Développement de stratégies de biofonctionnalisation de surface de nano-objets pour des applications biologiques [Internet]. Bordeaux Available from: <http://www.theses.fr/2015BORD0425>.
37. Dahnke H, Schaeffter T. Limits of detection of SPIO at 3.0 T using T2* relaxometry. *Magn. Reson. Med.* 53(5), 1202–1206 (2005).

Annexe n°10 :

Un travail mené en collaboration avec l'équipe de Sylvie Crauste-Manciet (ChemBioPharm) a permis l'écriture d'un article qui est actuellement en cours de soumission. Ce travail a porté sur la PEGylation de nanoémulsions huile dans eau chargées d'USPIOs (NE) avec des PEG de différents poids moléculaires. Ces NE ont été fonctionnalisées avec un anticorps humain ciblant la galectine 3 (identifiée récemment comme biomarqueur de l'athérosclérose) et leur spécificité a été testée in vitro par immunohistochimie. Ces NE fonctionnalisées ont aussi fait l'objet d'une étude in vivo par IRM sur un modèle de souris ApoE^{-/-}. Les résultats présentés doivent encore être appuyés par des essais complémentaires in vivo auxquels je participe activement (3 souris ApoE^{-/-}). Je m'occupe aussi du traitement des données IRM via la méthode de post-traitement détaillée au cours de ma thèse.

Long-circulating superparamagnetic nanoemulsion platform for atherosclerosis imaging

***Samuel Bonnet**^{3,4‡}, Geoffrey Prévot^{2‡†}, Cyril Lorenzato¹, Stéphane Mornet³, Philippe Barthelemy², Marie-Josée Jacobin-Valat⁴, Audrey Hémadou⁴, Mireille Blanchard-Descel¹, Martine Duonor-Cérutti⁵, Sylvie Crauste-Manciet^{2‡} and Gisèle Clofent-Sanchez^{4‡*}*

1. CNRS UMR 5255, Univ. Bordeaux, ISM, Institut des Sciences Moléculaires - Talence, France
2. Univ. Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA, ARN: Régulations Naturelle et Artificielle, ChemBioPharm - Bordeaux, France
3. CNRS UMR 5026, Univ. Bordeaux, ICMCB, Institut de Chimie de la Matière Condensée - Pessac, France
4. CNRS UMR 5536, Univ. Bordeaux, CRMSB, Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques - Bordeaux, France
5. CNRS UPS 3044, Baculovirus et Thérapie - Saint-Christol-lès-Alès, France

KEYWORDS: Atherosclerosis, Nanoemulsion, Magnetic Resonance Imaging, stealth, human antibody

ABSTRACT

Atherosclerotic vascular disease threatens to become a leading cause of death worldwide by the year 2020. Currently, high-risk plaques also called vulnerable atheroma plaques are often undiagnosed before the occurrence of severe complications as stroke or myocardial infarction. Molecular imaging agents targeting high-risk atheroma lesions will be a promising way to improve the diagnostic. We engineered oil-in-water (O/W) nanoemulsions (NE) loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles to develop a magnetic resonance imaging (MRI) tool. The focus of this work was on the development of stealth and safe imaging agents. For this purpose, NE surface was decorated with a PEG (polyethylene glycol) layer of different molecular weights in order to reduce the liver uptake and prolong blood circulation time. For targeting purpose, NE-PEG were functionalized with a human antibody to minimize immune reaction. This human antibody, named P3, targets galectin 3, a biomarker of atherosclerosis. NEs were characterized using dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and zeta potential measurements. Both the distribution and the ability of NE to selectively bind the atheromatous plaque was evaluated, *in vivo*, by dynamic MRI. Depending on the lipid-PEG molecular weight, formulations display variations in liver uptake, lipid-PEG₃₄₀₀-Maleimide having longer circulating properties. Specificity of P3 antibody conjugated NE (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3) was assessed *in vitro* by immunohistochemistry on mouse/human aorta samples. NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 ability to target the atheroma plaque was confirmed *in vivo* following administration to a mouse model of atherosclerosis (ApoE^{-/-}). The presented data underline the potential of functionalized magnetic NE for non-invasive targeted imaging of atherosclerosis.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is a vascular disease characterized by the development of lipid-rich plaques, so-called atheroma plaques, in the artery wall¹. Atheroma plaques can be classified into two types: stable plaques or vulnerable plaques². The formers are usually rich in extracellular matrix and smooth muscle cells maintaining the integrity of this fibrous plaque for years. On the contrary, vulnerable plaques are rich in macrophages and inflammatory cells making them prone to rupture, this phenomenon causing cardiovascular complications³⁻⁵.

Angiography is currently the everyday medical practice for imaging peripheral arterial disease⁶. Angiogram information is limited to lumen stenosis and fails to provide information about plaque morphology and risk of rupture⁷. Also, two third of the ruptured plaque showed an angiographically insignificant stenosis^{8, 9}. Other imaging modalities have emerged including intravascular ultrasound (IVUS) and optical coherence tomography (OCT)¹⁰⁻¹³. Both IVUS and OCT methods are able to provide information about plaque morphology but relied on invasive imaging. The development of noninvasive imaging strategies to identify high-risk plaques offers new opportunities for atheroma diagnostic^{14, 15}. Compared to other imaging modalities, Magnetic Resonance Imaging (MRI) have the advantages of excellent soft-tissue contrast, good resolution, and no ionizing radiation exposure¹⁶⁻¹⁹.

Previous work demonstrated that magnetic oil-in-water (O/W) nanoemulsions (NE) could contain a sufficient quantity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) to generate MRI signal making them highly suitable as imaging agents²⁰. However, the ability of NE conjugated with antibodies to target atheroma was only achieved *in vitro* and *ex vivo*. In this study, we aim at developing an improved contrast agent with stealth properties in order to reduce liver uptake.

The surface functionalization of nanosystems with polyethylene glycol (PEG) is the most common method to reduce their clearance from blood circulation²¹. PEG macromolecules create a protective hydrophilic layer around the nanosystems able to repel absorption of opsonin proteins²². Delaying the opsonization process increases the blood circulation of the PEGylated nanoobjects²³. PEGylation of liposomes²⁴, micelles²⁵, and nanoparticles²⁶ is well described in the literature but only a few works studied NE surface modification with PEG. Hak *and al.*²⁷ studied PEG surface density impact on NE circulation half-lives by collecting blood samples. Here, effects on NE surface modification with PEG layers of different molecular weights (lipid-PEG₂₀₀₀ and/or lipid-PEG₃₄₀₀-Maleimide) on liver uptake were studied by dynamic MRI. To achieve specific atheroma targeting, the human antibody P3 engineered under the single chain Fragment variable (scFv)-Fc format equipped with a cysteine tag (ScFv-Fc-2Cys) was conjugated to droplets surface. Highly specific targeting moieties such as antibodies recognizing over-expressed molecular components of atheroma plaques would allow directing contrast agents *in situ* to the lesions. Molecular imaging of vulnerable plaques is of utmost interest, considering that the plaque composition possibly leading to plaque rupture more than the narrowing of arteries underlies the clinical conditions of stroke or myocardial infarction.

The objective of this work was to develop stealth NE loaded with SPIO and grafted with an atheroma specific antibody as a new MRI contrast agent for optimized atheroma diagnostic.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

The purified oil phase Miglyol® 840 was kindly provided by IOI OLEO GmbH (Hamburg, Germany). Egg lecithin containing 82.3% phosphatidylcholine (Lipoid® E80) and DSPE-PEG₂₀₀₀ (N-(Carbonyl-methoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) were provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany);

Polysorbate 80 (Tween[®] 80) were purchased from SEPPIC (Paris, France). The hetero-bifunctional linker DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide (1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-Poly(Ethylene Glycol)-Maleimide) was purchased from Laysan Bio, Inc. (Alabama, USA). SPIO were synthesized and made hydrophobic according procedures previously described²⁸⁻³⁰. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP $\geq 98\%$), Hydrochloric acid, formic acid, PBS buffer, sodium hydroxide and IgG antibody were acquired from Sigma-Adrich (Missouri, USA). PBS-heparin solution was acquired from Sanofi Aventis (Vitry-sur-Seine, France). Glycerol was purchased at Cooperation Pharmaceutique Française (Melun, France). MACS[®] Cell Separation Columns were purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany).

NEs formulation

NEs were formulated as previously described²⁰. Briefly, 12 mg of Lipoid[®] E80 was dispersed in 200 mg of Miglyol[®] 840 (IOI Oleo GmbH) by heating and followed by the addition SPIO at 12.5 $\mu\text{mol/mL}$. The aqueous phase was composed of a dispersion of 25 mg Tween[®] 80 in 800 mg Milli-Q water. Lipid-PEG of different molecular weight (DSPE-PEG₂₀₀₀ and/or DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide) was added at 5 $\mu\text{mol/ml}$. A molar ratio of DSPE-PEG₂₀₀₀/ DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide 3:1 was used for NE PEGylated with mixed PEG₂₀₀₀/PEG₃₄₀₀-Maleimide. Emulsification was accomplished by phase inversion and homogenization by sonication (Sonic Vibra Cell - VC 250 set at 70% and output 7) to obtain submicron size range oil droplets. Prior to *in vitro* and *in vivo* experiments, formulation pH was adjusted close to physiological value using sodium hydroxide 0.1 N. Also, glycerol at 2% was added to adjust osmolality.

NE characterization

Physical characteristics of these magnetic formulations were assessed by dynamic light scattering (DLS), Zetameter and transmission electron microscopy (TEM). The hydrodynamic size was determined using a DLS device from Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZS) on NE

diluted at 1:1000 (v/v). The mean hydrodynamic size was determined on 3 independent measurements performed at 25°C. Zeta potential measurement was performed using Zetasizer Nano ZS coupled with Folded Capillary Cell (DTS1060) from Malvern Instruments. Oily Droplets quantification was performed by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NanoSight NS300 from Malvern Instruments. For TEM observation a Hitachi H7650 linked to an ORIUS SC1000 11MPX (GATAN) camera run by Digital Micrograph (GATAN) was used. Prior to observation, NEs were diluted 1:50 (v/v), transferred to a carbon-coated copper grid. NE iron concentration was quantified using UV-spectrometry measurements as previously described²⁹.

NE bio-functionalization

Prior to NE bio-functionalization, ScFv-Fc-2Cys P3 atheroma specific antibody bearing thiol functions was activated using TCEP with an excess of 20 mol per mol of P3. Generation of antibodies equipped with cysteine tag was described previously for TEG4 antibody³¹. Antibody coupling to NE was performed overnight with a theoretical ratio of 14 antibodies per NE. The ungrafted antibodies were removed using a magnetic sorting column (MACS® Cell Separation Columns) as previously described³¹.

***In Vivo* Experimental Animal Model**

Twelve female C57BL/6 mice of 6 weeks old (weighing from 17 to 18 g), and five JAX™ ApoE^{-/-} mice of 8 to 12 month old (28 to 32 g), were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France) and housed under a 12 h light/dark cycle with food and water provided *ad libitum*. ApoE^{-/-} mice were fed a high-cholesterol diet (0.15% cholesterol) for 21 weeks to allow for the development of atherosclerotic lesions. The experimental animals were cared for in accordance with institutional guidelines, and they were allowed to acclimate for at least 7 days prior to initiation of any experiments. All preclinical experiments described in this

publication were approved under the N°50120192-A by the Animal Care and Use Committee of Bordeaux, France.

Magnetic resonance imaging

All MR experiments and relaxometry measurements were performed at 37°C on a 4.7-Tesla Bruker Biospec System (Ettlingen, Germany) equipped with gradient systems of 660 mT/m maximum strength and 110 μ s rise time.

In vivo furtivity MRI assays.

Furtivity assays were performed on $n = 12$ female C57BL/6 mice ($n = 3$ per condition). NE PEGylated with DSPE-PEG₂₀₀₀, DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide or mixed DSPE-PEG₂₀₀₀/DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide and non-PEGylated NE were injected intravenously in tail vein at 53.7 μ mol (Fe).kg⁻¹ bodyweight on anesthetized mice by inhalation of isoflurane (1.5%). Dynamic MRI study was performed using a RF spoiling gradient echo sequence (FLASH) with the following parameters: flip angle = 30°; echo time = 3.4 ms; TR \approx 30 ms; resolution = 0.16 \times 0.16; Number of slices = 3; FOV = 40 \times 30 mm; slice thickness = 1 mm; Nex = 10 and dynamic scan time \approx 60s.

The MR scanning session proceeded as follows: each animal was scanned for 8 to 10 min before the injection (depending of the variation of the respiration rate). At this time the MR sequence was stopped, and the NE injection was performed. As fast as the injection was completed the MR acquisition was restarted and the delay between the end of the injection and the acquisition of the first dynamic image was measured (50 s per each dynamic image). These injection delays were about 1 to 3 min. Finally, the two dynamic sessions were fused considering this injection delay. The time between two MR dynamic images for each dynamic session was estimated as the ratio: total scan time (function of the respiration rate) divided by the number of dynamics performed.

In this study, we were interested exclusively in the signal exhibited by the liver and kidneys (renal cortex and renal pyramids). In order to restrict motion analysis to the mentioned organs of interest, a segmentation procedure was performed prior to the analysis. Briefly, on each slice of the first dynamic, an initial ROI was defined and subsequently refined through a manual correction. Dynamic motion fields were then estimated for each dynamic MR images using the RealTITracker method described by Zachiu *et al.*^{32,33}. These motion (vector) fields were used to update the ROIs position in an elastic manner over each dynamic in order to follow the motion of the organ throughout the scan session. The mean MR signals of both the liver and one kidney were then extracted from these dynamic ROIs and used to estimate the organ iron accumulation as described in the following section. An example of the result of this correction can be found in the supplementary materials (Video S1).

Estimation of the blood half-life.

The nanoparticles used in this study owned a longitudinal relaxivity (r_1) of practically zero²⁰. Therefore, the MR signal changes measured during the accumulation of the NE were estimated to be only caused by R_2^* changes and not affected by any R_1 changes. The signal equation of the gradient echo sequence (1) was therefore simplified as (2):

$$S(\text{TE}, \text{TR}, \alpha)_t = M_0 \sin(\alpha) e^{-\text{TE} \cdot R_2^*} \times \frac{1 - e^{-\text{TR} \cdot R_1}}{1 - \cos(\alpha) e^{-\text{TR} \cdot R_1}} \quad (1)$$

$$S(t) = M_0 \sin(\alpha) e^{-\text{TE} \cdot (R_2^* + r_2^* C(t))} \quad (2)$$

where α is the flip angle and M_0 the MR signal when the echo time (TE) tend to zero, r_2^* the transversal relaxivity of the NE and $C(t)$ the iron concentration originating from the NE.

To estimate the iron accumulation, the MR signal over time ($S(t)$) was first normalized by the signal measured at the first dynamic, prior to the injection of NE. At $t = 0$, the iron concentration ($C(t) = 0$) and therefore (2) can be rewritten as:

$$S_0 = M_0 \sin(\alpha) e^{-TE \cdot R_{20}^*} \quad (3)$$

where $R_{2(0)}^*$ is the original relaxation rate. Therefore, the normalized signal of each new dynamic (S_{norm}) is equal to:

$$S_{\text{norm}}(t) = \frac{S(t)}{S(0)} = e^{-TE \cdot r_2^* C(t)} \quad (4)$$

and the iron concentration can be estimated over time as:

$$C(t) = \frac{-\ln(S_{\text{norm}}(t))}{TE \cdot r_2^*} \quad (5)$$

In vivo, the majority of injected nanoparticles such as NE is cleared from the bloodstream by different organs such as the liver, the spleen, and the bone marrow. In this study, the liver was considered to be the principal way of clearance of the NE and therefore to reflect directly the blood clearance. In order to gain access to this apparent blood half-life, we assumed that the iron concentration will change over time as:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \tau (C_{\text{max}} - C(t)) \quad (6)$$

where C_{max} is the maximal iron concentration estimated from the injection of NE with no surface functionalization and τ the rate of the accumulation. Therefore, the rate of clearance, τ , was estimated from a Marquardt-Levenberg fit of the $C(t)$ using the solution of the first-order differential equation (7).

$$C(t) = C_{\text{max}}(1 - e^{-t\tau}) \quad (7)$$

Finally, the apparent blood Half-life was defined as:

$$t_{1/2} = \ln(2)/\tau \quad (8)$$

In vivo atheroma R_2^* maps

Atheroma plaque NE labeling assays were performed on five female ApoE^{-/-} mice. Tail vein injections of either antibody conjugated formulation (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3) or ungrafted control (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide), at 53.7 $\mu\text{mol}(\text{Fe}).\text{Kg}^{-1}$ bodyweight, were performed on 3 and 2 mice, respectively. MRI acquisitions were achieved before and 24 hours post-injection. For one mouse, an extra R_2^* mapping was performed 6 hours post-injection and a long-term blood half-life estimation was performed, in that case, based on the FLASH sequence described in the dynamic study. R_2^* maps were computed from a multi-echo radiofrequency (RF)-spoiled gradient echo sequence (ME-SPGR). For the R_2^* mapping, the isoflurane rate was adjusted over time in order to maintain the monitored respiration rate between 40 and 60 bpm. A total of 10 transversal slices passing through the aorta at the thoraco-abdominal region was acquired. Relaxation rate maps were computed using an homemade Matlab-based software from a multi-slice MGE sequences (TR $\approx 1000 \pm 100$ ms, first echo time TE = 3.5 ms, $\Delta\text{TE} = 4.5$ ms, 15 echoes, $\alpha = 60^\circ$, NEx = 8, resolution = 0.1 x 0.1 x 1 mm) with a 256 \times 192 matrix and a FOV = 25.6 \times 19.2 mm. The R_2^* maps were segmented at the aorta level to include only voxels corresponding to the plaque using the 3rd echo image (TE = 12.5 ms) and mean R_2^* values were computed for each slice.

In Vitro Immunoreactivity Analysis by immunohistochemistry

The immunoreactivity analysis was performed by immunohistochemistry (IHC) assays on mouse and human atheromatous aorta paraffin-embedded sections. Human biopsies were provided by the vascular and general surgery service of the CHU Pellegrin. Samples were harvested from patients having undergone an endarterectomy surgery after an acute vascular event. All of the clinical interventions took place at CHU Pellegrin Hospital (Bordeaux, France)

and had been approved by the CPP committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer) of Bordeaux and from the Research Ministry in France (Authorization number DC-2016-2724). The CPP committee waived the need for patient written consent because surgical waste no longer attached to the person is considered *res nullius*. Patients were informed by the clinicians; if they did not express their opposition to research, the de-identified samples were immediately processed and embedded in paraffin. IHC experiments were performed as previously described³¹. Briefly, immunoreactivity of ScFv-Fc-2Cys P3 antibodies and NE conjugated antibody (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3) was evaluated on paraffin-embedded mouse/human atheromatous aorta sections embedded in paraffin. After deparaffinization, heat-induced epitope retrieval was performed, and non-specific interactions were blocked as recently described³⁴. Aorta sections were incubated overnight with NE conjugated antibodies (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3, 53 µg/mL of P3 antibody, 158 mg/L Fe), ungrafted nanoemulsion (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide, 158 mg/L Fe), secondary HRP-conjugated goat anti-human (Fcγ specific) antibody (Jackson Immunorearch, USA, 1:1000 (v/v)) was used as a negative control and ScFv-Fc-2Cys P3 antibody (53 µg/L) as a positive control. All conditions were revealed with the secondary HRP-conjugated goat anti-human (Fcγ specific) antibody.

RESULTS

PEGylated NE formulation and characterization

NE composition is shown in **table 1**, formulations were made from Miglyol® 840, a pharmaceutical neutral oil based on propylene glycol diether of C8 and C10 saturated plant fatty acid. Two surfactants were used to stabilize the oily droplet, tween® 80 and lipoid® E80. Formulations were loaded with maghemite-based SPIO to develop T₂* shortening MR contrast agents with relaxivities close to the gold standard as previously described²⁰ ($r_2^* = 42$ to $45 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $r_1 < 0.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Table 14: NE composition

	NE	NE- PEG ₂₀₀₀	NE- PEG ₃₄₀₀ - Maleimide	NE- PEG _{2000/3400} - Maleimide	NE-PEG ₃₄₀₀ - Maleimide-P3
Miglyol® 840 (%)	20	20	20	20	20
Tween® 80 (%)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Lipoid® 80 (%)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Milli-Q water (%)	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100
SPIO (µmol/ml)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Lipid-PEG₂₀₀₀ (µmol/ml)	-	5	-	3.8	-
Lipid-PEG₃₄₀₀- Maleimide (µmol/ml)	-	-	5	1.2	5
P3 antibody (nmol/ml)	-	-	-	-	1.9

NE: nanoemulsion; SPIO: superparamagnetic iron oxide nanoparticles;

In order to develop stealth NE with a limited hepatic uptake and therefore an increased blood half-life, droplets surface was PEGylated. PEG create a hydrophilic and biocompatible layer limiting absorption of opsonin proteins^{35, 36} and non-specific cellular uptake compared to

unmodified carriers. Several therapeutic strategies using PEG have been approved by the FDA²². In this study, two lipid-PEG differing in molecular weight and functionalization were used: DSPE-PEG₂₀₀₀ and DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide. They were added at the same molar concentration in the oily phase before the phase inversion step (5 μmol/ml). Four formulations were carried out: NE with lipid-PEG₃₄₀₀-Maleimide only, with lipid-PEG₂₀₀₀ only or with a mixture of both lipid-PEG. Non-PEGylated NEs were used as controls.

Maleimide function on lipid-PEG₃₄₀₀ allowed the grafting of the antibody. PEG covering at the surface of droplets was found to increase the hydrodynamic diameter of the formulations from 175.8 for the non-PEGylated NE to 190.9, 197.2 and 191.0 nm, for the NE PEGylated with lipid-PEG₂₀₀₀, lipid-PEG₃₄₀₀-Maleimide or the mixture of both lipids-PEG, respectively. All formulations remained submicronic and monodisperse with a polydispersity index (PdI) below 0.2 (**table 2**). Thus, the formulation diameter remained smaller than the tiniest blood vessel preventing embolisms³⁷. Also, the lipid nature associated with the plasticity of the NE is interesting for deeper tissue penetration and enhanced crossing of biological barrier³⁸.

Table 15: NE physicochemical studies

	NE	NE- PEG ₂₀₀₀	NE- PEG ₃₄₀₀ - Maleimide	NE- PEG _{2000/3400} - Maleimide	NE- PEG ₃₄₀₀ - Maleimide- P3
Mean					
diameter	175.8 ± 1.0	190.9 ± 2.2	197.2 ± 4.6	191.0 ± 2.4	199.5 ± 2.3
(nm)					
PdI	0.108	0.134	0.115	0.097	0.167

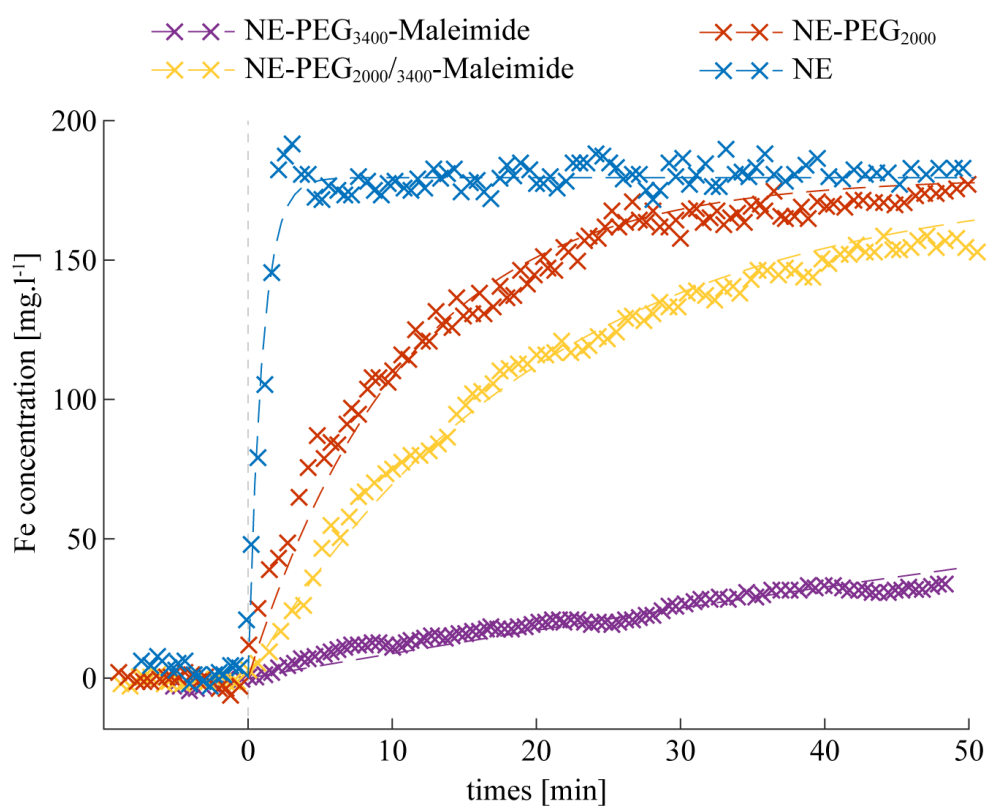
Blood Half					
time (min)	>1	7.2 ± 3.4	14.1 ± 2.5	138.7 ± 11.2	103

PdI: polydispersity index

The inclusion of SPIOs inside the oily droplets was confirmed by TEM imaging (supplementary figure). Additionally, nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed for both sizing and counting submicron particles. The size distribution was found to be consistent with DLS analysis and the droplets counting was determined at $5.75 \cdot 10^{13} \pm 3.66 \cdot 10^{12}$ droplets per ml. To our knowledge, this is the first-time oily droplets numbers were determined in order to control the theoretical ratio of antibody grafted by NE.

Furtivity of PEGylated NE

Among several promising new drug-delivery systems, NE represents an advanced technology to carry molecules to a specific site, and at present several formulations are in clinical use³⁹⁻⁴². In this study, the stealth behavior of three NE PEGylated formulations and a non-PEGylated NE (used as control) was studied by dynamic MRI after injection at the same iron concentration (3 mg/kg body weight) in the tail vein of C57BL/6 mice. Liver uptake follows up was performed continuously by MRI about 10 minutes prior to the injections and up to 50 minutes after (**figure**



1).

Figure 71: Estimation of the *in vivo* iron liver uptake measured by dynamic MRI of NE in function of their PEGylation. Non-PEGylated NEs are rapidly cleared from the blood. NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide displays the stealthiest properties with a very low liver accumulation over 50 min. Surface modification with PEG₂₀₀₀ and with a mixture of PEG₂₀₀₀ / PEG₃₄₀₀-Maleimide displayed a similar profile corresponding to relatively rapid clearance. Each NE half-life was estimated from their corresponding fit (dashed lines, see **Table 2**).

Depending on the lipid-PEG molecular weight, formulations display variations in liver uptake. After injection, the non-PEGylated formulation (NE) is rapidly captured by the liver and saturates the signal 2 minutes after injection, confirming the low stealth of non-PEGylated NE. Such rapid clearance of the NEs is consistent with the literature data, typically up to 90% of the formulation is taken up by the liver within 5 minutes³⁷. The formulations grafted with lipid-PEG₂₀₀₀ or the mixture of the two PEGs have similar capture profiles with rapid uptake after injection and then a break in slope. NE functionalized with lipid-PEG₃₄₀₀-Maleimide have the lowest hepatic uptake and therefore increased stealthiness. NE decorated with DSPE-PEG₃₄₀₀-Maleimide showed a reduced liver uptake, even after 50 minutes post injection and a prolonged blood circulation time. Oppositely, the MR signal measured at the kidney level remained stable all along the *in vivo* experiments independently of the formulations tested. The ScFv-Fc-2Cys P3 antibody grafting was done on the stealthiest formulation.

In vivo atheroma plaque targeting

Antibody grafting at NE surface induced an increase of the NE formulation diameter, as assessed by DLS (**table 2**). This increase of the droplet size following functionalization with antibodies was previously observed²⁰. Formulations remained monodispersed and submicronic with a diameter similar to the commercial NE used for human parenteral nutrition³⁷. The NE-PEG₃₄₀₀₀-Maleimide-P3 formulation was administered to an ApoE^{-/-} mouse and the liver uptake was followed over 24 hours in order to ensure that the presence of biological molecules on the surface of the NE does not compromise their stealth properties (**figure 2**). A half-life of 103 min was measured.

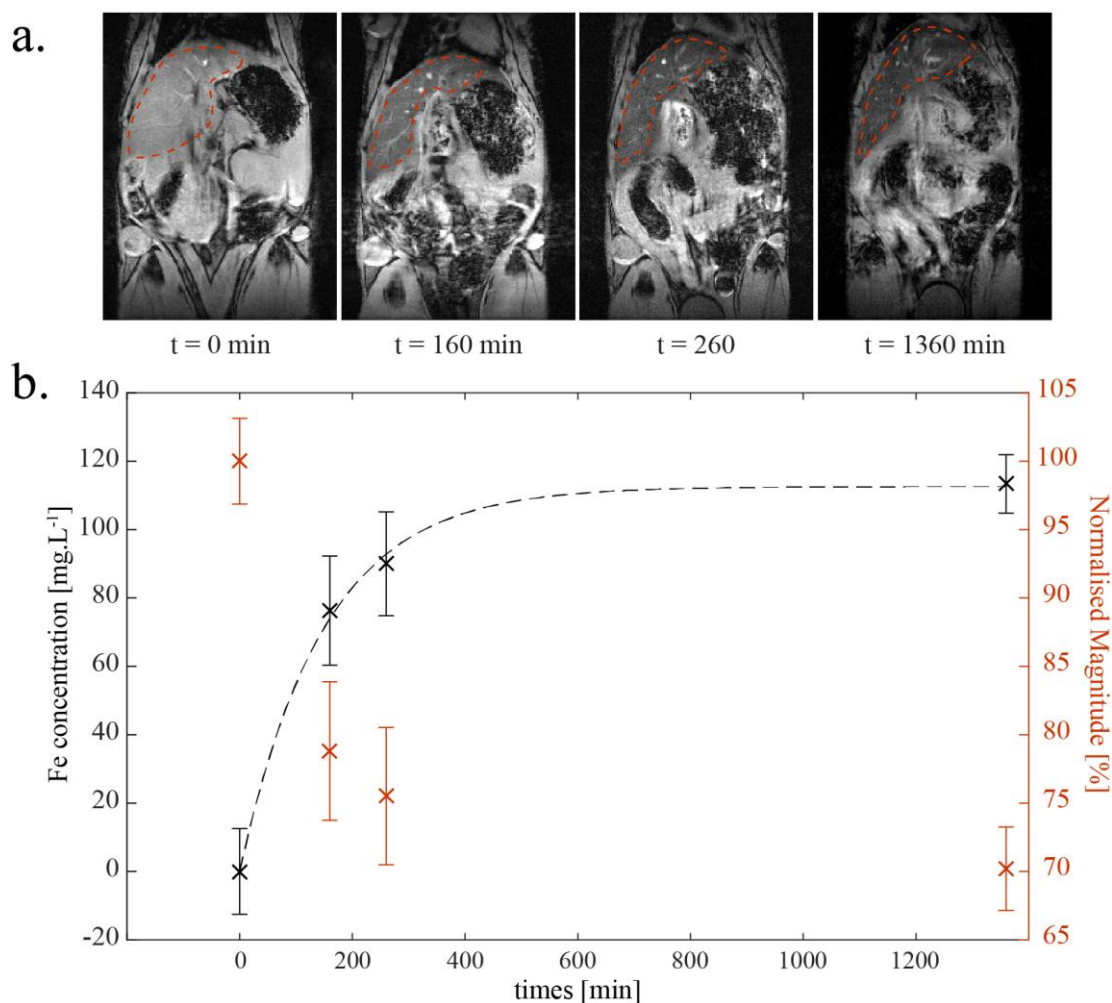


Figure 72: Long term MRI estimation of the blood half-life of NE-PEG₃₄₀₀₀-Maleimide-P3 determined by MRI. (a): MR images measured over time with the ROIs (red dashed line) encompassing the liver used to measure a mean magnitude signal. (b): Mean normalized magnitude signal (red) measured and its corresponding iron concentration (black) estimated from the longitudinal relaxivity r_2^* of the NE. The grafting of biological moieties (ScFv-Fc-2Cys P3 human antibody) at NE surface was found to decrease the NE blood half-life from 138 min to 103 min (calculated from the fit of the iron concentration, dashed line).

In parallel of the 24 hours liver follow up, *in vivo* plaque labeling was assessed at 6- and 24-hours post-injection by R_2^* relaxation mapping (**figure 3, a**). Before injection, a mean R_2^*

value of $47 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ was measured at the plaque aorta level. Six hours after injection, the mean plaque R_2^* increased to $61 \pm 6 \text{ s}^{-1}$ and up to $71 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ after 24 hours (**figure 3, b**). Two others ApoE^{-/-} mice were injected with the same formulations and two others with non-targeted contrast agents (NE-PEG₃₄₀₀₀-Maleimide). The mean R_2^* of all slices was found to increase by 41% with a p value <0.001 while no statistically significant change was observed 24 hours after the injection of the non-targeted ones (**figure 3, c**). Note that the R_2^* measures of slices in each mouse were considered to be independent since the plaque characteristics (e.g. size, permeability, components) can change all along the aorta.

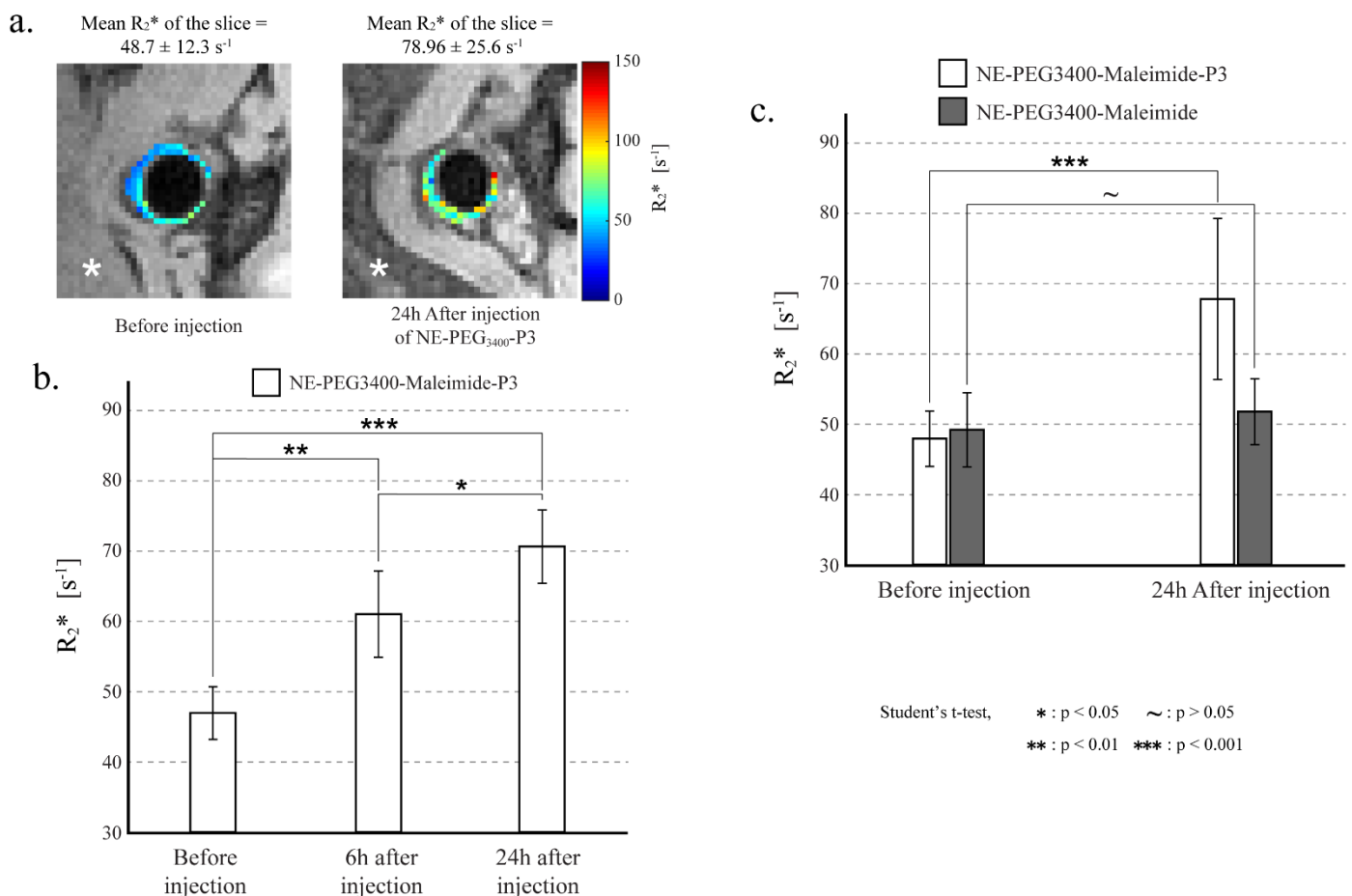


Figure 73 : *In vivo* atheroma R_2^* variations after the injection of either NE-SPIO-PEG₃₄₀₀-P3 or NE-SPIO-PEG₃₄₀₀Mal. (a): Typical segmented R_2^* maps obtained before and after the injection of the targeting NE-SPIO- PEG₃₄₀₀-P3. (b): Mean R_2^* measure on one ApoE^{-/-} mouse

before, 6 hours and 24 hours after the injection of NE-SPIO-PEG₃₄₀₀-P3. (c): Comparison of the mean R_2^* measured before and after (24h) the injection of NE-SPIO-PEG₃₄₀₀-P3 or NE-SPIO-PEG₃₄₀₀Mal on N=3 (23 measurements) and N= 2 mice (13 measurements), respectively.

In vitro atheroma plaque targeting

The ability of NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 to specifically target atheromatous plaques from arterial sections of hypercholesterolemic mice and human samples were performed by IHC experiments (**figure 4**). First of all, we were interested in verifying that ScFv-Fc-2Cys P3 antibody grafted to formulation maintained its immunoreactivity on mouse aorta sections. A specific binding on these atherosclerotic sections was obtained after incubation with the biofunctionalized formulation NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 (**figure 4A.b**) whereas incubation with the ungrafted formulation (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide) did not show any specific staining (**figure 4A.d**). Free ScFv-Fc-2Cys P3 antibody served as a positive control (**figure 4A.a**) versus secondary antibody only (**figure 4A.c**).

The same formulations were tested on human aorta sections in order to further propose this new contrast agent in translational approaches (**figure 4B**). As underlined in **figure 4B.b**, atheroma plaques issuing from endarterectomy samples were nicely labeled with the targeted formulation (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3) in contrast to the untargeted formulation (NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide) where only a faint staining was observed (**figure 4B.d**) mostly due to human immunoglobulins remaining in atheroma plaques. As for mice samples, free ScFv-Fc-2Cys P3 antibody was included as a positive control (**figure 4B.a**).

Therefore, NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 allowed an efficient molecular targeting of atheroma both on mice aorta and human endarterectomy sections.

These results underline the potential of NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 as a new molecular contrast agent to target atherosclerosis via the labeling of galectin-3 protein.

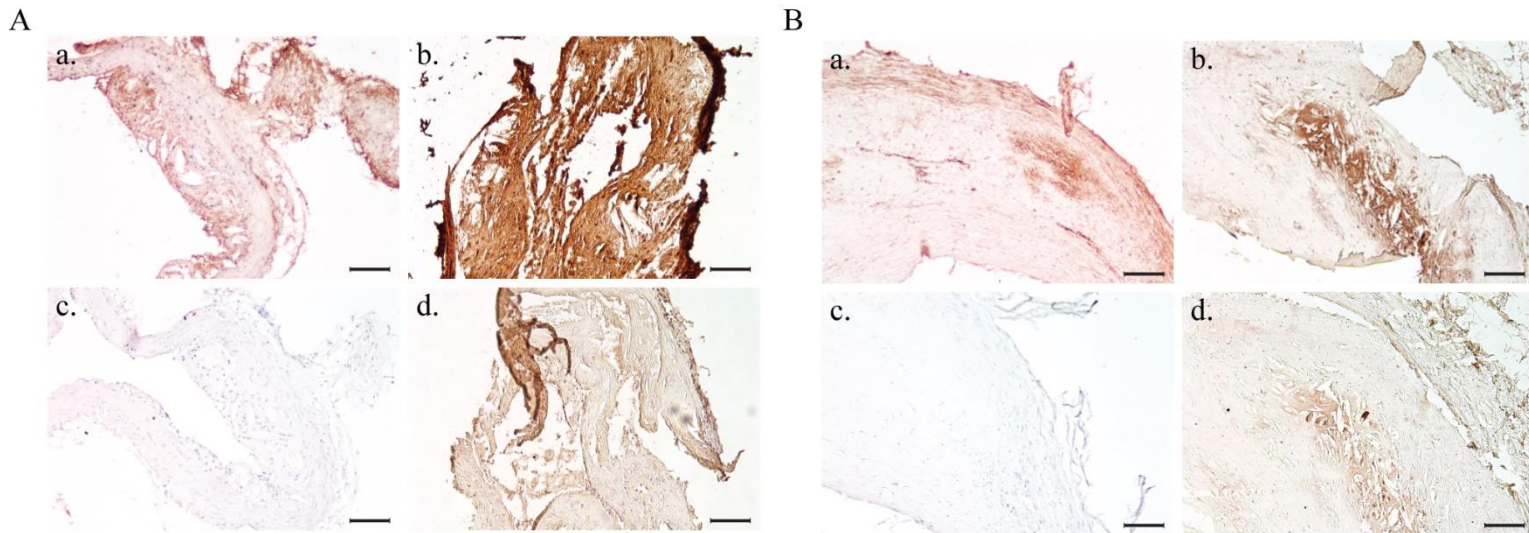


Figure 74: IHC labeling of aorta from mouse (A) and human endarterectomy (B) sections. ScFv-Fc-2Cys P3 conjugated NE were able to label aorta sections from mouse (A.b) and human samples (B.b) similarly to free ScFv-Fc-2Cys P3 antibody (A.a and B.a) while both ungrafted NE (A.d and B.d) and controls (secondary antibody only: A.c and B.c) remained unstained. Scale bar: 250 μ m (up) 100 μ m (down).

DISCUSSION

Cardiovascular complications caused by atherosclerosis are still the leading cause of death in western countries. Thus, early detection of vulnerable atheroma plaques is primordial to prevent these dramatic cardiovascular events. In this context, nanotechnology associated with molecular imaging has emerged as a promising tool to detect unstable plaques in a non-invasive way. Because of their high magnetic susceptibility and nanometric size, SPIOs have been extensively investigated as MRI contrast agent⁵. Despite these advantages, the SPIO must be loaded into a nanocarrier to improve biocompatibility and blood circulation half time. In this work, SPIO made hydrophobic with oleic acid coating were loaded inside the oily core of NE functionalized with targeting ligands to achieve specific atheroma plaque labeling. When using

classical iron oxide-based contrast agents, MR signal changes observed during their accumulation in tissues are weighted both by R_2^* and R_1 effects. In the particular environment of oily droplets, SPIO do not have any access to the water and therefore mainly affect the local R_2^* relaxation rate (and not the R_1). We took advantage of the “pure” R_2^* increasing effect obtained in oily droplets to estimate the blood half-life of each tested NE.

NE have been in medical use for over 5 decades as parenteral nutrition system to supply patients, which cannot be fed orally (e.g. Intralipid, approved in Europe in 1962)³⁷. The huge potential of NE as drug delivery systems is currently untapped despite the advantages over other nanocarrier^{43, 44}. To target atheroma with NE, an extension of blood circulation time is required. PEGylation is the most commonly used mechanism and refers to the coverage of droplets surface with PEG chain to delay the opsonization process. PEG has the advantages to be FDA approved, soluble in hydrophilic and hydrophobic phases, non-toxic and non-immunogenic⁴⁵. PEG has also the advantage to be available in different molecular weights. For longtime circulation, the molecular weight of the PEG chain must be 2000 or above^{43, 46-48}.

To our knowledge, only a few studies were carried out on the optimization of PEGylated NEs to prolong their blood circulation time^{27, 49, 50}. Cheng *and al.* studied how different molecular weights, as well as different concentrations of lipid-PEG, affect the size of the NE. However, they did not address their pharmacokinetic profiles⁵⁰. Hak *and al.* studied the influence on lipid-PEG₂₀₀₀ density on NE pharmacokinetics assessed by fluorescence of animal serum. In all these studies, pharmacokinetic of NE were assessed by blood sample collection, while our approach relies on an *in vivo* determination of the liver uptake by MRI. In this study, the kinetics of four NE formulations were compared. Nanoemulsions mean diameters tend to increase with the increase of the PEG molecular weight confirming the brush-like conformation of PEG whereas mushroom-like conformation is known to result in a decrease of NE diameter⁴⁹⁻⁵¹. MRI kinetics represent a powerful tool to rapidly follow through time, in a longitudinal manner, the stealth

properties of nanocarrier in contrast to classical methodologies relying on blood collection of samples at defined time points.

A highly improved blood circulation time was highlighted with the MRI kinetic approach for NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide. Stealth properties are important to extend the circulation time and, in this way, improve efficacy of targeting. To develop an optimized tool for molecular imaging of atherosclerosis, an atheroma specific contrast agent, ScFv-Fc-2Cys P3 antibody, was chosen for conjugation to the NE formulation presenting the best furtivity, namely NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide. The selected human antibody specifically targets galectin 3, a protein highlighted in recent studies as a new biomarker of atherosclerosis⁵². P3 human antibody was discovered following an *in vivo* phage-display selection in an animal model of atherosclerosis using a human scFv library^{34, 53}. Its ability to target galectin 3 within atherosclerotic lesions was demonstrated *in vitro* and *ex vivo* (patent PCT/EP2018/077131). P3 variable domains were engineered under the scFv-Fc format with a 2Cys tag in order to proceed to site-specific conjugation to NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide using Thiol–Maleimide “click” chemistry. Site-specific conjugation has main advantages, among other those of a maintained bioreactivity and a grafting taking advantage of the Fc fragment. A theoretical ratio of 14 antibodies per droplet was chosen to have enough antibodies per droplet allowing efficient molecular targeting, without denaturing the system. Indeed, previous works carried out on SPIO nanoparticles showed that a too high a ratio caused the flocculation of the objects. The MRI results confirm the active targeting of NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3 allowing a significant atheroma labeling *in vivo* compared to untargeted nanosystems based on macrophages uptake and passive accumulation inside atheroma plaque^{54, 55}.

Compared with other synthetic nanocarriers like SPIO or USPIO (ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles) which are rigid objects, the soft consistency of oily droplets makes that they could efficiently cross through the vascular fenestrae of the impaired endothelium and

penetrate into targeted lesions, even with a size over 25 nm. Other teams have demonstrated that lipid-based formulations up to 200 nm in diameter were able to enter the plaque⁵⁶.

In this work, IHC experiments showed that scFv-Fc-2Cys P3 is able to recognize galectin-3 both in the ApoE^{-/-} animal model and in human atheroma. Considering this finding, it should be pointed out that ligands used in the more recent studies for functionalizing nanoparticles, micelles or liposomes tend to be non-immunogenic ligands presenting cross-reactivity among different species, including humans⁵⁷⁻⁵⁹. It is of note that this later point could facilitate the translational process from pre-clinical to clinical studies. Additionally, if the developed diagnostic agents were to reach the clinics, the use of human antibodies should limit the risk of immunogenicity, saving the time that would be required for humanization of murine antibodies.

As a conclusion, human antibodies represent a class of ligands that will be theoretically safer to translate clinically. The same holds for NE formulations, considering both their proved biocompatibility and their easy dissemination through the biological barriers.

It is to be highlighted that a more personalized approach to therapies fighting against this pathology might be guided by molecular imaging. It is expected that improvement in efficient *in vivo* targeting of over-expressed proteins such as galectin-3 may likewise prompt better assessment and monitoring of atherosclerosis.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information.

The following files are available free of charge.

Example of the correction (Video S1)

Transmission electron microscopy image of SPIO loaded nanoemulsion

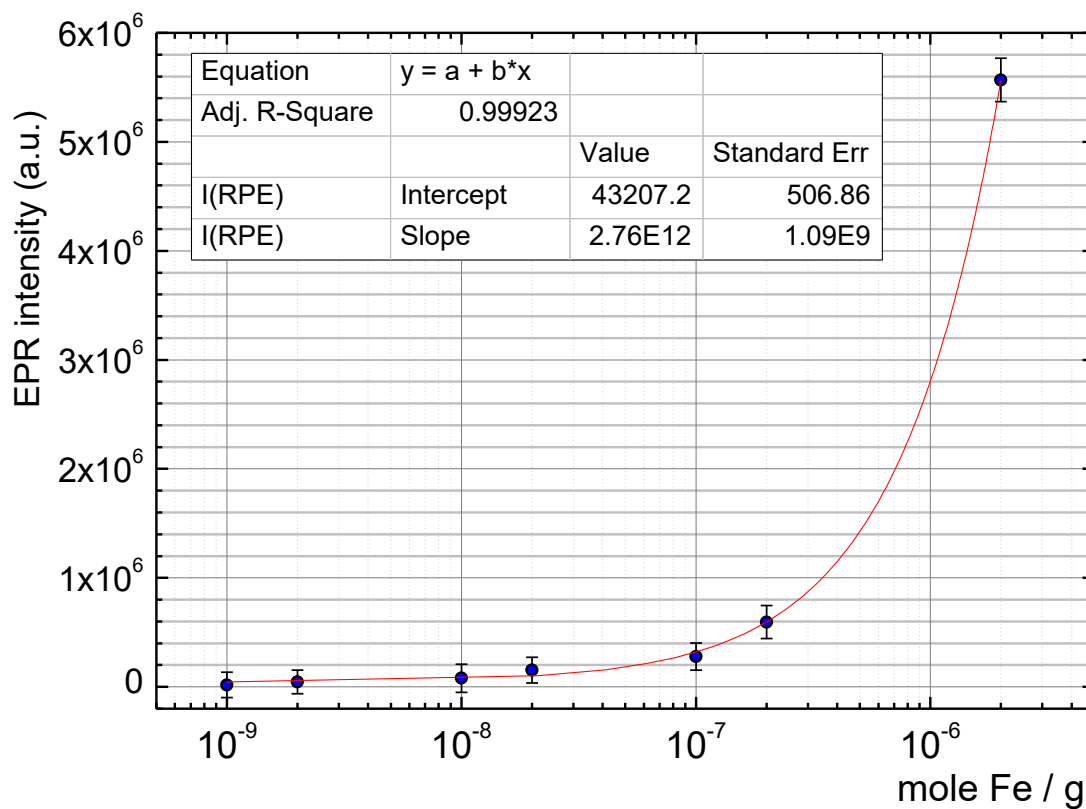
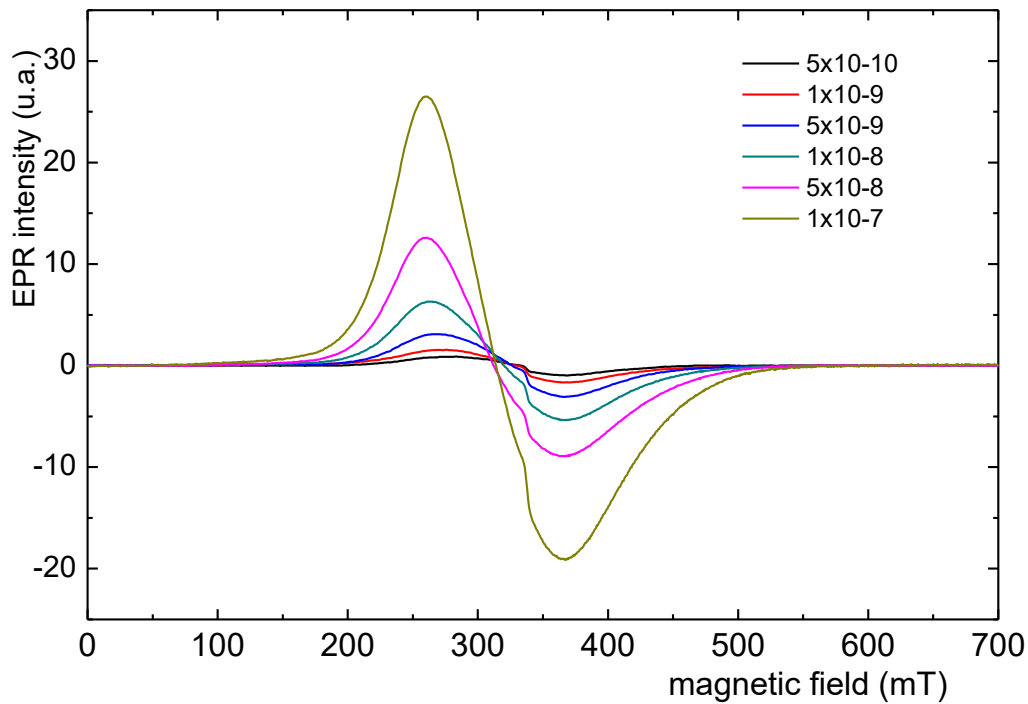
Les valeurs de R2* avant et après injection des NE-PEG-mal et NE-scFv sont représentées pour chaque souris et chaque coupe dans le tableau ci-dessous. Ces résultats préliminaires seront prochainement retraités avec la méthode de post-traitement développée au cours de ma thèse.

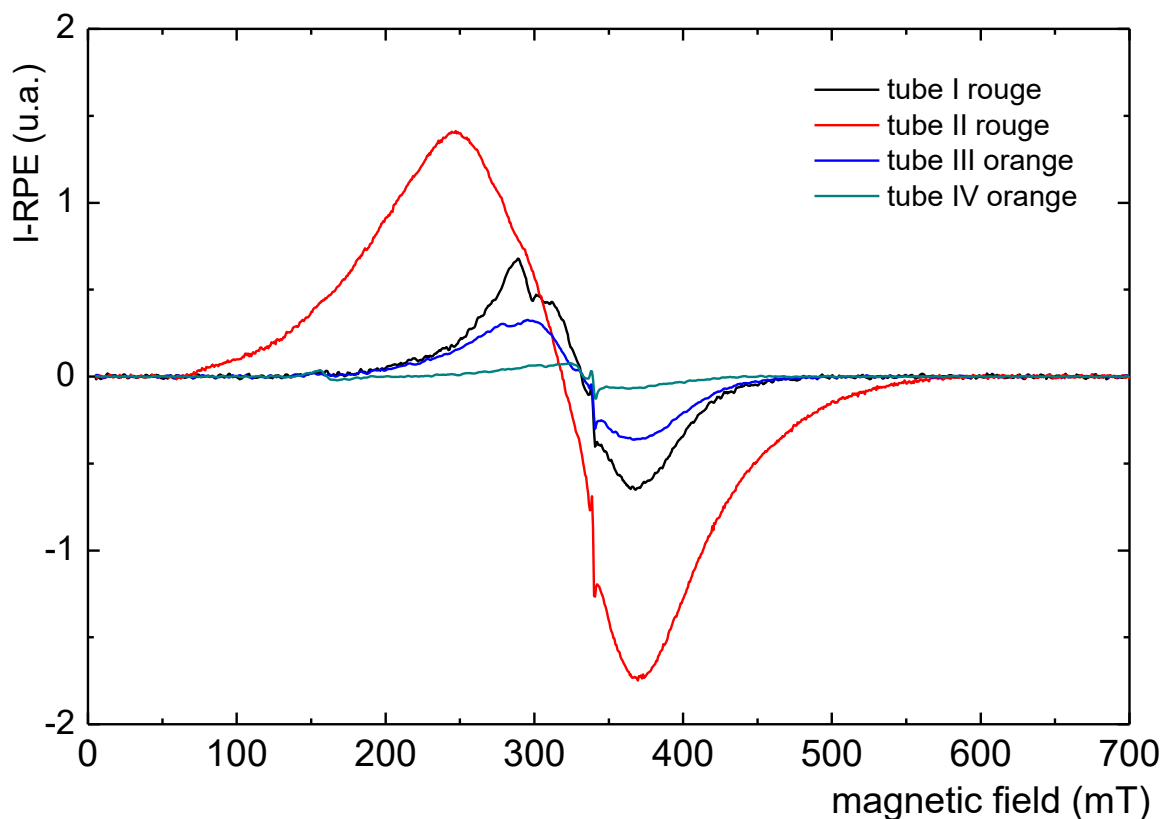
index	Mice	R2* before inj	R2* after 6h	R2* at 24h	Particles
1	Apo E 117	45,82	62,01	70,39	NE Scfv C31
2	Apo E 117	41,78	53,87	77,03	NE Scfv C31
3	Apo E 117	49,72	60,39	70,99	NE Scfv C31
4	Apo E 117	47,32	63,30	75,84	NE Scfv C31
5	Apo E 117	52,68	71,42	67,78	NE Scfv C31
6	Apo E 117	44,48	55,66	62,42	NE Scfv C31
7	Apo E 122	44,96		66,73	NE Scfv C31
8	Apo E 122	46,23		59,55	NE Scfv C31
9	Apo E 122	48,70		84,95	NE Scfv C31
10	Apo E 122	50,34		69,67	NE Scfv C31
11	Apo E 122	52,89		95,45	NE Scfv C31
12	Apo E 122	47,68		74,44	NE Scfv C31
13	Apo E 122	53,89		52,54	NE Scfv C31
14	Apo E 122	45,35		81,20	NE Scfv C31
15	Apo E 118	44,60		52,49	NE Scfv C31
16	Apo E 118	42,01		52,21	NE Scfv C31
17	Apo E 118	43,27		60,42	NE Scfv C31
18	Apo E 118	48,61		62,89	NE Scfv C31
19	Apo E 118	48,87		57,53	NE Scfv C31
20	Apo E 118	46,62		52,08	NE Scfv C31
21	Apo E 118	52,35		58,13	NE Scfv C31
22	Apo E 118	40,81		64,93	NE Scfv C31
23	Apo E 118	54,05		80,64	NE Scfv C31
9	Apo E 119	56,75		42,96	NE PEG-Mal
10	Apo E 119	47,12		55,76	NE PEG-Mal
11	Apo E 119	46,16		54,01	NE PEG-Mal
12	Apo E 119	43,72		49,49	NE PEG-Mal
13	Apo E 119	42,31		55,74	NE PEG-Mal
14	Apo E 119	42,61		48,66	NE PEG-Mal
15	Apo E 119	49,45		56,19	NE PEG-Mal
16	Apo E 120	49,74		49,02	NE PEG-Mal
17	Apo E 120	47,42		48,92	NE PEG-Mal
18	Apo E 120	43,50		56,19	NE PEG-Mal
19	Apo E 120	55,39		42,72	NE PEG-Mal
20	Apo E 120	56,88		52,00	NE PEG-Mal
21	Apo E 120	54,10		55,38	NE PEG-Mal

Les aortes de quatre souris ApoE^{-/-} ont été analysées par RPE avec l'aide de Matthieu Dutine (ICMCB). Deux souris ont été injectées avec des NE fonctionnalisées. Deux autres souris ont été injectées avec des NE non fonctionnalisées.

Spectromètre	<u>Bruker ESP300E</u>
Température	293 K
Fréquence des micro-ondes	9,54 GHz (X-band)
Puissance des micro-ondes	20 mW
Fréquence de la modulation en champ magnétique	100 kHz
Amplitude de la modulation en champ magnétique	1 <u>mT</u>
Fenêtres spectrales analysées (en champ magnétique)	0 - 700 <u>mT</u>
Résolution spectrale (1 spectre = 1024 pts)	0.7 <u>mT/pt</u>
Temps de mesure / point	82 ms

Les échantillons ont été analysés sous forme de morceaux « déshydratés » (entre 8 et 30 mg / tube) et le spectromètre calibré (en champ magnétique) à l'aide d'un échantillon référence de DPPH (g=2,0036). Les spectres présentés sont normalisés par rapport à la masse de l'échantillon et au nombre de scans accumulés [les autres paramètres expérimentaux pouvant influencer l'intensité des signaux observés (gain, puissance des micro-ondes, amplitude de la modulation en champ magnétique *etc.*) étant identiques pour tous les spectres].





Commentaire:

- La forme particulière des spectres est due à une orientation particulière des particules (présentes dans les morceaux d'aorte) dans le champ magnétique contrairement aux échantillons de la gamme où les particules sont réparties de façon homogène dans la poudre (KBr).
- Pour l'échantillon I (fonctionnalisé), on observe un signal supplémentaire à un champ d'environ 300 mT dont l'origine est difficile à déterminer mais qui ne peut pas être associé aux particules magnétiques.
- De même pour l'échantillon IV (non fonctionnalisé), un signal (de très faible intensité) à 160 mT ($g=4.3$) est détecté et correspond à des ions Fe^{3+} . De plus, le signal large et peu intense centré à environ 340 mT ($g=2.0$) peut avoir des origines multiples et variées. La quantification ci-dessous est donc plus qu'aléatoire et peu fiable.

- Enfin, pour tous les échantillons on remarque la présence d'un signal très fin centré à 340 mT qui peut être associé à la présence de radicaux organiques (très certainement créés lors du séchage des aortes).

Échantillon	I(RPE) norm. / g	mole de Fe / g	incertitude
I (Fonctionnalisées)	8.68×10^4	1.58×10^{-8}	5×10^{-10}
II (Fonctionnalisées)	5.77×10^5	1.93×10^{-7}	2.3×10^{-9}
III (Non fonctionnalisées)	5.64×10^4	4.79×10^{-9}	1×10^{-10}
IV (Non fonctionnalisées)	6.72×10^3	$< 5 \times 10^{-10}$	-

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Corresponding author at: CNRS, UMR5536, CRMSB, Centre de Résonance Magnétique des systèmes Biologiques, Université Bordeaux, Bordeaux, France. E-mail address: gisele.clofent-sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr

Present Addresses

†Geoffrey Prévot, Institut des Maladies Neurodégénératives, Université de Bordeaux, CNRS UMR 5293 - Case 28, Centre Broca Nouvelle-Aquitaine. 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex France

Author Contributions

GCS, SCM, MDC and MBD supervised the project. GCS, SCM, CL, SB and GP designed experiments. CL, GP and MJJV wrote the draft of manuscript. CL, GP, SB, AH and MJJV performed the experiments. GCS, SCM, SB, GP and CL edited and revised the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally.

Notes

The author reports no conflicts of interest in this work. All authors have approved the final article.

ACKNOWLEDGMENT

This study was achieved within the context of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57 and LabEx MAbImprove: ANR-10-LABX-53. Public grant from SVSE5 program, named ATHERANOS supported this work. Geoffrey Prévot is a recipient of a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Education Research and Technology.

ABBREVIATIONS

(O/W), oil-in-water; NE, Nanoemulsion; SPIO, superparamagnetic iron oxide nanoparticles; PEG, polyethylene glycol; NE-PEG₃₄₀₀-Maleimide-P3, P3 antibody conjugated NE; IVUS, intravascular ultrasound; OCT, optical coherence tomography; MRI, Magnetic Resonance imaging

REFERENCES

1. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, (6801), 233-41.
2. Rudd, J. H.; Davies, J. R.; Weissberg, P. L. Imaging of atherosclerosis -- can we predict plaque rupture? *Trends Cardiovasc Med* **2005**, *15*, (1), 17-24.
3. Virmani, R.; Burke, A. P.; Farb, A.; Kolodgie, F. D. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* **2002**, *44*, (5), 349-56.
4. Cuadrado, I.; Saura, M.; Castejon, B.; Martin, A. M.; Herruzo, I.; Balatsos, N.; Zamorano, J. L.; Zaragoza, C. Preclinical models of atherosclerosis. The future of Hybrid PET/MR technology for the early detection of vulnerable plaque. *Expert Rev Mol Med* **2016**, *18*, e6.
5. Montiel Schneider, M. G.; Lassalle, V. L. Magnetic iron oxide nanoparticles as novel and efficient tools for atherosclerosis diagnosis. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *93*, 1098-1115.
6. Mehta, A. B.; Shah, S. Unstable or High Risk Plaque: How Do We Approach It? *Med J Armed Forces India* **2006**, *62*, (1), 2-7.
7. Kashyap, V. S.; Pavkov, M. L.; Bishop, P. D.; Nassoiy, S. P.; Eagleton, M. J.; Clair, D. G.; Ouriel, K. Angiography underestimates peripheral atherosclerosis: lumenography revisited. *J Endovasc Ther* **2008**, *15*, (1), 117-25.
8. Little, W. C.; Constantinescu, M.; Applegate, R. J.; Kutcher, M. A.; Burrows, M. T.; Kahl, F. R.; Santamore, W. P. Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease? *Circulation* **1988**, *78*, (5 Pt 1), 1157-66.
9. Mann, J. M.; Davies, M. J. Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* **1996**, *94*, (5), 928-31.
10. Osborn, E. A.; Jaffer, F. A. Imaging atherosclerosis and risk of plaque rupture. *Curr Atheroscler Rep* **2013**, *15*, (10), 359.
11. Rathod, K. S.; Hamshere, S. M.; Jones, D. A.; Mathur, A. Intravascular Ultrasound Versus Optical Coherence Tomography for Coronary Artery Imaging - Apples and Oranges? *Interv. Cardiol.* **2015**, *10*, (1), 8-15.
12. Tarkin, J. M.; Dweck, M. R.; Evans, N. R.; Takx, R. A.; Brown, A. J.; Tawakol, A.; Fayad, Z. A.; Rudd, J. H. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res* **2016**, *118*, (4), 750-69.
13. Tearney, G. J.; Yabushita, H.; Houser, S. L.; Aretz, H. T.; Jang, I. K.; Schlerendorf, K. H.; Kauffman, C. R.; Shishkov, M.; Halpern, E. F.; Bouma, B. E. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation* **2003**, *107*, (1), 113-9.
14. Mulder, W. J.; Jaffer, F. A.; Fayad, Z. A.; Nahrendorf, M. Imaging and nanomedicine in inflammatory atherosclerosis. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, (239), 239sr1.

15. Li, Y.; Liu, J.; Huang, J. W.; Song, J. C.; Ma, Z. L.; Shi, H. B. In vivo MRI detection of atherosclerosis in ApoE-deficient mice by using tenascin-C-targeted USPIO. *Acta Radiol.* **2018**, *59*, (12), 1431-1437.
16. Corti, R.; Fuster, V. Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, (14), 1709-19b.
17. Poon, C.; Gallo, J.; Joo, J.; Chang, T.; Banobre-Lopez, M.; Chung, E. J. Hybrid, metal oxide-peptide amphiphile micelles for molecular magnetic resonance imaging of atherosclerosis. *J Nanobiotechnology* **2018**, *16*, (1), 92.
18. Pellico, J.; Ruiz-Cabello, J.; Herranz, F. Microwave-driven Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles for Fast Detection of Atherosclerosis. *J. Vis. Exp.* **2016**, (109).
19. Herranz, F.; Salinas, B.; Groult, H.; Pellico, J.; Lechuga-Vieco, A. V.; Bhavesh, R.; Ruiz-Cabello, J. Superparamagnetic Nanoparticles for Atherosclerosis Imaging. *Nanomaterials (Basel)* **2014**, *4*, (2), 408-438.
20. Prevot, G.; Kauss, T.; Lorenzato, C.; Gaubert, A.; Lariviere, M.; Baillet, J.; Laroche-Traineau, J.; Jacobin-Valat, M. J.; Adumeau, L.; Mornet, S.; Barthelemy, P.; Duonor-Cerutti, M.; Clofent-Sanchez, G.; Crauste-Manciet, S. Iron oxide core oil-in-water nanoemulsion as tracer for atherosclerosis MPI and MRI imaging. *Int J Pharm* **2017**, *532*, (2), 669-676.
21. Amoozgar, Z.; Yeo, Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, *4*, (2), 219-33.
22. Ryan, S. M.; Mantovani, G.; Wang, X.; Haddleton, D. M.; Brayden, D. J. Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, (4), 371-83.
23. Owens, D. E., 3rd; Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* **2006**, *307*, (1), 93-102.
24. Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *99*, (Pt A), 28-51.
25. Torchilin, V. P. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54*, (2), 235-52.
26. Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* **2011**, *6*, (4), 715-28.
27. Hak, S.; Garaiova, Z.; Olsen, L. T.; Nilsen, A. M.; de Lange Davies, C. The effects of oil-in-water nanoemulsion polyethylene glycol surface density on intracellular stability, pharmacokinetics, and biodistribution in tumor bearing mice. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, (4), 1475-85.
28. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *EEE Transactions on Magnetics* **1981**, *17*, (2), 1247-1248.
29. Prevot, G.; Mornet, S.; Lorenzato, C.; Kauss, T.; Adumeau, L.; Gaubert, A.; Baillet, J.; Barthelemy, P.; Clofent-Sanchez, G.; Crauste-Manciet, S. Data on iron oxide core oil-in-water nanoemulsions for atherosclerosis imaging. *Data Brief* **2017**, *15*, 876-881.

30. van Ewijk, G. A.; Vroege, G. J.; Philipse, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, (1), 31-33.
31. Prevot, G.; Duonor-Cerutti, M.; Lariviere, M.; Laroche-Traineau, J.; Jacobin-Valat, M. J.; Barthelemy, P.; Clofent-Sanchez, G.; Crauste-Manciet, S. Data on atherosclerosis specific antibody conjugation to nanoemulsions. *Data Brief* **2017**, *15*, 824-827.
32. Zachiu, C.; Denis de Senneville, B.; Moonen, C.; Ries, M. A framework for the correction of slow physiological drifts during MR-guided HIFU therapies: Proof of concept. *Med Phys* **2015**, *42*, (7), 4137-48.
33. Zachiu, C.; Papadakis, N.; Ries, M.; Moonen, C.; Denis de Senneville, B. An improved optical flow tracking technique for real-time MR-guided beam therapies in moving organs. *Phys Med Biol* **2015**, *60*, (23), 9003-29.
34. Hemadou, A.; Laroche-Traineau, J.; Antoine, S.; Mondon, P.; Fontayne, A.; Le Priol, Y.; Claverol, S.; Sanchez, S.; Cerutti, M.; Ottones, F.; Clofent-Sanchez, G.; Jacobin-Valat, M. J. An innovative flow cytometry method to screen human scFv-phages selected by in vivo phage-display in an animal model of atherosclerosis. *Sci Rep* **2018**, *8*, (1), 15016.
35. Abbina, S.; Parambath, A., 14 - PEGylation and its alternatives: A summary. In *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, Parambath, A., Ed. Woodhead Publishing: 2018; pp 363-376.
36. Schottler, S.; Becker, G.; Winzen, S.; Steinbach, T.; Mohr, K.; Landfester, K.; Mailander, V.; Wurm, F. R. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, (4), 372-7.
37. Hormann, K.; Zimmer, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - A review. *J Control Release* **2016**, *223*, 85-98.
38. Prevot, G.; Soria, F. N.; Thiolat, M. L.; Daniel, J.; Verlhac, J. B.; Blanchard-Desce, M.; Bezard, E.; Barthelemy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B. Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjug Chem* **2018**, *29*, (12), 4083-4089.
39. Lovelyn, C.; Attama, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**, *2*, (5).
40. Prevot, G.; Soria, F. N.; Thiolat, M. L.; Daniel, J.; Verlhac, J. B.; Blanchard-Desce, M.; Bezard, E.; Barthelemy, P.; Crauste-Manciet, S.; Dehay, B. Harnessing Lysosomal pH through PLGA Nanoemulsion as a Treatment of Lysosomal-Related Neurodegenerative Diseases. *Bioconjug. Chem.* **2018**.
41. Jarzyna, P. A.; Skajaa, T.; Gianella, A.; Cormode, D. P.; Samber, D. D.; Dickson, S. D.; Chen, W.; Griffioen, A. W.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. Iron oxide core oil-in-water emulsions as a multifunctional nanoparticle platform for tumor targeting and imaging. *Biomaterials* **2009**, *30*, (36), 6947-54.
42. Gianella, A.; Jarzyna, P. A.; Mani, V.; Ramachandran, S.; Calcagno, C.; Tang, J.; Kann, B.; Dijk, W. J.; Thijssen, V. L.; Griffioen, A. W.; Storm, G.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. Multifunctional nanoemulsion platform for imaging guided therapy evaluated in experimental cancer. *ACS Nano* **2011**, *5*, (6), 4422-33.

43. Gonzales, J.; Kossatz, S.; Roberts, S.; Pirovano, G.; Brand, C.; Perez-Medina, C.; Donabedian, P.; de la Cruz, M. J.; Mulder, W. J. M.; Reiner, T. Nanoemulsion-Based Delivery of Fluorescent PARP Inhibitors in Mouse Models of Small Cell Lung Cancer. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, (11), 3776-3782.
44. Calcagno, V.; Vecchione, R.; Quagliariello, V.; Marzola, P.; Busato, A.; Giustetto, P.; Profeta, M.; Gargiulo, S.; Cicco, C. D.; Yu, H.; Cassani, M.; Maurea, N.; Mancini, M.; Pellegrino, T.; Netti, P. A. Oil Core-PEG Shell Nanocarriers for In Vivo MRI Imaging. *Adv Healthc Mater* **2019**, e1801313.
45. Veronese, F. M.; Mero, A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* **2008**, *22*, (5), 315-29.
46. Liu, F.; Liu, D. Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, (7), 1060-4.
47. Alayoubi, A.; Alqahtani, S.; Kaddoumi, A.; Nazzal, S. Effect of PEG surface conformation on anticancer activity and blood circulation of nanoemulsions loaded with tocotrienol-rich fraction of palm oil. *AAPS J.* **2013**, *15*, (4), 1168-79.
48. Ganta, S.; Sharma, P.; Paxton, J. W.; Baguley, B. C.; Garg, S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in long-circulating nanoemulsion. *J. Drug Target.* **2010**, *18*, (2), 125-33.
49. Devalapally, H.; Zhou, F.; McDade, J.; Goloverda, G.; Owen, A.; Hidalgo, I. J.; Silchenko, S. Optimization of PEGylated nanoemulsions for improved pharmacokinetics of BCS class II compounds. *Drug Deliv* **2015**, *22*, (4), 467-74.
50. Cheng, Y.; Liu, M.; Hu, H.; Liu, D.; Zhou, S. Development, Optimization, and Characterization of PEGylated Nanoemulsion of Prostaglandin E1 for Long Circulation. *AAPS PharmSciTech* **2016**, *17*, (2), 409-17.
51. Li, S. D.; Huang, L. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *J. Control. Release* **2010**, *145*, (3), 178-81.
52. Falcone, C.; Lucibello, S.; Mazzucchelli, I.; Bozzini, S.; D'Angelo, A.; Schirinzi, S.; Totaro, R.; Falcone, R.; Bondesan, M.; Pelissero, G. Galectin-3 plasma levels and coronary artery disease: a new possible biomarker of acute coronary syndrome. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2011**, *24*, (4), 905-13.
53. Hemadou, A.; Giudicelli, V.; Smith, M. L.; Lefranc, M. P.; Duroux, P.; Kossida, S.; Heiner, C.; Hepler, N. L.; Kuijpers, J.; Groppi, A.; Korlach, J.; Mondon, P.; Ottones, F.; Jacobin-Valat, M. J.; Laroche-Traineau, J.; Clofent-Sanchez, G. Pacific Biosciences Sequencing and IMGT/HighV-QUEST Analysis of Full-Length Single Chain Fragment Variable from an In Vivo Selected Phage-Display Combinatorial Library. *Front Immunol* **2017**, *8*, 1796.
54. Ding, J.; Wang, Y.; Ma, M.; Zhang, Y.; Lu, S.; Jiang, Y.; Qi, C.; Luo, S.; Dong, G.; Wen, S.; An, Y.; Gu, N. CT/fluorescence dual-modal nanoemulsion platform for investigating atherosclerotic plaques. *Biomaterials* **2013**, *34*, (1), 209-16.
55. Hyafil, F.; Cornily, J. C.; Feig, J. E.; Gordon, R.; Vucic, E.; Amirbekian, V.; Fisher, E. A.; Fuster, V.; Feldman, L. J.; Fayad, Z. A. Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat. Med.* **2007**, *13*, (5), 636-41.

56. Briley-Saebo, K. C.; Amirbekian, V.; Mani, V.; Aguinaldo, J. G.; Vucic, E.; Carpenter, D.; Amirbekian, S.; Fayad, Z. A. Gadolinium mixed-micelles: effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magn Reson Med* **2006**, *56*, (6), 1336-46.
57. Senders, M. L.; Hernot, S.; Carlucci, G.; van de Voort, J. C.; Fay, F.; Calcagno, C.; Tang, J.; Alaarg, A.; Zhao, Y.; Ishino, S.; Palmisano, A.; Boeykens, G.; Meerwaldt, A. E.; Sanchez-Gaytan, B. L.; Baxter, S.; Zendman, L.; Lobatto, M. E.; Karakatsanis, N. A.; Robson, P. M.; Broisat, A.; Raes, G.; Lewis, J. S.; Tsimikas, S.; Reiner, T.; Fayad, Z. A.; Devoogdt, N.; Mulder, W. J. M.; Perez-Medina, C. Nanobody-Facilitated Multiparametric PET/MRI Phenotyping of Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **2018**.
58. Broisat, A.; Hernot, S.; Toczek, J.; De Vos, J.; Riou, L. M.; Martin, S.; Ahmadi, M.; Thielens, N.; Wernery, U.; Caveliers, V.; Muyldermans, S.; Lahoutte, T.; Fagret, D.; Ghezzi, C.; Devoogdt, N. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res* **2012**, *110*, (7), 927-37.
59. Jacobin-Valat, M. J.; Laroche-Traineau, J.; Lariviere, M.; Mornet, S.; Sanchez, S.; Biran, M.; Lebaron, C.; Boudon, J.; Lacomme, S.; Cerutti, M.; Clofent-Sanchez, G. Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging. *Nanomedicine* **2015**, *11*, (4), 927-37.

Annexe n°11 :

Une revue de la littérature sur l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose a été effectuée et est présentée ci-dessous.

Résumé: L'athérosclérose est la principale cause sous-jacente des maladies cardiovasculaires, dont la prévalence est en augmentation constante, se positionnant ainsi comme la principale cause de décès dans le monde. Cette pathologie se développe progressivement tout au long de la vie d'un individu, sous l'influence d'un grand nombre de facteurs environnementaux et physiopathologiques. Ces facteurs physiopathologiques ont suscités de nombreuses recherches en imagerie moléculaire visant à étudier de nouveaux axes diagnostiques dans l'optique de concevoir des outils théranostiques efficaces. Différentes équipes ont exploré diverses sondes moléculaires qui sont détaillées dans cette revue.

Recent advances in molecular imaging of atherosclerosis

Larivière Mélusine¹ PhD, **Bonnet Samuel**² MSc, Lorenzato Cyril² PhD, Laroche-Traineau Jeanny² PhD, Ottonès Florence² PhD, Jacobin-Valat Marie-Josée² PhD, and Clofent-Sanchez Gisèle^{2*} PhD

¹ University of Tours, France

² CNRS UMR 5536, Univ. Bordeaux, CRMSB, Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques - Bordeaux, France

* To whom correspondence should be addressed

Dr.	Gisèle			CLOFENT-SANCHEZ,		PhD
Directeur	de			Recherche		CNRS
Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques						
UMR	5536	CNRS	/	Université	de	Bordeaux
146,	rue	Leo-Saignat,		F-33076,	Bordeaux	France
Tel:	(33)	6	11	45	46	93
e-mail: gisele.clofent-sanchez@rmsb.u-bordeaux.fr						

Abstract

Atherosclerosis is the major underlying cause of cardiovascular disease (CVD), which prevalence is continuously increasing, thus currently standing as the leading global cause of death. This pathology gradually develops for fifty or more years throughout the life of an individual, under the influence of a vast number of factors, both environmental and pathophysiological. This very wealth of actors has elicited much research into molecular

imaging, with purely diagnostic purposes, or with the hope to engineer an efficient theranostic tool. To these ends, diverse nanomaterials with desirable, tunable properties have been explored by different teams, as described in this review.

Atherosclerosis: a multifactorial, multifocal, long-lived pathology

A chronic disease with a lifelong evolution

Atherosclerosis gradually develops for fifty or more years throughout the life of an individual before leading to chronic ischemic complications or acute events. This pathology is the major underlying cause of CVD, for which prevalence is continuously increasing, thus currently standing as the leading global cause of death. Its slow, quiet progression generally remains unnoticed, explaining how over 50% of people dying from a sudden cardiovascular event such as myocardial infarction or stroke were otherwise symptom-free before luminal occlusion occurred.¹

Natural history

Progressive atherosclerotic lesions occur as the result of (i) a surcharge of low-density lipoproteins (LDL) that accumulate on the endothelial surface, enter the vessel wall and become oxidized; and (ii) a sustained activation of the inflammatory system within the vascular wall.² This in turn triggers the recruitment, activation, and differentiation of monocytes into macrophages, and then into foam cells after engulfment of oxidized LDL. As previously eloquently described, *“Atherosclerosis is a multifocal, smoldering, immunoinflammatory disease of medium-sized and large arteries fueled by lipids”*.³ Atherosclerosis is characterized by progressing plaques more or less prone to develop superficial erosion or thrombotic rupture, depending both on biological factors and local hemodynamic stress.⁴ These phenomena concur to intimal thickening, fibrosis, and the formation of lipid cores that ultimately become necrotic.

The most important morphological events that characterize the final stages of the disease are erosion, thinning of the fibrous cap, rupture, and the development of a procoagulant and prothrombotic environment. Thin-cap fibro-atheroma is the typical rupture-prone lesion, usually in persons aged over 55. The fibrous cap is locally weakened by proteolytic enzyme activity, secreted in the inflammatory environment of the plaque by macrophages, foam cells, smooth muscle cells and endothelial cells.^{5,6} Scattered calcifications also appear, under the influence of inflammatory and osteoblast-like cells.⁷ The increasingly large necrotic core becomes hypoxic, triggering local neovascularization. Fragile and leaky neovessels facilitate further invasion of immune cells and release of soluble factors into their surroundings. Furthermore, intraplaque hemorrhage may occur from these imperfect vessels, causing an accumulation of erythrocyte-derived phospholipids, free cholesterol, hemoglobin and iron. These mechanisms ultimately result in plaque destabilization.⁸⁻¹⁰

With regard to coronary atheroma, it is currently proven that non-fatal atheroma lesions may contain ruptured areas and that, conversely, certain fatal lesions do not present any sign of rupture. The majority of these individual coronary lesions do not -in fact- go on to cause clinical events.¹¹ Therefore, mechanisms other than plaque rupture could explain acute thrombosis.¹² In addition, at least 50% of acute events occur on plaques with non-significant stenosis (<70%). Non obstructive and obstructive coronary artery disease are associated with quite the same risk of myocardial infarction or cardiovascular death if more than 4 segments are affected (non-obstructive extensive disease).¹³ A more complete pan-coronary assessment of the atherosclerotic disease process with markers of metabolic disease burden is thus necessary.

Current clinical practice

In spite of these limitations, anatomic imaging remains the gold standard, particularly X-ray angiography, for the evaluation of atherosclerosis¹⁴, in patients presenting with determined risk factors, according to the Framingham risk score. This purely anatomic imaging method only addresses ischemia in the vessels and has proven disappointing in overall diagnostic yield of heart failure and cardiovascular outcomes.

Other types of angiography, which have the advantage that they are non-invasive, are also used, like coronary computed tomographic angiography (CCTA) or magnetic resonance angiography (MRA) combined with ECG-gating.¹⁵ Multicolor CCTA is a useful first-line diagnostic test for appropriately selected patients with symptoms of angina and a low-to-moderate pretest probability of coronary artery diseases (CAD). Obtaining good-quality MRA images is challenging in the coronary circulation, but this technology is also used to assess carotid artery disease in patients with recent stroke or transient ischemic attack. It is used as a complement for 2D-Doppler ultrasound which is typically the most accessible first-line test.

However, stenosis imaging gives no indication on disease activity. Indeed, these clinical practices only rely on the detection of ischemia and obstructive thrombi, leaving features like plaque morphology or molecular composition underappreciated.

Clinically-relevant imaging modalities

Invasive imaging modalities

Intravascular coronary imaging with ultrasound (IVUS), optical coherence tomography (OCT) and near-infrared fluorescence (NIRF) have been developed during the last decade to provide detailed information about plaque burden, the fibrous cap, coronary remodeling and/or necrotic core. Intravascular imaging has largely contributed to the understanding of atherosclerosis in humans and to the translation of novel practices to the clinic.¹⁵⁻¹⁷

Intravascular ultrasound (IVUS)

IVUS was one of the first techniques used to assess the morphological features of plaque and, to a lesser extent, its composition.¹⁸ Its spatial resolution is around 100-200 μm , although by

tuning transducer frequency, better resolutions of down to 40 μm have been achieved.¹⁹ Its unmatched penetration depth (4–8 mm) compared to other intravascular methods makes it a good tool to determine artery wall morphology, plaque volume²⁰ and calcification.²¹ Using serial virtual histology IVUS, longitudinal imaging studies in humans have demonstrated that plaque morphology changes over a few months, thin fibrous cap atheroma (TFCA) transforming into thick-cap fibrous atheroma or fibrotic plaque, presumably secondary to rupture and healing.^{22,23}

Optical Coherence tomography (OCT)

OCT is an invasive catheter-based imaging modality using near-infrared light and interferometry. It has a medium penetration depth of 2-3 mm and generates high-resolution images (i.e., axial resolution of $\sim 10\text{-}15\ \mu\text{m}$) of coronary arteries and implanted devices. It requires a contrast flush of saline solution to clear the blood column and allow a transparent path for the light beam. OCT is used for testing the safety and efficacy of novel treatments for atherosclerosis (e.g., drug-eluting stent and bioresorbable devices) and for the guidance and optimization of complex percutaneous coronary interventions (PCI).²⁴ High resolution and high contrast between tissue constituents allow for both the assessment of structural details and the ability to penetrate heavily calcified tissue, making OCT a promising tool for intravascular diagnostics, although its limited penetration provides less information on plaque volume.²⁵ In clinics, this method was used to confirm the dynamic nature of the atherosclerotic disease, demonstrating that TFCA plaques at various stages of development are highly prevalent in patients with coronary disease.²⁶

Although IVUS and OCT modalities²⁷ are capable of visualizing vessel wall microstructure and intraluminal objects (e.g., stent struts and intracoronary thrombus) in great detail, detection of molecular content and activity is not possible without a dedicated contrast agent: microbubbles for IVUS, and fluorescence-emitting probes for OCT.

Near infrared fluorescence (NIRF)

NIRF is an emerging imaging modality aiming to improve the understanding of plaque and stent biology. Near infrared fluorescence characterizes emission wavelengths in both the 700–900 nm NIR-I and the 1,000–1,700 nm NIR-II windows.²⁸ These high wavelength, low energy radiations present the advantages of an increased penetration depth (due to limited tissue-photon absorption compared to lower wavelengths) and reduced detectable endogenous fluorescence. Altogether, this offers an improved signal-to-noise ratio, or target-to-background ratio, which can be taken advantage of for molecular imaging (see below).

Non-invasive imaging modalities

Fluorescent Molecular Tomography (FMT)

A number of imaging modalities take advantage of NIRF properties, notably FMT. In small animal models, this modality can be used as a non-invasive protocol: the use of high-resolution imaging modalities combined with NIRF imaging enables complementary localization and reconstruction of signals emitted by NIRF probes.

Computed Tomography (CT)

CT is an X-ray radiographic method generating a 3D image from a large series of 2D radiographic images. Its contrast is based on tissue density differences. In cardio-vascular imaging, the main application of CT is in the assessment of coronary arteries plaque calcification (see below), for which predictive value has been disputed.²⁹ A recent modality, contrast-enhanced multi-detector computed tomography (MDCT), may help characterize different components of atherosclerotic plaques (lipid-rich, fibrous and calcified plaques), although the overall lack of soft tissue contrast renders localization tricky. In addition to the necessary radiation exposure, this makes this modality unsuitable for screening and follow-up of non-symptomatic patients.²⁹ It is however broadly used in combination with other methods such as positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT), to associate anatomic and metabolic information.

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI has demonstrated substantial potential in phenotyping vascular disease. MRI can indeed be used to differentiate plaque components on the basis of their biophysical and biochemical properties, such as chemical composition, water content, physical state, molecular motion, or diffusion.³⁰ The greatest strength of MRI for characterizing atherosclerotic plaque is the availability of various protocols to enhance the contrast on chosen characteristics: T₁-T₂ weighted protocols, bright-blood, black-blood, and time-of-flight (TOF).³¹ While bright blood sequences do not affect the blood signal and can be used for general morphological assessment, black blood sequences rely on the elimination of the flowing blood signal and allow for characterizing the vessel wall. In an opposite manner, TOF sequences tend to minimize the signal of stationary tissues, permitting the visualization of the vascular lumen. In clinical studies, the injection of gadolinium as a contrast agent has demonstrated differential enhancement of carotid plaque tissues. Strong enhancement generally suggests an uptake within a highly permeable vascular structure and loose extracellular matrix. These features are usually consistent with inflammation in the vascular wall.³² Vascular MRI has high spatial, temporal, and soft-tissue contrast resolution. It is particularly appropriate for investigating large vessels such as aorta, carotid and femoral arteries *in vivo*³³; however, cardiac and respiratory motions limit coronary imaging. Here it should be noted that, unlike CT examination, MRI provides imaging without ionizing radiation, rendering it suitable for repetitive/longitudinal clinical studies. In this context, Silvera *et al.* demonstrated³⁴ the complementary value and clear advantage of using simultaneous PET/MRI for the evaluation of atherosclerotic plaque as compared to PET/CT or MRI alone.

Positron Emission Tomography (PET)

PET is the most commonly used non-invasive imaging method to detect physiological and pathological processes *in vivo* with radionuclides such as ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O and ^{18}F . Its sensitivity and resolution are respectively in the picomolar and millimeter range. The most common tracer, [^{18}F]-2-deoxy-2-fluoro-d-glucose (^{18}F -FDG), a β^+ -emitting analog of glucose, has been initially proposed as a metabolic marker in cancer diagnostics. Upon internalization via glucose transporters, FDG undergoes phosphorylation by hexokinase to FDG-6-phosphate. However, differently from glucose-6-phosphate, FDG-6-phosphate does not undergo further metabolism and accumulates irreversibly in the cell in proportion to exogenous glucose utilization, enhancing the contrast of metabolically active areas. Besides glucose uptake, numerous other metabolic and signaling pathways associated with plaque vulnerability have been targeted with nuclear imaging modalities, which will be described in the next section.

Next generation diagnosis modalities

Imaging based on physiological processes

Glucose metabolism

The previously mentioned tracer, ^{18}F -FDG, is also of interest in atherosclerosis detection. Indeed, vulnerable atherosclerotic plaques have been shown to accumulate more FDG than stable plaques in a clinical study by Rudd *et al.*³⁵ They first showed that PET can be used to detect inflammatory atherosclerotic plaques. Subsequent studies confirmed the usefulness of FDG to discriminate unstable from stable plaques, for example in shear stress-induced atherosclerosis with inflamed plaques upstream and stable plaques downstream of a conical cuff positioned around the common carotid artery of ApoE^{-/-} mice.³⁶ However, concerns were raised about harmonization of protocols and analyses^{37, 38} and about its specificity since FDG is accumulated by any metabolically active cell. Additionally, coronary imaging with this agent is rendered challenging by the high glucose consumption in the myocardium, leading to FDG accumulation.³⁹

Mannose metabolism

Tahara *et al.* used ^{18}F -labeled mannose (2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-d-mannose, ^{18}F -FDM) to detect plaque inflammation.⁴⁰ They hypothesized that ^{18}F -FDM imaging may offer added specificity to the imaging of high-risk atherosclerotic plaques by targeting Mannose Receptor (MR)-bearing macrophages that are abundant in such lesions. Comparable uptake of ^{18}F -FDM and ^{18}F -FDG were observed in atherosclerotic lesions in a rabbit model. Cell studies in human macrophages indicated higher metabolic FDM uptake and specific binding of FDM to the MR, upregulated in high-risk plaques.

Calcification

Uptake of ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF) is linked with osteogenic activity and has initially been used as a bone tracer in PET studies. Vascular calcification is a complex biological process: while macrocalcification confers plaque stability, microcalcification is a key feature of high-risk atheroma. It was recently proven that macrophage-derived matrix vesicles contribute directly to microcalcification.⁴¹ Irkle *et al.* showed that ^{18}F -NaF PET/CT imaging can distinguish between areas of macro- and microcalcification, with ^{18}F -NaF binding preferentially to the latter.⁴² Therefore, it provided differential information to CT, which was only able to detect large macroscopic deposits. Joshi *et al.* observed increased ^{18}F -NaF activity only in culprit lesions, reflecting a subclinical plaque rupture.⁴³ High cardiovascular risk-hypertensive individuals were prospectively scanned with ^{18}F -NaF PET/CT in the coronary, aortic and carotid arteries. The study revealed that ^{18}F -NaF atherosclerotic plaque uptake related to the burden of cardiovascular risk factors and thoracic fat volume, but failed to associate to coronary uptake and calcium score.⁴⁴ The ability of hybrid ^{18}F -NaF PET/CT to predict disease progression and to identify patients at risk of myocardial infarction is currently being tested in a large multicenter and prospective observational study, PREFFIR (Prediction of Recurrent Events With ^{18}F -Fluoride; ClinicalTrial.gov NCT02278211).

NIRF imaging agents were equally shown useful for the visualization of atheroma calcification. For example, a bisphosphonate-derivatized NIRF probe for hydroxyapatite (Osteosense) revealed numerous spotty microcalcifications throughout the plaque of a mouse atherosclerotic model.⁴⁵ The osteogenic activity was found to be associated with macrophage burden.

Proliferation

The [^{18}F] isotope-labelled, thymidine analog 3'-deoxy-3'-fluorothymidine ^{18}F -FLT, which accumulates in proliferating cells, was used with PET/CT imaging to explore cell proliferation in ApoE^{-/-} mice, rabbits, and humans with atherosclerosis.⁴⁶ An increased ^{18}F -FLT signal was observed in atherosclerotic lesions, spleen, and bone marrow, confirmed *in vitro* by a higher proliferation of macrophages in aortic lesions and hematopoietic stem and progenitor cells. However, the correlation between ^{18}F -FDG and ^{18}F -FLT in aortic segments of atherosclerotic rabbits and patients was weak.

Protease activity

The protease-activatable NIRF imaging agent Prosense750 (VisEn Medical) showed potential applications for atheroma imaging. These “activatable” probes are injected as quenched molecules and become fluorescent upon local interaction with proteases. Chen and colleagues demonstrated focal NIRF signal in the atherosclerotic aorta⁴⁷ of apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-} mice), twenty-four hours after injection of Prosense750.

Combined FMT-CT was used to demonstrate that cathepsin-activated (ProSense FAST and Cat B FAST) and $\alpha\beta 3$ (IntegriSense) integrin-targeted NIRF agents can be used as molecular imaging biomarkers for longitudinal detection of atherosclerosis.⁴⁸ Cathepsin-sensitive agents

allowed monitoring of the anti-inflammatory effects of the lipid-lowering drug ezetimibe, with applications in preclinical testing of therapeutics.

The technology for FMT systems is rapidly evolving, notably in terms of sensitivity, and may eventually be able to detect NIRF signals from large surface vessels like the carotid arteries in a non-invasive setting. However, given the absorption of NIRF signal by surrounding tissues, they are less likely to collect sufficient signal from abdominal aortic aneurysms or plaques, let alone coronary atheroma.

To image proteolytically active atherosclerosis in coronary sized vessels in a clinically translatable approach, an intravascular NIRF sensing approach is necessary. A two-dimensional imaging catheter was engineered by the team of Dr. V. Ntziachristos for 360-degree viewing intravascular NIRF imaging.⁴⁹ In conjunction with the cysteine protease-activatable imaging reporter Prosense VM110, intra-arterial 2D NIRF imaging was performed in rabbits, on atherosclerosis-bearing aortas, and in coronary arteries implanted with bare metal stents. This setting provided insight into the spatial distribution of plaque cysteine protease activity in atheroma and stent-induced arterial injury.

Although promising, these contrast agents are currently limited to pre-clinical research, and will require regulatory approval, in addition to the necessary developments in the imaging technology to translate to the clinical setting.⁵⁰ Limitations come primarily from the lack of clinically approved fluorophores for human use. To date, indocyanine green (ICG), an amphiphilic contrast dye able to interact with lipoproteins,⁵¹ is the most used US Food and Drug Administration-approved fluorophore in the cardiovascular field.

Autofluorescence

Recently, an OCT-NIRF catheter was used to analyze the distribution of near-infrared autofluorescence signal within OCT-delineated plaque morphological features. Red-excited near infrared autofluorescence (NIRAF)⁵² (excitation: 633 nm, emission: 680nm to 900nm) was found elevated in lesions that contained necrotic core, a feature critical for vulnerable plaque diagnosis. The team of Tearney. *et al* demonstrated that coronary arterial NIRAF intensity was elevated only focally in plaques with a high-risk morphological phenotype, in plaque regions that showed OCT evidence of macrophage accumulation.⁵³ (Figure 1)

The potential sources of NIRAF in atherosclerotic plaques and its potential relationship to coronary wall inflammation are unclear, but the modification of lipids and lipoproteins by oxidative stress or endogenous porphyrins coming from intraplaque hemorrhage have been hypothesized to be the source of NIRAF within plaques.⁵⁴⁻⁵⁶ This new imaging modality was also able to distinguish fibroatheroma, plaque rupture, and fibroatheroma associated with in-stent restenosis without administration of contrast agents. Studies have also demonstrated the feasibility and safety of this approach for intra-coronary imaging in patients undergoing percutaneous coronary angiography.

Molecular Imaging: targeted micro and nano-objects

Beyond the mere structural characteristics of the atherosclerotic vessels, being able to image clinically relevant biological processes of the pathology would allow assessment of the plaque burden and its propensity to cause an acute cardio-vascular event. Improved clinical imaging methods are, therefore, required to measure disease activity directly. This is exactly what molecular imaging technologies are able to do with the accumulation of molecular tracers targeted to pathological processes at sites of increased disease activity, regardless of their eroded or ruptured status. Imaging strategies aimed at identifying individual vulnerable plaques in the coronary arteries may not adequately predict risk of acute cardiovascular events. Global assessment of disease activity across the arterial tree will certainly lead to improved risk prediction.

Molecular imaging arose in the early 2000s to identify molecular and cellular processes in animal models of diseases.⁵⁷ Initially, molecular imaging modalities found their way in optical and nuclear imaging devices such as SPECT and PET. More recently, echography, CT and MRI, reputed as insensitive diagnostic techniques, were revamped into molecular targeting modalities. Moreover, CT and MRI offered the benefit of excellent spatial resolution. A number of targeted nanoparticles were designed to address imaging of suitable biomarkers, known to be overexpressed in atheroma (see above), essentially for MRI. However, PET imaging using functionalized nanoparticles or tracer-labelled antibodies sparked a renewed interest, due to the increasing availability of unconventional PET radionuclides such as ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, which higher half-lives allowed for a delayed imaging and clearance of the blood signal, based on pharmacokinetics properties of these agents. These last years have also seen the development of NIRF probes. For coronary applications in humans, these necessitates the development of catheters for intravascular imaging, due to a penetration depth of fluorescence below 200 μm.

Invasive modalities

A NIRF probe made of ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles (CLIO) derivatized with a near-infrared fluorophore (CyAm7), was tested in rabbits on a high cholesterol diet undergoing a pharmacological triggering protocol to induce thrombosis.⁵⁸ Superficial erosion-related plaque thrombosis is gaining increasing interest for the diagnosis of high-risk atherosclerosis, and based on this mechanism the hypothesis was made that impaired endothelial permeability could be indicative of future plaque erosion. CLIO-CyAm7 was thus proposed to probe local alterations in endothelial functional integrity. The results provided evidence of a heterogeneous distribution of CLIO-CyAm7 nanoparticles in atheroma, linked to areas of leaky endothelial cells and neo-vessels, suggesting that altered endothelial permeability in atherosclerosis could modulate nanoparticle deposition. In rabbits submitted to aortic balloon injury and high-cholesterol diet., plaques that thrombosed exhibited significantly higher CLIO-CyAm7 accumulation compared with plaques without thrombus.

In another study of Vinegoni *et al.*⁵⁹ the ability of ICG to identify inflamed coronary-sized plaques was tested *in vivo* in atherosclerotic rabbits. In addition, *in vitro* studies using human macrophages established that ICG preferentially accumulates in lipid-loaded macrophages, presumably through an internalization process following ICG binding to LDL.

Targeted NIRF imaging using a fibrin-targeted molecular imaging probe, FTP11-CyAm7, enabled high-resolution imaging of the fibrin overlying stent struts in rabbits.⁶⁰ Intravascular fibrin NIRF imaging therefore seems a clinically transferable technology, able to complement OCT for improving the detection of unhealed stents.

NIRF dye-labeled ligands such as monoclonal antibodies aimed at identifying and quantifying oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), were recently developed.⁶¹ LO1, a germline-encoded natural monoclonal autoantibody reacting with malondialdehyde-conjugated LDL, was labelled with a 750-NIRF dye and injected into high fat fed atherosclerotic Ldlr(-/-) mice. FMT combined with micro-CT images clearly showed a specific focal localization within the aortic arch and its branches. When compared with a NIRF reporter of MMP activity (MMPSense-645-FAST), LO1-750 gave a superior Ldlr(-/-) to wild-type control NIRF signal ratio. Importantly for translational approaches, LO1-750 is broadly reactive across species with clear evidence of the presence of the antigen in mouse, rabbit and human atherosclerotic lesions. A customized intra-arterial NIRF detection catheter was designed for first imaging assays in aortas from atherosclerotic balloon injured rabbits, a vessel of similar caliber to a human coronary artery. Moreover, to overcome obstacles such as immunogenicity, Fc-related inflammatory effector function and to allow future translation, a partially humanized chimeric LO1-Fab-Cys was created and shown to localize similarly to the parent antibody in murine atheroma.

Hybrid intravascular imaging catheters were further constructed taking advantage of the association of two imaging modalities in order to balance each other's drawbacks in the same device. They have been proposed as new tools to investigate the evolution of coronary plaques. Indeed, they have the capability to provide simultaneous molecular information in the context of the surrounding tissue microstructure. A first bimodal imaging catheter has been designed by the teams of Jaffer and Tearney that NIRF imaging and Optical Frequency Domain Imaging, known to rapidly acquire three-dimensional (3D) images of the artery wall.⁶² In a first experiment with the catheter, the dual-modality imaging using an implanted NIR fluorescent fibrin-labelled stent was validated *in vitro* in a cadaveric coronary artery. In atherosclerotic rabbits *in vivo*, the engineered hybrid NIRF-OCDI allowed for concomitant assessment of anatomical and molecular characteristics of high-risk plaques and stent thrombosis.

Other studies provide examples of simultaneous co-localization of molecular and microstructural information using hybrid imaging catheters. Integration of high-speed OCT and NIRF technology in a single system after injection of the FDA-approved ICG accurately identified lipid-rich inflamed atheroma plaques into rabbit models with experimental

atheroma induced by balloon injury and high-cholesterol diets.⁶³ A step further, the same group validated the integrated OCT/NIRF catheter with a clinical dose of ICG to accurately assess plaque inflammation in swine coronary arteries.⁶⁴ Using OCT/NIRF imaging in the BRIGHT-CEA (Indocyanine Green Fluorescence Uptake in Human Carotid Artery Plaque) trial, ICG was shown to illuminate plaque macrophages and lipid in areas of enhanced endothelial permeability.⁶⁵

Non-invasive modalities

Non-invasive molecular imaging methods are less risky than the above and do not require the patients to be hospitalized, so they allow for systematic risk assessment in larger groups of patients, based on their hazard ratio, to improve the prevention of acute cardio-vascular events and deaths. To match the level of information collected by invasive methods to that collected by non-invasive methods, a sufficient image resolution is needed. Three modalities are able to—at least partially- fulfil these expectations: MRI, CT and ultrasound (US). To detect a cellular or molecular event, sufficient sensitivity is expected: nuclear imaging (PET or SPECT imaging) is the leader.

Hybrid imaging has been extensively developed in the recent years to combine the advantages and compensate the drawbacks of each feature. To date, combined PET/MR scanners are advantageously emerging. This bimodality was recently used to assess changes in the inflammation of atherosclerotic plaque induced by atorvastatin in a rabbit model of atherosclerosis, as reported by Millon *et al*, using USPIO-enhanced MRI (P904) and ¹⁸F-FDG PET.⁶⁶

Atherosclerosis is a complex pathological process, involving a wide variety of actors that can in turn be used to specifically image the underlying development and progression of atheroma lesions. Over-representation of some cells and biomolecules can be directly taken advantage of, the most intensively targeted being macrophages and non-immune cells such as endothelial cells and SMC, oxidized LDL, platelets, fibrin, matrix proteinases, myeloperoxidase, all known to play key roles in atherogenesis.

Macrophage imaging: from passive to active targeting

Inflammation is a recognized feature of atherogenesis involving both innate and adaptive immune cells.⁶⁷ Neutrophils, dendritic cells, leukocytes, lymphocytes, have all been implicated.⁶⁸ Among them the most represented are macrophages⁶⁹ and a lot of bio-engineered nanoparticles were designed to target these central actors of plaque development. Recruitment of monocytes in the vascular wall, followed by macrophage differentiation and proliferation represents a hallmark in the pathology of atherosclerotic lesions. Monocytes contribute to the processes that underlie atherogenesis such as lipid accumulation, secretion of pro-inflammatory cytokines, and extracellular matrix remodeling.

The heterogeneity and complexity of the macrophage population have been recently pointed out, reflecting those of the lesion microenvironment. The most extensively studied is the simplistic distinction between pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophage populations.⁷⁰ Actually, there is a complex continuum of macrophage activation states between these extreme populations, reflecting the plasticity of macrophages depending on the local milieu changes. It is likely that the macrophage uptake of modified lipoproteins that occurs within plaques induces a phenotypic spectrum of macrophage activation states, depending on diverse signals that vary in time and space. Targeting such activation states may give an indication on the molecular state of the plaque.

Passive: phagocytosis

Numerous particles have been developed and tested in preclinical studies that take advantage of the phagocytic properties of monocytes.

Many studies were conducted using MR imaging. Briley-Saebo *et al.*⁷¹ have shown that dextran-based USPIOs (Feridex) with a diameter smaller than 20 nm can be used to passively target intraplaque macrophages in atherosclerotic rabbits. Other teams have demonstrated that lipid-based formulations, which are more flexible, up to 200 nm in diameter were able to enter the plaque: for example, gadolinium-loaded micelles,⁷² as big as 106 nm, were able to pass through a 25 nm pore filter *in vitro*. In another study, Gd-liposomes with a diameter of 203 nm were used to demonstrate the importance of the nature of phospholipids on macrophage uptake *in vitro*.⁷³ Both these agents were able to label atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice, suggesting the potential of lipid-based nanoparticles to bend or squeeze through the fenestrae of leaky endothelium observed in atheroma lesions. Finally, studies in human patients using passive macrophage targeting by USPIO particles (Sinerem, Guerbet) showed a preferential accumulation in rupture-prone or ruptured atherosclerotic lesions⁷⁴, and the possibility to monitor statin-driven reduction in plaque macrophage content.⁷⁵

MRI can also make use of the properties of nuclei of other atoms, such as fluorine 19 (¹⁹F). *In vivo* ¹⁹F MRI of injected perfluorocarbons (PFCs), internalized by macrophages and other immune cells, enables non-invasive *in vivo* visualization and quantitative characterization of inflammation in a mouse model of atherosclerosis. The signal-to-noise ratio was found to significantly increase up to day 6 in plaques in the aortic arch and its branches.⁷⁶

Other imaging modalities have also been studied, like X-ray computed tomography, that was recently used to track monocytes, known to be actively recruited from the circulation into developing atherosclerotic plaques. Chhour *et al* showed their accumulation into atherosclerotic plaques after labelling with gold nanoparticles.⁷⁷

The importance of nanoparticle coating for their phagocytosis by macrophages was underlined in several studies. Tsuchiya *et al* compared the *in vivo* uptake of four types of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles, i.e. SPIO, mannan-coated SPIO (M-SPIO), ultrasmall SPIO (USPIO), and mannan-coated USPIO (M-USPIO) in the lesions from Watanabe

heritable hyperlipidemic rabbits. Histologic and imaging analysis showed that mannan-coated SPIO and USPIO particles were taken up more readily by the atherosclerotic wall in the rabbits than uncoated SPIO and USPIO.⁷⁸ In another study, dextran-coated iron oxide nanoparticles (DIO) labelled with the positron emitter ⁶⁴Cu to generate a PET/MRI probe were modified with maleic anhydride to increase the negative surface charge. Repetitive anionic charges on the surface facilitate recognition by the scavenger receptor type A (SR-A), a ligand receptor found on activated macrophages. The authors showed that the accumulation of the bimodal agent in macrophages was substantially improved by the coating process.⁷⁹

Similarly, polyglucose nanoparticles were recently proposed to target macrophage in a PET/MRI bimodal imaging system.⁸⁰ ¹⁸F-Macroflor's synthesis relies on sugar molecules and facile click labelling for radionuclide attachment. Macroflor showed a significant predilection for macrophages with negligible incorporation into lymphocytes and neutrophils. Due to its small size, the nanoparticle is excreted through the kidneys, a prerequisite for imaging with the isotope ¹⁸F. The particle's short blood half-life, measured in three species, including a primate, would enable macrophage imaging in inflamed cardiovascular tissues. ¹⁸F-Macroflor PET imaging was combined with MRI sensing of myeloperoxidase (MPO) using the activatable enzyme reporter MPO-Gd, previously validated for infarct imaging. The dual PET/MRI target was tested in the ApoE^{-/-} atherosclerotic mouse submitted to coronary ligation to induce disease-exacerbating inflammation in plaques. The uptake of Macroflor PET and MPO MRI in atherosclerotic plaques with myocardial infarction was increased compared to lesions without myocardial infarction. These data suggest that Macroflor PET/MRI imaging could be a clinical tool to non-invasively monitor macrophage biology.

Targeted: nanobiologics

Nature-inspired nanocarrier platforms, referred to as nanobiologics, were launched a decade and a half ago by the team of W. Mulder.⁸¹ In the body, cholesterol, phospholipids, triglycerides and other lipids are transported by endogenous lipoproteins. The smallest of the lipoprotein family, high-density lipoprotein (HDL), intrinsically interacts with macrophages, and has attracted growing interest. The main protein of HDL is apolipoprotein A1 (ApoA1), essential for several atheroprotective activities, including cellular cholesterol efflux, control of inflammatory responses, platelet activation and cell death, and vasodilatory effects.⁸² Recognition of macrophages is facilitated by the natural affinity of ApoA1 for ATP binding cassette transporter A-1 (ABCA-1), ATP binding cassette transporter G-1 (ABCG-1) and Scavenger receptor class B member 1 that are all expressed at the cell membrane. These properties have prompted the engineering of HDL for diagnostic and therapeutic applications. Synthetic HDL biomimetics, composed of ApoA1, lipids, and including gold, iron oxide nanoparticles, or quantum dots were reported for the detection of atherosclerotic plaques by using a variety of imaging modalities (computed tomography, magnetic resonance imaging, fluorescence).^{81, 83-85} These biodegradable nano-objects are inherently compatible with the immune system, therefore making them able to escape removal by the reticuloendothelial

system and to efficiently cross different biological barriers.⁸⁶ Reconstituted HDLs labeled with both gadolinium (Gd) and fluorescent dyes (Cy5-5 in the corona and DiO or DIR in the core) have been proposed to deliver statins to pathological macrophages in atherosclerosis.⁸⁷ ApoA1 lipoproteins that structure the rHDL were used as targeting moieties to facilitate the delivery of the statin cargo into the atherosclerotic plaque. Typical T1-weighted MR images of the abdominal aortas of ApoE^{-/-} mice indicate pronounced accumulation in atheroma-rich regions, and *ex vivo* fluorescence microscopy revealed colocalization of DiO with macrophages in the aortic root. The follow-up of Gd-labelled, statin-loaded rHDL, in mice over 12 weeks, showed markedly decreased inflammation in advanced atherosclerotic plaques. (Figure 2)

The second generation of HDL nanoparticle platforms were also created for a controlled release of drugs.⁸⁸ For that, investigators have incorporated the polymer poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) in its hydrophobic core and shown that the biological properties, and ability to efficiently target plaque macrophages closely resemble that of native HDL. However, the size was increased to diameters ranging from 88 to 156 nm. Further, a combinatorial library of rHDL nanoparticles was constructed using microfluidics technology. The aim was to decipher the best shape, size and compositions leading to a better targeting of harmful immune cells by combining *in vivo* PET and immunological techniques.⁸⁹ (Figure 3)

The best candidate, in terms of blood half-lives and aorta-to-liver / aorta-to-spleen ratios, was a nanoparticle containing the liver X receptor agonist GW3965 (a compound that did not reach clinical application due to adverse effects on the liver) which had reduced liver toxicity compared to the free GW3965 compound. The authors concluded that fine-tuning the components and synthesis procedures can improve rHDL targeting and lower their toxicity while preserving their therapeutic function.

Positron emission tomography (PET) imaging using the zirconium-89 (⁸⁹Zr) radiotracer was proposed to visualize the *in vivo* behavior of high-density lipoprotein (HDL), with an emphasis on its plaque-targeting abilities.⁹⁰ Discoidal HDL nanoparticles were radiolabeled on their main components, either ApoA1 (⁸⁹Zr-A1-HDL) or phospholipids (⁸⁹Zr-PI-HDL), to provide insights into their pharmacokinetics, trafficking and metabolism. Through murine, rabbit, and porcine atherosclerosis models, PET/CT or PET/MRI imaging provided proof for a reliable quantification of ⁸⁹Zr-HDL uptake in the vessel wall. (Figure 4)

A clear limitation is that this imaging modality requires a nearly complete radioactivity clearance from circulation, which can take days or more. This radiolabeling strategy has been taken all the way to humans to assess HDL accumulation in carotid lesions by PET/CT.⁹¹

Targeting: designing ligands specific to receptors on macrophages

Besides the possibilities of passive macrophage uptake or “natural” targeting via ApoA1 described earlier, a number of teams have investigated whether targeting receptors up-regulated in inflammatory atherosclerotic lesions would overcome the undesired uptake of HDL mimetics in liver mediated by scavenger receptor class B type I (SR-BI).

CD44/Hyaluronic acid

Hyaluronic acid (HA) binds with high affinity to CD44, which is upregulated at inflammatory sites of atherosclerotic lesions, making the HA/CD44 interaction attractive for effective plaque targeting.⁹²⁻⁹⁴ Liu *et al* reported the coating of rHDL with HA (HA-rHDL), expected to reduce the unwanted recognition by non-target tissues, especially the liver, *via* SR-B1-mediated uptake of HDL by hepatic cells⁹⁵. This HA-DiR-rHDL biomimetic endows better lesion targeting and lesser liver accumulation than the uncoated formulation, as evidenced *ex vivo* in rabbits. As a proof-of-concept for treatment, HA-rHDL loaded with lovastatin (HA-LT-rHDL) and injected in rabbits submitted to a high-fat diet showed an attenuation effect on macrophage infiltration. Moreover, due to HA degradation by hyaluronidases abundant in plaques, the HA-LT-rHDL formulation would expose naked, drug-loaded rHDL to foam cells.

In the perspective of MR imaging, El-Dakdouki *et al* have used HA to functionalize magnetic NPs. This allows for *in vivo* detection of atherosclerotic plaques on a rabbit model by T2*-weighted MRI.⁹² More recently, Beldman *et al* formulated HA in NPs labelled with a fluorescent dye or the ⁸⁹Zr radiotracer, and studied their targeting properties and biodistribution in ApoE^{-/-} mice.⁹⁶ *Ex vivo* flow cytometry analysis of immune cell populations showed a substantial accumulation in aortic macrophages, and nuclear techniques allowed the quantification of ⁸⁹Zr-HA-NP focal accumulation at typical sites of atherosclerotic plaque formation. Moreover, the authors showed that HA-NPs exerted an atheroprotective effect by decreasing the immune cell infiltration in aortic lesions.

Scavenger receptors

A number of teams have developed ligand-conjugated contrast agents recognizing over-expressed receptors in lesions. These should accumulate at higher concentrations on the site of injury than the naked contrast agent. CD204, CD206, CD163, LOX-1, for example, have been targeted for molecular imaging of foam cells.

In 2007, Amirbekian *et al.* assessed the ability of macrophage scavenger receptor (MSR, CD204)-targeted micelles to detect macrophages in atherosclerotic plaque by MRI *in vivo* in ApoE^{-/-} mice.⁹⁷ Immunomicelles (size = 107 nm) were loaded with Gadolinium and provided, 24h after their injection, an average aortic MRI signal enhancement of 79% compared to 34% when using untargeted micelles.⁹⁷ CD163 is also a typical marker of the anti-inflammatory M2 macrophages subtype, it is a membrane receptor that functions as a hemoglobin (Hb)-scavenger receptor. Its expression is increased at inflammatory sites, pointing at the presence of intraplaque hemorrhagic sites or asymptomatic plaques. A targeted probe, based on gold-coated iron oxide nanoparticles, and conjugated to a rabbit polyclonal anti-mouse CD163 antibody via Protein G coating, was engineered for the detection of CD163 by MRI.⁹⁸ Upon *in vivo* injection in ApoE^{-/-} mice, the targeted probe seemed to accumulate over time in the abdominal aorta with a maximum between 24 and 48 hours after injection.

More recently, Senders *et al* developed a multiparametric PET/MRI phenotyping of atherosclerosis using three camelid single-domain antibody fragments (nanobodies), one directed against VCAM-1 and two other targeting the scavenger receptors, macrophage mannose receptor (MMR or CD206) and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1).⁹⁹ Nanobodies are the smallest antigen-binding fragments (12-15 kDa) derived from heavy-chain-only antibodies naturally occurring in camelids. The three nanobodies, radiolabeled with copper 64 (⁶⁴Cu) and injected in ApoE^{-/-} mice, showed accumulation in the aortic root and arch where advanced lesions develop by *in vivo* microPET/CT imaging, that was further confirmed *ex vivo*. Moreover, the markedly decreased size of nanobodies (12-15kDa) facilitates a blood clearance shorter than 2 min, which is a clear advantage for PET imaging. In atherosclerotic rabbits, *in vivo* PET/MRI readouts and *ex vivo* analyses showed the MMR nanobody to have better discriminating potential between diseased and atherosclerosis-free segments. In a PET/MRI atherosclerosis progression study, the MMR nanobody was labelled with the shorter-lived isotope gallium-68 (⁶⁸Ga) to follow macrophage burden longitudinally in rabbits with 4 and 8 months high-fat diet. Multiparametric ⁶⁸Ga-MMR PET/MRI was preceded by ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-NaF PET to evaluate inflammation and microcalcifications. A gradual increase in ¹⁸F-FDG and ⁶⁸Ga-MMR PET signal intensities was observed in the aorta as disease progressed, whereas a significant increase only appeared after 8 months for ¹⁸F-NaF. Different uptake locations were also noted between the 3 tracers, underlying the complex relationships existing among inflammation, macrophage phenotype and microcalcification.

Somatostatin receptors

An alternative PET tracer targeting atherosclerotic inflammation is ⁶⁸Ga-DOTATATE ([1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid]-d-Phe(1),Tyr(3)-octreotate) which has high, specific binding affinity for the somatostatin receptor sub-type-2, SSTR2 (≈0.2 nmol/L), which is upregulated on the cell surface of activated macrophages.¹⁰⁰ This PET tracer was used clinically for neuroendocrine tumor imaging, and when compared to ¹⁸F-FDG PET imaging in 42 patients with atherosclerosis, offered superior coronary imaging, excellent macrophage specificity, and better power to discriminate high-risk versus low-risk coronary lesions.¹⁰¹

Translocator protein

The translocator receptor (TSPO) is a mitochondrial membrane protein, of as yet uncertain function, increasingly being utilized as a molecular target for the *in vivo* PET imaging, based upon its high expression on macrophages in a variety of inflammatory diseases.¹⁰² Recently, its role in negative regulation of inflammatory responses in macrophages has been proposed.¹⁰³ First (¹¹C-PK11195)¹⁰⁴, second (¹⁸F-FEMPA)¹⁰⁵ and third-generation TSPO tracers (¹⁸F-GE180)¹⁰⁶ were developed to target culprit carotid plaques. However, their clinical interest remains to be confirmed.

Osteopontin

Osteopontin (OPN) is a secreted biomarker associated with foamy macrophages¹⁰⁷, highly represented within vulnerable lesions. A bimodal photoluminescence and MR imaging modality using osteopontin-specific upconversion nanoprobe (UCNP) was thus implemented to distinguish vulnerable from stable plaques in an ApoE^{-/-} mouse model of varied shear stress-induced plaques.¹⁰⁸ The probe was constructed by covalent attachment of an OPN antibody to Yb,Er-doped, Gd-based nanoparticles (NaGdF₄:Yb,Er) that present unique optical and intrinsic paramagnetic properties: the upconversion luminescence is characterized by high photostability, multiwavelength emission. Lanthanide UCNPs can be excited in the tissue-transparent infrared region and produce photoluminescent emissions in the visible range.¹⁰⁶ Upon injection, upconversion optical imaging revealed that the signals of vulnerable and stable plaques, induced by lowered and oscillatory shear stress, presented significantly different signal intensities, both through optical and MR imaging. (Figure 5) This study provides a possible way for differential diagnosis of atherosclerotic plaques via the quantitative/semiquantitative detection of OPN expression through imaging.

Annexin V

Annexin V closely correlates with the amount of macrophages and the degree of apoptosis within a plaque.¹⁰⁹ A hybrid SPECT/MRI probe was constructed by covering USPIO by aminated and carboxylated PEG simultaneously, then functionalizing it with diethylenetriaminepentacetate acid for (99m)Tc coordination and finally with Annexin V for targeting apoptotic macrophages.¹¹⁰ Intense radioactive signals detected by SPECT facilitated focus recognition and quantification, while USPIO-based T2-weighted MRI improved the focal localization and volumetry of plaques.

Non-immune cell imaging

Beyond their role as an interface between blood (or lymph) and tissues, endothelial cells (EC) bear multiple biological roles such as molecule filtration, modulation of hemostasis, leukocyte recruitment, hormonal signaling, and blood vessels tone (vasoconstriction/dilatation), in collaboration with vascular smooth muscle cells (SMC). Upon injury or inflammation, activated EC express molecules such as fibronectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin (CD62E), P-selectin (CD62P) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106). These adhesion molecules have been at the forefront, because their upregulation is a sign of an early event. The monocyte endothelial binding mechanism represents an opportunity to exploit both cell adhesion molecules and selectins on the activated endothelium as targets to directly report arterial endothelial activation and inflammation.¹¹¹ Moreover, the vitronectin receptor (integrin $\alpha\beta$ 3, CD51/CD61), expressed on activated endothelial cells, is particularly encountered in neovascularization that occurred in instable atherosclerotic plaques. It is also highly expressed by activated macrophages that mediate the inflammatory process. EC also share a role with smooth muscle cells (SMC) in LDL modifications through mechanisms involving the action of phospholipases¹¹², and the generation of free radicals¹¹³ by transition metals.¹¹⁴ Vascular SMC, in addition to their role in intimal thickening, secrete proteoglycans,

collagen and elastic fibers of the extracellular matrix, which participate in LDL retention as well as remodeling of the vascular wall.¹¹⁵

Integrin $\alpha\beta 3$

Arginine–glycine–aspartic acid (RGD) analogs bind to the vitronectin receptor and thus represent a tool for the targeting of activated endothelial cells. Microbubbles (MBs) targeted to the $\alpha\beta 3$ -integrin via cyclic RGD were evaluated for monitoring vascular healing after vessel injury following balloon angioplasty, which may induce vascular smooth muscle cell activation, and subsequent re-endothelialization, with $\alpha\beta 3$ -integrin expression.¹¹⁶ Yoo *et al*¹¹⁷ took advantage of RGD dimer peptides conjugated to ^{99m}Tc to visualize neoangiogenic events in murine atherosclerotic aortas by SPECT/CT. Using the ⁶⁴Cu PET-labeled, divalent knottin miniprotein, which targets the $\alpha\beta 3$ receptor, Jiang *et al*¹¹⁸ successfully imaged atherosclerotic lesions in the carotid artery. Immunostaining confirmed integrin $\alpha\beta 3$ expression in both the infiltrating macrophages and the neovasculature of atherosclerotic plaques. However, it needs to be noted that RGD peptides and analogs will also bind platelets, which also have the vitronectin receptor, and the RGD-binding $\alpha IIb\beta 3$.

ICAM-1

In a study by Paulis *et al.*, a paramagnetic Gd-liposome (100 nm) contrast agent was functionalized with a rodent antibody targeting ICAM-1. Its ability to bind endothelial cells relied on their ICAM-1-expression level *in vitro*, and was retained under physiological flow conditions. This contrast agent, presenting high longitudinal and transversal relaxivities should provide a good contrast between inflamed and resting endothelial cells, even in the challenging environment encountered in the circulation.¹¹⁹

Natriuretic peptide receptors (NPRs)

Natriuretic peptides are a family of heart- and vessel-derived hormones that play an important role in cardiovascular homeostasis by interacting with their corresponding NPRs. NPR, which is highly expressed in smooth muscle cells and endothelial cells, is a biomarker for carotid plaque vulnerability and progression. Recent studies include the use of polymeric nanoparticles labeled with ⁶⁴Cu radiotracer and conjugated with c-atrial natriuretic peptide (CANF).¹²⁰ The ⁶⁴Cu-CANF-comb nanoparticle containing 25% CANF significantly improved targeting specificity and sensitivity of PET imaging.

VCAM-1

Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 is expressed and upregulated in endothelial cells, macrophages, and smooth muscle cells within atherosclerotic plaques. One of the first studies targeting VCAM-1 developed a ¹⁸F-labeled peptide which was internalized by endothelial cells through VCAM-1–mediated binding. This ¹⁸F-labeled peptide permitted non-invasive PET-CT imaging of inflammatory atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice.¹²¹ Multifunctional nanoparticles

targeting VCAM-1 via its internalizing sequence, VHPKQHR (VHPK peptide), were also used to deliver antiatherogenic therapeutics to inflamed, pro-atherogenic regions. Vascular endothelial cells respond to blood-flow perturbations through mechano-sensors. Kheirloom *et al* created coated, cationic lipoparticles (CCLs), containing anti-miR-712 mechanosensitive miRNA within the core and with a neutral coating decorated with the VHPK peptide.¹²² Optical imaging validated disease-specific accumulation by conjugating anti-miR-712 with Alexa555. A lower dose (80%) of VHPK-CCL-anti-miR-712 prevented atheroma formation in a mouse model of atherosclerosis compared to the naked anti-miR-712. The anti-miR-712 rescued the expression of its target genes, such as tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3), resulting in the inhibition of metalloproteinase activity. In an MRI modality, Michalska *et al*.¹²³ developed USPIOs (diameter \approx 26 nm) conjugated to a cyclic peptide specifically recognizing VCAM-1, and demonstrated their capability to visualize atherosclerotic plaques in an ultra-high magnetic field (17.6 T).

More recently, antibodies from camel or human origin came to the forefront to target VCAM-1 overexpressing cells. Recombinant antibodies might evolve into an important research tool for targeted imaging of atherosclerotic lesions and have the potential for fast clinical translation. Indeed, they can be selected to cross-react with different species and are less immunogenic than classical murine antibodies. Moreover, single-chain variable (scFv) antibody fragments (32-35 kDa, composed of variable regions from heavy and light chains of antibodies) and nanobodies (the smallest antigen-binding fragments (12 -15 kDa) derived from heavy-chains camel antibodies) have more favorable characteristics than whole IgG antibodies for imaging purposes. Because of their smaller size, they present a faster blood clearance. Liu *et al* labeled a scFv recognizing mouse and rabbit VCAM-1 antigen¹²⁴ with ^{99m}Tc and a fluorescent dye and applied them to mouse and rabbit models of atherosclerosis to investigate its potential for early diagnosis and evaluation of atherosclerosis. Furthermore, nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for translational purposes have been developed for nuclear imaging of atherosclerotic lesions.¹²⁵ Advantages of the selected lead anti-VCAM-1 nanobody (cAbVCAM-1-5) labeled with ^{99m}Tc over ¹⁸F-4V (¹⁸F-labeled VHPK peptide)¹²¹ include a more than 40-fold higher affinity for VCAM-1. cAbVCAM-1-5 was further radiolabeled with ¹⁸F and injected in ApoE^{-/-} mice¹²⁶, allowing to successfully identify atherosclerotic lesions in the aortic arch using PET/CT imaging at 2.5 hours post-injection. High lesion-to-heart, lesion-to-blood, and lesion-to-control vessel ratios were obtained (12.4 ± 0.4 , 3.3 ± 0.4 , and 3.1 ± 0.6 , respectively).

Dual Selectins and VCAM-1 targeting

A synthetic polymeric carbohydrate called sLex (PAA-sLex) can be used to target P-selectin. Along with a monoclonal antibody to VCAM-1, MVCAM.A(429), it was jointly conjugated at the surface of microbubbles, and perfused *in vitro* through flow chambers. The latter were coated with recombinant mouse P-selectin and/or VCAM-1 and showed promise for molecular

imaging of atherosclerotic plaques at physiologically relevant shear stresses.¹²⁷ Another strategy was to use a dual targeting molecule against E-selectin and VCAM-1. Antibody-conjugated SPIO were able to render activated arterial endothelium visible by MRI *ex vivo* in human carotid plaques. In this setting, symptomatic carotid plaques could be discriminated from asymptomatic ones based on the degree of inflammation.¹²⁸

Thrombus imaging

The role of fibrin and platelets in the formation of a luminal thrombus, occurring after plaque rupture or erosion, that may precipitate myocardial infarction (typically resulting from vessel occlusion) or stroke (typically resulting from thromboembolism in the more peripheral vascular bed) is well documented. Besides its role in luminal thrombi, fibrin as well as fibrinogen and their degradation products were shown to be implicated in the development and progression of atherosclerotic plaque. Similarly, activated platelets, the most abundant cells in thrombi, are also highly represented within atherosclerotic lesions. Platelets are small, non-cellular elements of the blood, derived from the cytoplasmic fragmentation of megakaryocytes in the bone marrow. They adhere to damaged endothelium via von Willebrand factor (VWF)¹²⁹, leading to thrombosis. The role of platelets is not limited to thrombus formation, although platelets have only more recently been recognized as immune cells. Indeed, they were shown to bear pathogen recognition properties, to cross-talk with and recruit leukocytes to infection sites, and to modulate inflammation.¹³⁰ In atherosclerosis, their localization, as observed by Van Lammeren and colleagues¹³¹, was mainly associated to intraplaque hemorrhages, leaky micro-vessels and mural thrombi. More surprisingly, platelets were also observed outside micro-vessels, mainly in the shoulder regions of the plaque, suggesting that extravasation of platelets can occur without erythrocyte leakage. They are now recognized as key players in innate and adaptive immune responses.^{132, 133} Additionally, several cytokines released by activated platelets have been demonstrated to modulate monocyte and macrophage function. Moreover platelet–leukocyte interactions largely contribute to ox-LDL uptake and foam cell formation.^{134, 135} In a recent study, we underlined the presence of platelets not only in thrombi and intraplaque hemorrhage (IPH) but also in atheroma burden, around necrotic areas and neo-vessels, shedding light on the rationale for targeting platelets within atherosclerotic lesions.¹³⁶ Imaging of thrombi relies not only on fibrin detection, but also on platelet imaging, and more specifically their main glycoproteins.

Fibrin

Fibrin as a molecular target has also been at the center of attention, and several generations of anti-fibrin probes have been developed to image preclinical, small and large, animal models of carotid artery¹³⁷, coronary artery¹³⁸, atrial¹³⁹, and cerebral venous sinus thrombosis.¹⁴⁰ Makowski *et al*¹⁴¹ proposed the use of a well-established gadolinium-based fibrin-binding contrast agent, FTCA (EP-2104R, EPIX Pharmaceuticals) to provide positive contrast

enhancement of fibrin on the surface and in necrotic cores within the atheroma plaque, where fibrin is highly represented. This emphasizes the opportunity to target fibrin at all steps of atherogenesis, from early atherosclerosis imaging to rupture and luminal thrombosis. It highlights the potential value of FTCA in *in vivo* fibrin imaging during the course of plaque development, even before luminal thrombus formation.¹⁴² The same agent was tested in humans for the molecular MR imaging of intracardiac thrombi¹⁴³, offering a tool for imaging thrombi potentially responsible for strokes. Recently, new probes (FBP7 and FBP8) were radiolabeled with ⁶⁴Cu for PET/CT imaging and proved to be suitable for molecular imaging of thrombosis and thrombolysis *in vivo* in the Wistar rat thrombosis model and for providing, noninvasively, insight into clot composition.^{144, 145}

Integrin $\alpha v \beta 3$

Initial imaging of platelets in atherosclerosis used a radiolabeled RGD peptide to target the integrin $\alpha v \beta 3$. ¹⁸F-Galacto-RGD demonstrated specific uptake in atherosclerotic lesions of mouse aorta¹⁴⁶, and in stenotic lesions of patients scheduled for carotid endarterectomy.¹⁴⁷ However, RGD analogs target not only platelets but also activated endothelial cells in neovascularization areas and activated macrophages in inflammation, rendering difficult the interpretation of imaging.

P-selectin

Platelets have also been targeted using naturally-occurring ligands: the sulfated polysaccharide fucoidan has nanomolar affinity for P-selectin, a cell adhesion molecule highly expressed on the surface of activated platelets. In a recent study, Suzuki et al.¹⁴⁸ developed USPIO particles coated with fucoidan, and showed that MRI can detect platelet-rich thrombi as soon as 15 min after injection, with a high spatial resolution, in a rat elastase aneurysm model. In an imaging study by PET, Fucoidan was labeled with ⁶⁸Ga and tested for its potential to discriminate vulnerable plaques, in the ApoE^{-/-} mouse model of atherosclerosis.¹⁴⁹ Focal vascular uptake of the radiotracer colocalized with increased P-selectin expression at active plaques with thin fibrous caps and a high density of foam cells. Anatomic structures of plaque were confirmed by 17.6T MRI. Activated platelets can be found in plaques at early asymptomatic inflammation stages and during arterial thrombus formation after plaque rupture.^{135, 136, 150} As such, they represent a broad and valuable marker for atherosclerosis development. Platelet and endothelial P-selectin are both critical in the promotion of monocyte internalization, leading to plaque development. Consequently, Jacobin-Valat *et al.* developed versatile USPIO (VUSPIO) particles, labeled with rhodamine and coupled to an anti-human P-selectin antibody (VH10)¹⁵¹ that was evaluated *ex vivo* and *in vivo* in aortas from atherosclerotic ApoE^{-/-} mice.

Integrin $\alpha IIb \beta 3$

The $\alpha IIb \beta 3$ integrin (CD41/CD61) is the most abundant glycoprotein of platelets (up to 80,000 receptors per platelet), expressed on platelets and megakaryocytes only. During platelet

activation, the α IIb β 3 integrin undergoes both translocation of the pool contained in α -granules to the surface membrane, and conformational changes to a high-affinity state leading to the binding of fibrinogen and to platelet aggregation. Several groups used RGD analogs, which mimic binding epitopes of fibrinogen, to develop MRI, US or nuclear imaging modalities and perform molecular imaging of thrombi. For example, cyclic RGD modified microbubbles (MB-cRGDs) were developed for quantifying, by contrast video intensity, the α IIb β 3 integrin of platelets adhered on the atherosclerotic endothelium. Notably, α IIb β 3 coverage of the endothelium, as well as expression in the whole plaque, was associated with the vulnerability index and necrotic center to fiber cap ratio. However, RGD analogs are ligand mimetics that are not specific for α IIb β 3 integrin and do in particular recognize the vitronectin receptor (integrin α v β 3, CD51/CD61), a potential marker of endothelial activation, particularly in the neovascularization process, as typically seen in vulnerable atherosclerotic plaques.

A step further, human activated platelets that participate in the severe clinical manifestations of atherosclerosis were targeted by a recombinant human IgG4 antibody: rIgG4 TEG4, expressed in the baculovirus system, and grafted on iron-based nanoparticles.¹³⁶ This human antibody (HuAb), specific to the α IIb β 3 integrin, was selected using *in vitro* phage display biotechnology on activated platelets.¹⁵² After validation of the maintenance of the bioactivity by transmitted electron microscopy (TEM) and fluorescence, and following the grafting onto versatile superparamagnetic nanoparticles dedicated to MRI imaging, the targeted nano-object (TEG4-VUSPIO) was perfused into the left ventricle of ApoE^{-/-} mice. It was shown that TEG4-VUSPIO induced a loss in the MRI signal, generated by VUSPIO accumulation in the atherosclerotic vessel wall, only when the particle was antibody-targeted.

Importantly, TEG4-VUSPIO contrast agent highly labeled atherosclerotic sections of murine and human specimens *ex vivo*, highlighting the potential of this HuAb in translation from pre-clinical to clinical assays. However, the chemical functionalization was hard to proceed, time-consuming and an average of only one HuAb could be grafted per nanoparticle. To overcome these drawbacks and obtain a better conjugation ratio, scFv engineering was set up to reduce the probe size. scFv fragments were linked to the nanoparticle with a flexible peptide. The hydrodynamic diameter of scFv fragments (5 nm), one-fifth the size of whole IgG, is more suitable for functionalizing relatively small nanoparticles. Compared to much larger antibody formats such as Fab, Fab'2 and IgG, scFv have lower retention times in non-target tissues, exhibit more rapid blood clearance, and better penetration into targeted lesions.¹⁵³ The recombinant scFv format can be generated with tags for site-specific attachment via engineered thiols to avoid loss of bioactivity. TEG4 recombinant scFv was further processed in *Pichia pastoris*, which is an attractive system for low cost-effective, large-scale production of heterologous proteins.¹⁵⁴ This type of production, characterized by the secretion of the protein of interest into the culture medium, can be easily scaled up and reach a GRAS (Generally Recognized As Safe) status. The scFvs activated with the TCEP reagent were conjugated to the surface maleimides of the bimodal VUSPIO. The number of grafted antibodies was optimized in order to increase the avidity of the nano-objects without inducing

aggregation. Taking advantage of the nanoparticle bimodality, a quantification method developed for both NIRF and MRI modalities demonstrated a specific labeling of the atheroma plaques in ApoE-/- mice, both *ex vivo* and *in vivo*, highlighting the value of VUSPIO-TEG4 as a potential diagnosis agent (Larivière M et al, Multimodal Molecular Imaging Of Atherosclerosis: Nanoparticles Functionalized With scFv Fragments of an anti- α IIb β 3 Antibody. Accepted in Nanomedicine: NBM, soon available as an article in press). (Figure 6)

TEG4 was also formulated under the scFv-Fc format engineered with cysteines to functionalize the surface of 200 nm-size range oil-in-water nano-emulsions (NE) through maleimide PEG3400 phospholipids. The NEs were loaded with SPIOs of 18 nm core diameter in order to design an advanced molecular targeting nanoprobe for MRI and Magnetic Particle Imaging (MPI) imaging modalities. MPI is an emerging technique based on direct mapping of SPIOs which may advantageously complement MRI. This preliminary study provided the proof-of-concept of combining MRI/ MPI signals in a targeted nanoprobe for a specific imaging of the atheroma plaque.¹⁵⁵

Other scFv antibody fragments used for the specific targeting of α IIb β 3 integrin have been developed in an array of imaging technologies, including MRI, PET, SPECT and US.

An antibody, specifically targeting the ligand-induced binding site (LIBS) of the activated α IIb β 3 receptor of platelets, was either conjugated to lipid shell-based, gas-filled microbubbles¹⁵⁶, or labeled with ¹⁸F¹⁵⁷, or used to functionalize an MRI contrast agent consisting of magnetoliposomes.¹⁵⁸ Specific binding to the α IIb β 3 activated conformation was confirmed *ex vivo* on activated human platelets and cell lines expressing activated α IIb β 3, then *in vivo* in mice with FeCl₃-induced thrombus in the left carotid artery. The anti-LIBS scFv can also be used to monitor whether thrombolysis was successful, after the administration of therapeutic agents such as urokinase. A novel 'theranostic' technology, for the rapid, non-invasive diagnosis, and effective, bleeding-free treatment of thrombosis was also set up, by combining a recombinant fibrinolytic drug (single-chain urokinase plasminogen activators (scuPA)) and the anti-LIBS scFv *via* enzymatic linkage.¹⁵⁹ These theranostic microbubbles proved to be as effective in thrombolysis as commercial urokinase, without the prolongation of bleeding time provoked by the latter. Wang *et al*¹⁶⁰ used the targeting potential of another specific single-chain antibody SCE5, which selectively binds activated α IIb β 3¹⁶¹ (avoiding a prolonged bleeding time), to enrich the plasminogen activator scuPA at the site of platelet activation. (Figure 7)

More recently, in a first *in vivo* 3-dimensional Fluorescence Emission Computed Tomography (FLECT) study, the same group¹⁶² also demonstrated that SCE5/NIR-conjugates facilitated the detection of thrombi in the carotid artery, as well as emboli in the pulmonary artery.

GPVI

Platelet adhesion to atherosclerotic lesions is primarily mediated by the platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI (GPVI). Binding of collagen to GPVI receptor on platelets

favors their adhesion, activation and secretion. Targeted contrast-enhanced ultrasound (CEU) using microbubble agents was used as a diagnostic and therapeutic approach of the atherosclerotic disease.¹⁶³ Microbubbles vectorized with soluble recombinant GPVI-Fc fusion protein were intravenously administered to ApoE^{-/-} mice. CEU molecular imaging signals were substantially enhanced in the aortic arch and high frequency ultrasound-guided disruption of GPVI-targeted microbubbles were envisaged by the authors to potentially prevent progression.

von Willebrand factor

Platelet-endothelium interactions linked to increased inflammatory activation and prothrombotic state in atherosclerosis are mediated, in part, by platelet glycoprotein (GP) Iba. Shim *et al*¹⁶⁴ used microbubble contrast agents targeted to GPIb to perform contrast-enhanced ultrasound molecular imaging of LDLR^{-/-}/ApoBec-1^{-/-} mice from 10 (early fatty streak) to 40 weeks of age (large complex plaques without rupture) and demonstrated selective signal enhancement as early as 10 weeks of age, that increased with age. Molecular imaging with microbubbles targeted to the A1 domain of von Willebrand (VWF) factor also showed consistent signal enhancement at all time points, thus demonstrating widespread platelet-endothelium interaction in early atherosclerosis, in part mediated by VWF.

Imaging of components from the lesional microenvironment

Reactive oxygen species (ROS) are highly present in the vessel wall. They are usually formed as by-products of the normal metabolism by mitochondrial electron transport chain and bear important roles in cell signaling and homeostasis. The concerted action of NADPH oxidases and specific heme peroxidases such as MPO is indispensable for the accomplishment of the biological function.¹⁶⁵ The presence of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and paraoxonase, is meant to control ROS production and prevent any harmful effect. In the case of atherogenesis, vascular wall cells (EC, SMC) and infiltrating cells (monocytes, macrophages, lymphocytes, platelets), under the combined influence of hypercholesterolemia and inflammation, contribute to ROS production, overwhelming the ROS-detoxifying mechanisms, ultimately causing oxidative stress and leading to the oxidative modification of fatty acids, amino acids, lipoproteins and phospholipids¹⁶⁶, thereby generating oxidation-specific epitopes (OSE). The oxidation of low-density lipoprotein is a classic example of the consequences of a pro-oxidant and pro-inflammatory environment, with the generation of oxidized phospholipid (OxPL) and malondialdehyde (MDA) epitopes on LDL.¹⁶⁷

Oxidized Low-density lipoprotein (ox-LDL)

LDL are protein-lipid complexes, synthesized by the liver from cholesterol, apolipoproteins (Apo), phospholipids, triglycerides and liposoluble vitamins. They are the bloodstream-cholesterol carrier, allowing its distribution throughout the organism to be integrated into the cell membranes or to serve as a precursor for biomolecules synthesis. Although cholesterol is

mandatory for the organism to function, too much LDL-cholesterol has been proven to be harmful: its role in atherosclerosis is paramount and undisputed, and its serum level reduction is the first line of therapeutic intervention for the prevention of cardio-vascular events. Indeed, the initiating event of atherosclerosis seems to be the transport of LDL across the endothelium into the artery wall.

Early atherosclerotic lesions, called fatty streaks, develop as a result of lipid exposure to the oxidative environment of the artery wall. EC and SMC have been shown to be responsible for the primary oxidation of LDL¹¹³, leading to their internalization by monocytes, via several mechanisms. Minimally modified LDL (MM-LDL) seem to trigger early recruitment of monocytes into the subendothelial space and further lead their conversion into macrophages.^{168, 169} This in turn enriches the microenvironment in reactive oxygen species that turns MM-LDL, recognized by the LDL receptor (LDL-R) into highly oxidized LDL. Ox-LDL bind scavenger receptors (SRs) on the macrophages surface, triggering phagocytosis. When the macrophage elimination capacity is overwhelmed, cholesterol starts to accumulate as cholesteryl ester droplets in their cytosol, leading to the characteristic foam cell aspect.¹¹⁵ Eventually the surcharge causes many of these cells to die, contributing to the necrotic core of the plaque.¹⁷⁰ Interestingly, cholesterol-lowering therapies have proven efficient in reducing the occurrence of acute events in patients at risk¹⁷¹, which accounts for the role of atherogenic lipoproteins in the end-stages of the pathology as well.

Consequently, attractive targets for molecular imaging of atherosclerosis are structural neo-epitopes such as oxidation-specific epitopes (OSEs), because they exist at the intersection of oxidative stress, lipid metabolism, and inflammation.

Many researchers used oxidation-specific antibodies as ligands for contrast agents to assess oxidation of LDL in lipid-rich atherosclerotic lesions, a known feature of plaque activity and instability. Consecutively to their previous study⁷¹, Briley-Saebo *et al.* produced gadolinium micelles¹⁷², lipid-coated USPIOs (LUSPIO, size <20 nm), or SPIOs (LSPIOs, size <40 nm), targeted to either malondialdehyde (MDA)-lysine or oxidized phospholipid epitopes (ox-LDL) with antibodies¹⁷³ (murine E06, MDA2 Abs and human IK17 Ab). Considering issues related to biotransformation/retention of gadolinium over long time periods that might limit clinical use, iron oxide-based contrast agents, recognized as safe, have been prioritized for *in vivo* detection of vulnerable plaques by MRI. Twenty-four hours after bolus administration of a 3.9-mg Fe/kg dose in ApoE^{-/-} mice, MRI images were acquired using multiple gradient echo (GRE) sequences followed by GRASP sequences that do not provide anatomic information but are useful to differentiate between iron oxide deposition and artifacts (motion, partial voluming, and peri-vascular effects). Limited signal attenuation was observed after administration of LSPIOs, suggesting that they are too large to allow their optimal uptake into the arterial vessel wall and/or that their faster blood clearance constitutes a barrier to their diffusion into the vessel wall. On the contrary, significant signal loss was observed for E06 LUSPIOs that target

oxidized phospholipids and to a lesser extent for MDA2 and IK17 LUSPIOs that target MDA or MDA-like epitopes. (Figure 8)

Manganese may offer a potentially clinically transferable alternative to gadolinium-based agents, since cells are able to safely excrete intracellular Mn.¹⁷⁴ However, to be effective, high payloads of Mn must accumulate intracellularly in macrophages. Nguyen *et al* hypothesized that G8 dendrimers (768 MnDTPA per particle) targeted to OSE with the MDA2 antibody, would allow delivery of high Mn payloads, and enable significant *in vivo* detection of macrophage-rich plaques.¹⁷⁵ A signal enhancement of atherosclerotic lesions was observed within a 72-hour time period following administration of the targeted dendrimers in ApoE^{-/-} mice but with a decreased efficacy compared to micelles, maybe explained by a shorter circulation time. This may contribute to the decreased efficacy of the dendrimers relatively to micelles, and may be corrected by a PEGylation process. However, further studies need to be performed in order to evaluate the safety of the current formulation.

More recently, Senders *et al* developed novel PET probes making use of an antigen-binding fragment (Fab), the Fab LA25, obtained from an antibody library constructed from human fetal cord blood.¹⁷⁶ This antibody was selected against malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) epitopes. Using PET/MRI, the authors observed an approximately 32% increase in ⁸⁹Zr-LA25 uptake in the abdominal aorta of atherosclerotic rabbits relative to nonatherosclerotic rabbits. Furthermore, ⁸⁹Zr-LA25 accumulation correlated with vessel wall area measured by T2-weighted MR and rHDL NIRF intensity in aortas, possibly suggesting a certain degree of macrophage uptake. Binding and competition assays showed that LA25 substantially inhibited binding of MAA-LDL to macrophages, a property expected to be atheroprotective. The tracer, contrary to FDG, did not substantially accumulate within the myocardium.

Regarding the effect of anti-oxLDL antibody injection on atherogenesis, it should be kept in mind that whole autoantibodies may cause immune complexes that could contribute to increased foam cell formation and thus, enhanced progression of atherosclerosis.¹⁷⁷ This concept reinforces the interest of using antibody fragments for imaging. Oxidized LDL can exist as a complex with β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI), not only in antiphospholipid syndrome but also in the atherosclerotic disease. OxLDL/ β_2 GPI complexes may thus represent a metabolic product centrally relevant to atherogenesis.¹⁷⁸ An antibody-based PET probe, ⁶⁴Cu-³H₃-scFv, was developed by Sasaki *et al* for non-invasive pathophysiological assessment of oxLDL/ β_2 GPI complexes accumulated in atherosclerotic plaques.¹⁷⁹

Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) may constitute a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaques. Indeed, in atherosclerotic lesions, MPO is released by neutrophils, and interacts with the extracellular matrix to form hypochlorous acid from chloride anions and hydrogen peroxide.¹⁸⁰ The role of hypochlorous acid in the oxidation of HDL's major protein apolipoprotein A1 (ApoA1), which

greatly affects its function in atherosclerosis, has been well documented.¹⁸¹ Rashid *et al* employed the tandem stenosis model, useful for the formation of unstable plaques, and MPO-Gd administration, to allow distinguishing stable from unstable plaques that contain higher MPO activity.¹⁸² MPO-Gd was retained in plaques up to 60 min after injection, while Gd-DTPA used for comparison washed out more rapidly. Moreover, an unstable phenotype was significantly attenuated by both the 2-thioxanthine MPO inhibitor AZM198 treatment and deletion of the *Mpo* gene. Pharmacological inhibition of plaque MPO activity necessitates additional investigations into the pathways through which therapy may occur before translational evaluation.

Matrix metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMPs), a large family of calcium- and zinc-dependent proteases secreted by SMCs, ECs, and macrophages, play an important role in changes in the vessel scaffold.

An increased expression of inflammatory and destructive matrix metalloproteinases (eg, MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, -13, and disintegrin metallo- proteinases) in macrophages lining the lipid core, or in SMCs of the shoulder regions of plaques, have been linked to an augmented risk of rupture. For example, MMP9 produced by macrophages are overexpressed in vulnerable areas of plaques. A study enhancing this enzyme's expression was conducted in ApoE^{-/-} mice, showing an increased risk of plaque rupture.¹⁸³ A gadolinium-based MRI contrast agent (P947) was used to monitor the arterial wall remodeling in atherosclerotic rabbits.¹⁸⁴ P947-enhanced MRI can distinguish dietary-induced variations in MMP-related enzymatic activity within plaques. Imaging with microSPECT/CT and using RP782 (an ¹¹¹In-labeled tracer targeting activated MMPs), Razavian *et al*¹⁸⁵ demonstrated radioactivity uptake in the aorta and plaque area, as well as a reduction in MMP activity post treatment.

CONCLUSION

Encompassing all research conducted in the field of atherosclerosis imaging, it appears that a personalized approach for therapies fighting this pathology might be guided by molecular imaging. Biomarkers other than those described here may have great potential in atherosclerosis imaging. Identification of relevant biomarkers is the stepping-stone for an efficient molecular imaging using different modalities. Recent studies highlight the capacity of combining *in vivo* phage display (using a human combinatorial antibody library) and high-throughput biological screening on atheroma extracts¹⁸⁶ and/or *in silico* tracking of the most frequently used antibody sequences¹⁸⁷ to select potent and valuable antibody candidates. Further characterization of the targeted molecules by proteomic approaches would give new insights in *in vivo*-targetable, up-regulated biomarkers of atherosclerosis.

It is expected that improvement in efficient targeting of molecular and cellular events may likewise prompt better assessment and monitoring, leading to important reductions in CVDs. This is particularly true in the coronary arteries where noninvasive imaging faces its greatest

challenges due to motion and small target volumes. If the latest developments and achievements, successfully validated at the pre-clinical level, will be further validated in humans, those should provide valuable tools for atherosclerosis diagnosis. Considering this translational aspect, it should be pointed out that ligands used in the more recent studies for functionalizing nanoparticles, micelles or liposomes tend to be non-immunogenic ligands with a relatively small size and presenting cross-reactivity among different species, including humans. It is of note that this latter point could facilitate the translational process from pre-clinical to clinical studies. As an example, camelid nanobodies, human scFv or Fab are specifically developed to recognize biomarkers shared by animal models and humans. Additionally, if the developed diagnostic agents were to reach the clinics, the use of human-like antibodies should limit the risk of immunogenicity, saving the time that would be required for humanization of murine antibodies. Human antibodies¹⁷³, humanized or human Ab fragments^{152, 156, 161, 188, 176, 124} therefore represent a class of ligands that will be theoretically safer to transfer to the clinics.

As we begin to move from classical, global treatment of atherosclerosis (*e.g.*, aspirin and statins) to an era of personalization that requires highly expensive therapies, such as PCSK9 antagonists, anti-inflammatory drugs such as the anti-interleukin (IL)-1 β ¹⁸⁹ antibody canakinumab, we can anticipate that personalized, more expensive molecular imaging tools will arise in the years to come, in order to guide the choice of the right therapy and dosing regimen.

References

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P, American Heart Association Statistics C and Stroke Statistics S. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135:e146-e603.
2. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*. 2009;122:S3-s14.
3. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:C7-12.
4. Libby P and Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque'. *Eur Heart J*. 2015;36:2984-7.
5. Newby AC and Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*. 1999;41:345-60.
6. Matsuzawa Y, Hibi K, Saka K, Konishi M, Akiyama E, Nakayama N, Ebina T, Kosuge M, Iwahashi N, Maejima N, Tamura K and Kimura K. Association of endothelial function with thin-cap fibroatheroma as assessed by optical coherence tomography in patients with acute coronary syndromes. *Ther Clin Risk Manag*. 2019;15:285-291.

7. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK and Rajavashisth TB. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11201-6.
8. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP and Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2054-61.
9. Moreno PR, Purushothaman M and Purushothaman KR. Plaque neovascularization: defense mechanisms, betrayal, or a war in progress. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1254:7-17.
10. Guo M, Cai Y, Yao X and Li Z. Mathematical modeling of atherosclerotic plaque destabilization: Role of neovascularization and intraplaque hemorrhage. *J Theor Biol*. 2018;450:53-65.
11. Dweck MR, Aikawa E, Newby DE, Tarkin JM, Rudd JH, Narula J and Fayad ZA. Noninvasive Molecular Imaging of Disease Activity in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;119:330-40.
12. Arbab-Zadeh A and Fuster V. The myth of the "vulnerable plaque": transitioning from a focus on individual lesions to atherosclerotic disease burden for coronary artery disease risk assessment. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:846-855.
13. Bittencourt MS, Hulten E, Ghoshhajra B, O'Leary D, Christman MP, Montana P, Truong QA, Steigner M, Murthy VL, Rybicki FJ, Nasir K, Gowdak LH, Hainer J, Brady TJ, Di Carli MF, Hoffmann U, Abbara S and Blankstein R. Prognostic value of nonobstructive and obstructive coronary artery disease detected by coronary computed tomography angiography to identify cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7:282-91.
14. Taqueti VR, Hachamovitch R, Murthy VL, Naya M, Foster CR, Hainer J, Dorbala S, Blankstein R and Di Carli MF. Global coronary flow reserve is associated with adverse cardiovascular events independently of luminal angiographic severity and modifies the effect of early revascularization. *Circulation*. 2015;131:19-27.
15. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RA, Brown AJ, Tawakol A, Fayad ZA and Rudd JH. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:750-69.
16. Puri R, Worthley MI and Nicholls SJ. Intravascular imaging of vulnerable coronary plaque: current and future concepts. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:131-9.
17. Mintz GS. Clinical utility of intravascular imaging and physiology in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:207-22.
18. DeMaria AN, Narula J, Mahmud E and Tsimikas S. Imaging vulnerable plaque by ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:C32-9.
19. Ma T, Yu M, Li J, Munding CE, Chen Z, Fei C, Shung KK and Zhou Q. Multi-frequency intravascular ultrasound (IVUS) imaging. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2015;62:97-107.
20. Kotani J, Mintz GS, Castagna MT, Pinnow E, Berzinger CO, Bui AB, Pichard AD, Satler LF, Suddath WO, Waksman R, Laird JR, Jr., Kent KM and Weissman NJ. Intravascular ultrasound analysis of infarct-related and non-infarct-related arteries in patients who presented with an acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107:2889-93.
21. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J and Ueda M. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2004;110:3424-9.
22. Kubo T, Maehara A, Mintz GS, Doi H, Tsujita K, Choi SY, Katoh O, Nasu K, Koenig A, Pieper M, Rogers JH, Wijns W, Bose D, Margolis MP, Moses JW, Stone GW and Leon MB. The

- dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1590-7.
23. Motreff P, Rioufol G and Finet G. Seventy-four-month follow-up of coronary vulnerable plaques by serial gray-scale intravascular ultrasound. *Circulation*. 2012;126:2878-9.
24. Farooq V, Serruys PW, Heo JH, Gogas BD, Onuma Y, Perkins LE, Diletti R, Radu MD, Raber L, Bourantas CV, Zhang Y, van Remortel E, Pawar R, Rapoza RJ, Powers JC, van Beusekom HM, Garcia-Garcia HM and Virmani R. Intracoronary optical coherence tomography and histology of overlapping everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: the potential implications for clinical practice. *JACC Cardiovascular interventions*. 2013;6:523-32.
25. Jang IK, Bouma BE, Kang DH, Park SJ, Park SW, Seung KB, Choi KB, Shishkov M, Schlendorf K, Pomerantsev E, Houser SL, Aretz HT and Tearney GJ. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:604-9.
26. Uemura S, Ishigami K, Soeda T, Okayama S, Sung JH, Nakagawa H, Somekawa S, Takeda Y, Kawata H, Horii M and Saito Y. Thin-cap fibroatheroma and microchannel findings in optical coherence tomography correlate with subsequent progression of coronary atheromatous plaques. *Eur Heart J*. 2012;33:78-85.
27. Tearney GJ, Regar E, Akasaka T, Adriaenssens T, Barlis P, Bezerra HG, Bouma B, Bruining N, Cho JM, Chowdhary S, Costa MA, de Silva R, Dijkstra J, Di Mario C, Dudek D, Falk E, Feldman MD, Fitzgerald P, Garcia-Garcia HM, Gonzalo N, Granada JF, Guagliumi G, Holm NR, Honda Y, Ikeno F, Kawasaki M, Kochman J, Koltowski L, Kubo T, Kume T, Kyono H, Lam CC, Lamouche G, Lee DP, Leon MB, Maehara A, Manfrini O, Mintz GS, Mizuno K, Morel MA, Nadkarni S, Okura H, Otake H, Pietrasik A, Prati F, Raber L, Radu MD, Rieber J, Riga M, Rollins A, Rosenberg M, Sirbu V, Serruys PW, Shimada K, Shinke T, Shite J, Siegel E, Sonoda S, Suter M, Takarada S, Tanaka A, Terashima M, Thim T, Uemura S, Ughi GJ, van Beusekom HM, van der Steen AF, van Es GA, van Soest G, Virmani R, Waxman S, Weissman NJ, Weisz G and International Working Group for Intravascular Optical Coherence T. Consensus standards for acquisition, measurement, and reporting of intravascular optical coherence tomography studies: a report from the International Working Group for Intravascular Optical Coherence Tomography Standardization and Validation. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1058-72.
28. Zhu S, Yang Q, Antaris AL, Yue J, Ma Z, Wang H, Huang W, Wan H, Wang J, Diao S, Zhang B, Li X, Zhong Y, Yu K, Hong G, Luo J, Liang Y and Dai H. Molecular imaging of biological systems with a clickable dye in the broad 800- to 1,700-nm near-infrared window. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:962-967.
29. Gallino A, Stuber M, Crea F, Falk E, Corti R, Lekakis J, Schwitter J, Camici P, Gaemperli O, Di Valentino M, Prior J, Garcia-Garcia HM, Vlachopoulos C, Cosentino F, Windecker S, Pedrazzini G, Conti R, Mach F, De Caterina R and Libby P. "In vivo" imaging of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;224:25-36.
30. Phinikaridou A, Andia ME, Lacerda S, Lorrio S, Makowski MR and Botnar RM. Molecular MRI of atherosclerosis. *Molecules*. 2013;18:14042-69.
31. Corti R and Fuster V. Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*. 2011;32:1709-19b.
32. Hatsukami TS and Yuan C. MRI in the early identification and classification of high-risk atherosclerotic carotid plaques. *Imaging in medicine*. 2010;2:63-75.

33. Kramer CM and Anderson JD. MRI of atherosclerosis: diagnosis and monitoring therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5:69-80.
34. Silvera SS, Aidi HE, Rudd JH, Mani V, Yang L, Farkouh M, Fuster V and Fayad ZA. Multimodality imaging of atherosclerotic plaque activity and composition using FDG-PET/CT and MRI in carotid and femoral arteries. *Atherosclerosis.* 2009;207:139-43.
35. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, Johnstrom P, Davenport AP, Kirkpatrick PJ, Arch BN, Pickard JD and Weissberg PL. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation.* 2002;105:2708-11.
36. Wenning C, Kloth C, Kuhlmann MT, Jacobs AH, Schober O, Hermann S and Schafers MA. Serial F-18-FDG PET/CT distinguishes inflamed from stable plaque phenotypes in shear-stress induced murine atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;234:276-82.
37. Huet P, Burg S, Le Guludec D, Hyafil F and Buvat I. Variability and uncertainty of 18F-FDG PET imaging protocols for assessing inflammation in atherosclerosis: suggestions for improvement. *J Nucl Med.* 2015;56:552-9.
38. Blomberg BA, Thomassen A, Takx RA, Hildebrandt MG, Simonsen JA, Buch-Olsen KM, Diederichsen AC, Mickley H, Alavi A and Hoiland-Carlson PF. Delayed (1)(8)F-fluorodeoxyglucose PET/CT imaging improves quantitation of atherosclerotic plaque inflammation: results from the CAMONA study. *J Nucl Cardiol.* 2014;21:588-97.
39. Mazurek T, Kobylecka M, Zielenkiewicz M, Kurek A, Kochman J, Filipiak KJ, Mazurek K, Huczek Z, Krolicki L and Opolski G. PET/CT evaluation of (18)F-FDG uptake in pericoronary adipose tissue in patients with stable coronary artery disease: Independent predictor of atherosclerotic lesions' formation? *J Nucl Cardiol.* 2017;24:1075-1084.
40. Tahara N, Mukherjee J, de Haas HJ, Petrov AD, Tawakol A, Haider N, Tahara A, Constantinescu CC, Zhou J, Boersma HH, Imaizumi T, Nakano M, Finn A, Fayad Z, Virmani R, Fuster V, Bosca L and Narula J. 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-mannose positron emission tomography imaging in atherosclerosis. *Nat Med.* 2014;20:215-9.
41. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan CM, Croce K and Aikawa E. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2013;113:72-7.
42. Irkle A, Vesey AT, Lewis DY, Skepper JN, Bird JL, Dweck MR, Joshi FR, Gallagher FA, Warburton EA, Bennett MR, Brindle KM, Newby DE, Rudd JH and Davenport AP. Identifying active vascular microcalcification by (18)F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat Commun.* 2015;6:7495.
43. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, Yeoh SE, Wallace W, Salter D, Fletcher AM, van Beek EJ, Flapan AD, Uren NG, Behan MW, Cruden NL, Mills NL, Fox KA, Rudd JH, Dweck MR and Newby DE. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet.* 2014;383:705-13.
44. Oliveira-Santos M, Castelo-Branco M, Silva R, Gomes A, Chichorro N, Abrunhosa A, Donato P, Pedroso de Lima J, Pego M, Goncalves L and Ferreira MJ. Atherosclerotic plaque metabolism in high cardiovascular risk subjects - A subclinical atherosclerosis imaging study with (18)F-NaF PET-CT. *Atherosclerosis.* 2017;260:41-46.
45. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M and Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation.* 2007;116:2841-50.

46. Ye YX, Calcagno C, Binderup T, Courties G, Keliher EJ, Wojtkiewicz GR, Iwamoto Y, Tang J, Perez-Medina C, Mani V, Ishino S, Johnbeck CB, Knigge U, Fayad ZA, Libby P, Weissleder R, Tawakol A, Dubey S, Belanger AP, Di Carli MF, Swirski FK, Kjaer A, Mulder WJ and Nahrendorf M. Imaging Macrophage and Hematopoietic Progenitor Proliferation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2015;117:835-45.
47. Chen J, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, Huang PL and Weissleder R. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:2766-71.
48. Lin SA, Patel M, Suresch D, Connolly B, Bao B, Groves K, Rajopadhye M, Peterson JD, Klimas M, Sur C and Bednar B. Quantitative Longitudinal Imaging of Vascular Inflammation and Treatment by Ezetimibe in apoE Mice by FMT Using New Optical Imaging Biomarkers of Cathepsin Activity and alpha(v)beta(3) Integrin. *Int J Mol Imaging.* 2012;2012:189254.
49. Jaffer FA, Calfon MA, Rosenthal A, Mallas G, Razansky RN, Mauskopf A, Weissleder R, Libby P and Ntziachristos V. Two-dimensional intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of inflammation in atherosclerosis and stent-induced vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:2516-26.
50. Suter MJ, Nadkarni SK, Weisz G, Tanaka A, Jaffer FA, Bouma BE and Tearney GJ. Intravascular optical imaging technology for investigating the coronary artery. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4:1022-39.
51. Yoneya S, Saito T, Komatsu Y, Koyama I, Takahashi K and Duvoll-Young J. Binding properties of indocyanine green in human blood. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:1286-90.
52. Wang H, Gardecki JA, Ughi GJ, Jacques PV, Hamidi E and Tearney GJ. Ex vivo catheter-based imaging of coronary atherosclerosis using multimodality OCT and NIRAF excited at 633 nm. *Biomed Opt Express.* 2015;6:1363-75.
53. Ughi GJ, Wang H, Gerbaud E, Gardecki JA, Fard AM, Hamidi E, Vacas-Jacques P, Rosenberg M, Jaffer FA and Tearney GJ. Clinical Characterization of Coronary Atherosclerosis With Dual-Modality OCT and Near-Infrared Autofluorescence Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2016;9:1304-1314.
54. Haka AS, Kramer JR, Dasari RR and Fitzmaurice M. Mechanism of ceroid formation in atherosclerotic plaque: in situ studies using a combination of Raman and fluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt.* 2011;16:011011.
55. Malencik DA and Anderson SR. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids.* 2003;25:233-47.
56. Yang YL, Ye YM, Li FM, Li YF and Ma PZ. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin. *Lasers Surg Med.* 1987;7:528-32.
57. Weissleder R and Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology.* 2001;219:316-33.
58. Stein-Merlob AF, Hara T, McCarthy JR, Mauskopf A, Hamilton JA, Ntziachristos V, Libby P and Jaffer FA. Atheroma Susceptible to Thrombosis Exhibit Impaired Endothelial Permeability In Vivo as Assessed by Nanoparticle-Based Fluorescence Molecular Imaging. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2017;10.
59. Vinegoni C, Botnaru I, Aikawa E, Calfon MA, Iwamoto Y, Folco EJ, Ntziachristos V, Weissleder R, Libby P and Jaffer FA. Indocyanine green enables near-infrared fluorescence imaging of lipid-rich, inflamed atherosclerotic plaques. *Science translational medicine.* 2011;3:84ra45.

60. Hara T, Ughi GJ, McCarthy JR, Erdem SS, Mauskopf A, Lyon SC, Fard AM, Edelman ER, Tearney GJ and Jaffer FA. Intravascular fibrin molecular imaging improves the detection of unhealed stents assessed by optical coherence tomography in vivo. *Eur Heart J*. 2015.
61. Khamis RY, Woollard KJ, Hyde GD, Boyle JJ, Bicknell C, Chang SH, Malik TH, Hara T, Mauskopf A, Granger DW, Johnson JL, Ntziachristos V, Matthews PM, Jaffer FA and Haskard DO. Near Infrared Fluorescence (NIRF) Molecular Imaging of Oxidized LDL with an Autoantibody in Experimental Atherosclerosis. *Scientific reports*. 2016;6:21785.
62. Yoo H, Kim JW, Shishkov M, Namati E, Morse T, Shubochkin R, McCarthy JR, Ntziachristos V, Bouma BE, Jaffer FA and Tearney GJ. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nat Med*. 2011;17:1680-4.
63. Lee S, Lee MW, Cho HS, Song JW, Nam HS, Oh DJ, Park K, Oh WY, Yoo H and Kim JW. Fully integrated high-speed intravascular optical coherence tomography/near-infrared fluorescence structural/molecular imaging in vivo using a clinically available near-infrared fluorescence-emitting indocyanine green to detect inflamed lipid-rich atheromata in coronary-sized vessels. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014;7:560-9.
64. Kim S, Lee MW, Kim TS, Song JW, Nam HS, Cho HS, Jang SJ, Ryu J, Oh DJ, Gweon DG, Park SH, Park K, Oh WY, Yoo H and Kim JW. Intracoronary dual-modal optical coherence tomography-near-infrared fluorescence structural-molecular imaging with a clinical dose of indocyanine green for the assessment of high-risk plaques and stent-associated inflammation in a beating coronary artery. *Eur Heart J*. 2016;37:2833-2844.
65. Verjans JW, Osborn EA, Ughi GJ, Calfon Press MA, Hamidi E, Antoniadis AP, Papafaklis MI, Conrad MF, Libby P, Stone PH, Cambria RP, Tearney GJ and Jaffer FA. Targeted Near-Infrared Fluorescence Imaging of Atherosclerosis: Clinical and Intracoronary Evaluation of Indocyanine Green. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016;9:1087-95.
66. Millon A, Dickson SD, Klink A, Izquierdo-Garcia D, Bini J, Lancelot E, Ballet S, Robert P, Mateo de Castro J, Corot C and Fayad ZA. Monitoring plaque inflammation in atherosclerotic rabbits with an iron oxide (P904) and (18)F-FDG using a combined PET/MR scanner. *Atherosclerosis*. 2013;228:339-45.
67. Tabas I, Garcia-Cardena G and Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *The Journal of cell biology*. 2015;209:13-22.
68. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z and Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 2014;114:1640-60.
69. Cole JE, Park I, Ahern DJ, Kassiteridi C, Danso Abeam D, Goddard ME, Green P, Maffia P and Monaco C. Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity. *Cardiovasc Res*. 2018;114:1360-1371.
70. Moore KJ, Sheedy FJ and Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:709-21.
71. Briley-Saebo KC, Mani V, Hyafil F, Cornily JC and Fayad ZA. Fractionated Feridex and positive contrast: in vivo MR imaging of atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2008;59:721-30.
72. Briley-Saebo KC, Amirbekian V, Mani V, Aguinaldo JG, Vucic E, Carpenter D, Amirbekian S and Fayad ZA. Gadolinium mixed-micelles: effect of the amphiphile on in vitro and in vivo efficacy in apolipoprotein E knockout mouse models of atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2006;56:1336-46.
73. Maiseyeu A, Mihai G, Kampfrath T, Simonetti OP, Sen CK, Roy S, Rajagopalan S and Parthasarathy S. Gadolinium-containing phosphatidylserine liposomes for molecular imaging of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50:2157-63.

74. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJ and van Engelshoven JM. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;107:2453-8.
75. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, JM UK-I, Li ZY, Walsh SR, Brown AP, Kirkpatrick PJ, Warburton EA, Hayes PD, Varty K, Boyle JR, Gaunt ME, Zalewski A and Gillard JH. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:2039-50.
76. van Heeswijk RB, Pellegrin M, Fogel U, Gonzales C, Aubert JF, Mazzolai L, Schwitter J and Stuber M. Fluorine MR Imaging of Inflammation in Atherosclerotic Plaque in Vivo. *Radiology*. 2015;275:421-9.
77. Chhour P, Naha PC, O'Neill SM, Litt HI, Reilly MP, Ferrari VA and Cormode DP. Labeling monocytes with gold nanoparticles to track their recruitment in atherosclerosis with computed tomography. *Biomaterials*. 2016;87:93-103.
78. Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, Otani H, Takahashi M, Murata K, Shiomi M, Tabata Y and Nohara S. Atherosclerotic imaging using 4 types of superparamagnetic iron oxides: new possibilities for mannan-coated particles. *Eur J Radiol*. 2013;82:1919-25.
79. Tu C, Ng TS, Jacobs RE and Louie AY. Multimodality PET/MRI agents targeted to activated macrophages. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 2014;19:247-58.
80. Keliher EJ, Ye YX, Wojtkiewicz GR, Aguirre AD, Tricot B, Senders ML, Groenen H, Fay F, Perez-Medina C, Calcagno C, Carlucci G, Reiner T, Sun Y, Courties G, Iwamoto Y, Kim HY, Wang C, Chen JW, Swirski FK, Wey HY, Hooker J, Fayad ZA, Mulder WJ, Weissleder R and Nahrendorf M. Polyglucose nanoparticles with renal elimination and macrophage avidity facilitate PET imaging in ischaemic heart disease. *Nature communications*. 2017;8:14064.
81. Skajaa T, Cormode DP, Falk E, Mulder WJ, Fisher EA and Fayad ZA. High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:169-76.
82. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2014;103:341-9.
83. Cormode DP, Frias JC, Ma Y, Chen W, Skajaa T, Briley-Saebo K, Barazza A, Williams KJ, Mulder WJ, Fayad ZA and Fisher EA. HDL as a contrast agent for medical imaging. *Clin Lipidol*. 2009;4:493-500.
84. Cormode DP, Skajaa T, van Schooneveld MM, Koole R, Jarzyna P, Lobatto ME, Calcagno C, Barazza A, Gordon RE, Zanzonico P, Fisher EA, Fayad ZA and Mulder WJ. Nanocrystal core high-density lipoproteins: a multimodality contrast agent platform. *Nano Lett*. 2008;8:3715-23.
85. Fay F, Sanchez-Gaytan BL, Cormode DP, Skajaa T, Fisher EA, Fayad ZA and Mulder WJ. Nanocrystal Core Lipoprotein Biomimetics for Imaging of Lipoproteins and Associated Diseases. *Current cardiovascular imaging reports*. 2013;6:45-54.
86. Kuai R, Li D, Chen YE, Moon JJ and Schwendeman A. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*. 2016;10:3015-41.
87. Duivenvoorden R, Tang J, Cormode DP, Mieszawska AJ, Izquierdo-Garcia D, Ozcan C, Otten MJ, Zaidi N, Lobatto ME, van Rijs SM, Priem B, Kuan EL, Martel C, Hewing B, Sager H, Nahrendorf M, Randolph GJ, Stroes ES, Fuster V, Fisher EA, Fayad ZA and Mulder WJ. A statin-

loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature communications*. 2014;5:3065.

88. Sanchez-Gaytan BL, Fay F, Lobatto ME, Tang J, Ouimet M, Kim Y, van der Staay SE, van Rijs SM, Priem B, Zhang L, Fisher EA, Moore KJ, Langer R, Fayad ZA and Mulder WJ. HDL-mimetic PLGA nanoparticle to target atherosclerosis plaque macrophages. *Bioconjug Chem*. 2015;26:443-51.

89. Tang J, Baxter S, Menon A, Alaarg A, Sanchez-Gaytan BL, Fay F, Zhao Y, Ouimet M, Braza MS, Longo VA, Abdel-Atti D, Duivenvoorden R, Calcagno C, Storm G, Tsimikas S, Moore KJ, Swirski FK, Nahrendorf M, Fisher EA, Perez-Medina C, Fayad ZA, Reiner T and Mulder WJ. Immune cell screening of a nanoparticle library improves atherosclerosis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E6731-E6740.

90. Perez-Medina C, Binderup T, Lobatto ME, Tang J, Calcagno C, Giesen L, Wessel CH, Witjes J, Ishino S, Baxter S, Zhao Y, Ramachandran S, Eldib M, Sanchez-Gaytan BL, Robson PM, Bini J, Granada JF, Fish KM, Stroes ES, Duivenvoorden R, Tsimikas S, Lewis JS, Reiner T, Fuster V, Kjaer A, Fisher EA, Fayad ZA and Mulder WJ. In Vivo PET Imaging of HDL in Multiple Atherosclerosis Models. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2016;9:950-61.

91. Zheng KH, van der Valk FM, Smits LP, Sandberg M, Dasseux JL, Baron R, Barbaras R, Keyserling C, Coolen BF, Nederveen AJ, Verberne HJ, Nell TE, Vugts DJ, Duivenvoorden R, Fayad ZA, Mulder WJ, van Dongen GA and Stroes ES. HDL mimetic CER-001 targets atherosclerotic plaques in patients. *Atherosclerosis*. 2016;251:381-8.

92. El-Dakdouki MH, El-Boubbou K, Kamat M, Huang R, Abela GS, Kiupel M, Zhu DC and Huang X. CD44 targeting magnetic glyconanoparticles for atherosclerotic plaque imaging. *Pharm Res*. 2014;31:1426-37.

93. Hagg D, Sjoberg S, Hulten LM, Fagerberg B, Wiklund O, Rosengren A, Carlsson LM, Boren J, Svensson PA and Krettek A. Augmented levels of CD44 in macrophages from atherosclerotic subjects: a possible IL-6-CD44 feedback loop? *Atherosclerosis*. 2007;190:291-7.

94. Kamat M, El-Boubbou K, Zhu DC, Lansdell T, Lu X, Li W and Huang X. Hyaluronic acid immobilized magnetic nanoparticles for active targeting and imaging of macrophages. *Bioconjug Chem*. 2010;21:2128-35.

95. Liu L, He H, Zhang M, Zhang S, Zhang W and Liu J. Hyaluronic acid-decorated reconstituted high density lipoprotein targeting atherosclerotic lesions. *Biomaterials*. 2014;35:8002-14.

96. Beldman TJ, Senders ML, Alaarg A, Perez-Medina C, Tang J, Zhao Y, Fay F, Deichmoller J, Born B, Desclos E, van der Wel NN, Hoebe RA, Kohen F, Kartvelishvily E, Neeman M, Reiner T, Calcagno C, Fayad ZA, de Winther MPJ, Lutgens E, Mulder WJM and Kluza E. Hyaluronan Nanoparticles Selectively Target Plaque-Associated Macrophages and Improve Plaque Stability in Atherosclerosis. *ACS Nano*. 2017;11:5785-5799.

97. Amirbekian V, Lipinski MJ, Briley-Saebo KC, Amirbekian S, Aguinaldo JG, Weinreb DB, Vucic E, Frias JC, Hyafil F, Mani V, Fisher EA and Fayad ZA. Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:961-6.

98. Tarin C, Carril M, Martin-Ventura JL, Markuerkiaga I, Padro D, Llamas-Granda P, Moreno JA, Garcia I, Genicio N, Plaza-Garcia S, Blanco-Colio LM, Penades S and Egido J. Targeted gold-coated iron oxide nanoparticles for CD163 detection in atherosclerosis by MRI. *Scientific reports*. 2015;5:17135.

99. Senders ML, Hernot S, Carlucci G, van de Voort JC, Fay F, Calcagno C, Tang J, Alaarg A, Zhao Y, Ishino S, Palmisano A, Boeykens G, Meerwaldt AE, Sanchez-Gaytan BL, Baxter S, Zendman L, Lobatto ME, Karakatsanis NA, Robson PM, Broisat A, Raes G, Lewis JS, Tsimikas S, Reiner T, Fayad ZA, Devoogdt N, Mulder WJM and Perez-Medina C. Nanobody-Facilitated Multiparametric PET/MRI Phenotyping of Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018.
100. Rinne P, Hellberg S, Kiugel M, Virta J, Li XG, Kakela M, Helariutta K, Luoto P, Liljenback H, Hakovirta H, Gardberg M, Airaksinen AJ, Knuuti J, Saraste A and Roivainen A. Comparison of Somatostatin Receptor 2-Targeting PET Tracers in the Detection of Mouse Atherosclerotic Plaques. *Mol Imaging Biol*. 2016;18:99-108.
101. Tarkin JM, Joshi FR, Evans NR, Chowdhury MM, Figg NL, Shah AV, Starks LT, Martin-Garrido A, Manavaki R, Yu E, Kuc RE, Grassi L, Kreuzhuber R, Kostadima MA, Frontini M, Kirkpatrick PJ, Coughlin PA, Gopalan D, Fryer TD, Buscombe JR, Groves AM, Ouwehand WH, Bennett MR, Warburton EA, Davenport AP and Rudd JH. Detection of Atherosclerotic Inflammation by (68)Ga-DOTATATE PET Compared to [(18)F]FDG PET Imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:1774-1791.
102. Largeau B, Dupont AC, Guilloteau D, Santiago-Ribeiro MJ and Arlicot N. TSPO PET Imaging: From Microglial Activation to Peripheral Sterile Inflammatory Diseases? *Contrast Media Mol Imaging*. 2017;2017:6592139.
103. Narayan N, Mandhair H, Smyth E, Dakin SG, Kiriakidis S, Wells L, Owen D, Sabokbar A and Taylor P. The macrophage marker translocator protein (TSPO) is down-regulated on pro-inflammatory 'M1' human macrophages. *PLoS One*. 2017;12:e0185767.
104. Gaemperli O, Shalhoub J, Owen DR, Lamare F, Johansson S, Fouladi N, Davies AH, Rimoldi OE and Camici PG. Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with 11C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur Heart J*. 2012;33:1902-10.
105. Hellberg S, Silvola JMU, Kiugel M, Liljenback H, Savisto N, Li XG, Thiele A, Lehmann L, Heinrich T, Vollmer S, Hakovirta H, Laine VJO, Yla-Herttuala S, Knuuti J, Roivainen A and Saraste A. 18-kDa translocator protein ligand (18)F-FEMPA: Biodistribution and uptake into atherosclerotic plaques in mice. *J Nucl Cardiol*. 2017;24:862-871.
106. Fan Z, Calsolaro V, Atkinson RA, Femminella GD, Waldman A, Buckley C, Trigg W, Brooks DJ, Hinz R and Edison P. Flutriclamide (18F-GE180) PET: First-in-Human PET Study of Novel Third-Generation In Vivo Marker of Human Translocator Protein. *J Nucl Med*. 2016;57:1753-1759.
107. Wolak T. Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis*. 2014;236:327-37.
108. Qiao R, Qiao H, Zhang Y, Wang Y, Chi C, Tian J, Zhang L, Cao F and Gao M. Molecular Imaging of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in Vivo with Osteopontin-Specific Upconversion Nanoprobes. *ACS Nano*. 2017;11:1816-1825.
109. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L and Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation*. 2003;108:3134-9.
110. Cheng D, Li X, Zhang C, Tan H, Wang C, Pang L and Shi H. Detection of vulnerable atherosclerosis plaques with a dual-modal single-photon-emission computed tomography/magnetic resonance imaging probe targeting apoptotic macrophages. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7:2847-55.

111. Mousa SA. Adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications. *Methods Mol Biol.* 2010;663:261-76.
112. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL and Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:3883-7.
113. Morel DW, DiCorleto PE and Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis.* 1984;4:357-64.
114. Heinecke JW, Rosen H and Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest.* 1984;74:1890-4.
115. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA and Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831-42.
116. Rix A, Fokong S, Heringer S, Pjontek R, Kabelitz L, Theek B, Brockmann MA, Wiesmann M and Kiessling F. Molecular Ultrasound Imaging of alphavbeta3-Integrin Expression in Carotid Arteries of Pigs After Vessel Injury. *Invest Radiol.* 2016;51:767-775.
117. Yoo JS, Lee J, Jung JH, Moon BS, Kim S, Lee BC and Kim SE. SPECT/CT Imaging of High-Risk Atherosclerotic Plaques using Integrin-Binding RGD Dimer Peptides. *Scientific reports.* 2015;5:11752.
118. Jiang L, Tu Y, Kimura RH, Habte F, Chen H, Cheng K, Shi H, Gambhir SS and Cheng Z. ⁶⁴Cu-Labeled Divalent Cystine Knot Peptide for Imaging Carotid Atherosclerotic Plaques. *J Nucl Med.* 2015;56:939-44.
119. Paulis LE, Jacobs I, van den Akker NM, Geelen T, Molin DG, Starmans LW, Nicolay K and Strijkers GJ. Targeting of ICAM-1 on vascular endothelium under static and shear stress conditions using a liposomal Gd-based MRI contrast agent. *Journal of nanobiotechnology.* 2012;10:25.
120. Woodard PK, Liu Y, Pressly ED, Luehmann HP, Detering L, Sultan DE, Laforest R, McGrath AJ, Gropler RJ and Hawker CJ. Design and Modular Construction of a Polymeric Nanoparticle for Targeted Atherosclerosis Positron Emission Tomography Imaging: A Story of 25% (⁶⁴Cu-CANF-Comb. *Pharm Res.* 2016;33:2400-10.
121. Nahrendorf M, Keliher E, Panizzi P, Zhang H, Hembrador S, Figueiredo JL, Aikawa E, Kelly K, Libby P and Weissleder R. 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009;2:1213-22.
122. Kheirloomoom A, Kim CW, Seo JW, Kumar S, Son DJ, Gagnon MK, Ingham ES, Ferrara KW and Jo H. Multifunctional Nanoparticles Facilitate Molecular Targeting and miRNA Delivery to Inhibit Atherosclerosis in ApoE(-/-) Mice. *ACS Nano.* 2015;9:8885-97.
123. Michalska M, Machtoub L, Manthey HD, Bauer E, Herold V, Krohne G, Lykowsky G, Hildenbrand M, Kampf T, Jakob P, Zerneck A and Bauer WR. Visualization of vascular inflammation in the atherosclerotic mouse by ultrasmall superparamagnetic iron oxide vascular cell adhesion molecule-1-specific nanoparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2350-7.
124. Liu C, Zhang X, Song Y, Wang Y, Zhang F, Zhang Y, Zhang Y and Lan X. SPECT and fluorescence imaging of vulnerable atherosclerotic plaque with a vascular cell adhesion molecule 1 single-chain antibody fragment. *Atherosclerosis.* 2016;254:263-270.
125. Broisat A, Hernot S, Toczek J, De Vos J, Riou LM, Martin S, Ahmadi M, Thielens N, Wernery U, Caveliers V, Muyltermans S, Lahoutte T, Fagret D, Ghezzi C and Devoogdt N.

- Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2012;110:927-37.
126. Bala G, Blykers A, Xavier C, Descamps B, Broisat A, Ghezzi C, Fagret D, Van Camp G, Caveliers V, Vanhove C, Lahoutte T, Droogmans S, Cosyns B, Devoogdt N and Hernot S. Targeting of vascular cell adhesion molecule-1 by 18F-labelled nanobodies for PET/CT imaging of inflamed atherosclerotic plaques. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2016;17:1001-8.
127. Ferrante EA, Pickard JE, Rychak J, Klibanov A and Ley K. Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin under flow. *J Control Release*. 2009;140:100-7.
128. Chan JM, Monaco C, Wylezinska-Arridge M, Tremoleda JL and Gibbs RG. Imaging of the vulnerable carotid plaque: biological targeting of inflammation in atherosclerosis using iron oxide particles and MRI. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2014;47:462-9.
129. Linden MD and Jackson DE. Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42:1762-6.
130. Nording HM, Seizer P and Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:98.
131. van Lammeren GW, Pasterkamp G, de Vries JP, Bosch L, de Haan JJ, de Kleijn DP, Moll FL and Vink A. Platelets enter atherosclerotic plaque via intraplaque microvascular leakage and intraplaque hemorrhage: a histopathological study in carotid plaques. *Atherosclerosis*. 2012;222:355-9.
132. Herter JM, Rossaint J and Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J Thromb Haemost*. 2014;12:1764-75.
133. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM and Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123:2759-67.
134. Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw KC, Volf I, Schabbauer G, Soderberg-Naucler C and Assinger A. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:571-80.
135. Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S and Gawaz M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2008;78:8-17.
136. Jacobin-Valat MJ, Laroche-Traineau J, Lariviere M, Mornet S, Sanchez S, Biran M, Lebaron C, Boudon J, Lacomme S, Cerutti M and Clofent-Sanchez G. Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2015;11:927-37.
137. Sirol M, Fuster V, Badimon JJ, Fallon JT, Moreno PR, Toussaint JF and Fayad ZA. Chronic thrombus detection with in vivo magnetic resonance imaging and a fibrin-targeted contrast agent. *Circulation*. 2005;112:1594-600.
138. Spuentrup E, Buecker A, Katoh M, Wiethoff AJ, Parsons EC, Jr., Botnar RM, Weisskoff RM, Graham PB, Manning WJ and Gunther RW. Molecular magnetic resonance imaging of coronary thrombosis and pulmonary emboli with a novel fibrin-targeted contrast agent. *Circulation*. 2005;111:1377-82.
139. Spuentrup E, Fausten B, Kinzel S, Wiethoff AJ, Botnar RM, Graham PB, Haller S, Katoh M, Parsons EC, Jr., Manning WJ, Busch T, Gunther RW and Buecker A. Molecular magnetic resonance imaging of atrial clots in a swine model. *Circulation*. 2005;112:396-9.

140. Stracke CP, Katoh M, Wiethoff AJ, Parsons EC, Spangenberg P and Spuntrup E. Molecular MRI of cerebral venous sinus thrombosis using a new fibrin-specific MR contrast agent. *Stroke*. 2007;38:1476-81.
141. Makowski MR, Forbes SC, Blume U, Warley A, Jansen CH, Schuster A, Wiethoff AJ and Botnar RM. In vivo assessment of intraplaque and endothelial fibrin in ApoE(-/-) mice by molecular MRI. *Atherosclerosis*. 2012;222:43-9.
142. Clofent-Sanchez G, Jacobin-Valat MJ and Laroche-Traineau J. The growing interest of fibrin imaging in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;222:22-5.
143. Spuntrup E, Botnar RM, Wiethoff AJ, Ibrahim T, Kelle S, Katoh M, Ozgun M, Nagel E, Vymazal J, Graham PB, Gunther RW and Maintz D. MR imaging of thrombi using EP-2104R, a fibrin-specific contrast agent: initial results in patients. *Eur Radiol*. 2008;18:1995-2005.
144. Ay I, Blasi F, Rietz TA, Rotile NJ, Kura S, Brownell AL, Day H, Oliveira BL, Looby RJ and Caravan P. In vivo molecular imaging of thrombosis and thrombolysis using a fibrin-binding positron emission tomographic probe. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7:697-705.
145. Blasi F, Oliveira BL, Rietz TA, Rotile NJ, Naha PC, Cormode DP, Izquierdo-Garcia D, Catana C and Caravan P. Multisite Thrombus Imaging and Fibrin Content Estimation With a Single Whole-Body PET Scan in Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2114-21.
146. Laitinen I, Saraste A, Weidl E, Poethko T, Weber AW, Nekolla SG, Leppanen P, Yla-Herttuala S, Holzlwimmer G, Walch A, Esposito I, Wester HJ, Knuuti J and Schwaiger M. Evaluation of alphavbeta3 integrin-targeted positron emission tomography tracer 18F-galacto-RGD for imaging of vascular inflammation in atherosclerotic mice. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009;2:331-8.
147. Beer AJ, Pelisek J, Heider P, Saraste A, Reeps C, Metz S, Seidl S, Kessler H, Wester HJ, Eckstein HH and Schwaiger M. PET/CT imaging of integrin alphavbeta3 expression in human carotid atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014;7:178-87.
148. Suzuki M, Bachelet-Violette L, Rouzet F, Beilvert A, Autret G, Maire M, Menager C, Louedec L, Choqueux C, Saboural P, Haddad O, Chauvierre C, Chaubet F, Michel JB, Serfaty JM and Letourneur D. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine (London, England)*. 2015;10:73-87.
149. Li X, Bauer W, Israel I, Kreissl MC, Weirather J, Richter D, Bauer E, Herold V, Jakob P, Buck A, Frantz S and Samnick S. Targeting P-selectin by gallium-68-labeled fucoidan positron emission tomography for noninvasive characterization of vulnerable plaques: correlation with in vivo 17.6T MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1661-7.
150. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L, Boon L, Flavell RA, Noelle RJ, Gerdes N, Biessen EA, Daemen MJ, Heemskerk JW, Weber C and Lutgens E. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*. 2010;116:4317-27.
151. Jacobin-Valat MJ, Deramchia K, Mornet S, Hagemeyer CE, Bonetto S, Robert R, Biran M, Massot P, Miraux S, Sanchez S, Bouzier-Sore AK, Franconi JM, Duguet E and Clofent-Sanchez G. MRI of inducible P-selectin expression in human activated platelets involved in the early stages of atherosclerosis. *NMR Biomed*. 2011;24:413-24.
152. Jacobin MJ, Laroche-Traineau J, Little M, Keller A, Peter K, Welschof M, Nurden A and Clofent-Sanchez G. Human IgG monoclonal anti-alpha(IIb)beta(3)-binding fragments derived from immunized donors using phage display. *J Immunol*. 2002;168:2035-45.
153. Hagemeyer CE, von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D and Peter K. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. *Thromb Haemost*. 2009;101:1012-9.

154. Vallet-Courbin A, Lariviere M, Hocquellet A, Hemadou A, Parimala SN, Laroche-Traineau J, Santarelli X, Clofent-Sanchez G, Jacobin-Valat MJ and Noubhani A. A Recombinant Human Anti-Platelet scFv Antibody Produced in *Pichia pastoris* for Atheroma Targeting. *PLoS One*. 2017;12:e0170305.
155. Prevot G, Kauss T, Lorenzato C, Gaubert A, Lariviere M, Baillet J, Laroche-Traineau J, Jacobin-Valat MJ, Adumeau L, Mornet S, Barthelemy P, Duonor-Cerutti M, Clofent-Sanchez G and Crauste-Manciet S. Iron oxide core oil-in-water nanoemulsion as tracer for atherosclerosis MPI and MRI imaging. *International journal of pharmaceuticals*. 2017;532:669-676.
156. Wang X, Hagemeyer CE, Hohmann JD, Leitner E, Armstrong PC, Jia F, Olschewski M, Needles A, Peter K and Ahrens I. Novel single-chain antibody-targeted microbubbles for molecular ultrasound imaging of thrombosis: validation of a unique noninvasive method for rapid and sensitive detection of thrombi and monitoring of success or failure of thrombolysis in mice. *Circulation*. 2012;125:3117-26.
157. Ardipradja K, Yeoh SD, Alt K, O'Keefe G, Rigopoulos A, Howells DW, Scott AM, Peter K, Ackerman U and Hagemeyer CE. Detection of activated platelets in a mouse model of carotid artery thrombosis with 18 F-labeled single-chain antibodies. *Nucl Med Biol*. 2014;41:229-37.
158. Meier S, Putz G, Massing U, Hagemeyer CE, von Elverfeldt D, Meissner M, Ardipradja K, Barnert S, Peter K, Bode C, Schubert R and von zur Muhlen C. Immuno-magnetoliposomes targeting activated platelets as a potentially human-compatible MRI contrast agent for targeting atherothrombosis. *Biomaterials*. 2015;53:137-48.
159. Wang X, Gkanatsas Y, Palasubramaniam J, Hohmann JD, Chen YC, Lim B, Hagemeyer CE and Peter K. Thrombus-Targeted Theranostic Microbubbles: A New Technology towards Concurrent Rapid Ultrasound Diagnosis and Bleeding-free Fibrinolytic Treatment of Thrombosis. *Theranostics*. 2016;6:726-38.
160. Wang X, Palasubramaniam J, Gkanatsas Y, Hohmann JD, Westein E, Kanojia R, Alt K, Huang D, Jia F, Ahrens I, Medcalf RL, Peter K and Hagemeyer CE. Towards effective and safe thrombolysis and thromboprophylaxis: preclinical testing of a novel antibody-targeted recombinant plasminogen activator directed against activated platelets. *Circ Res*. 2014;114:1083-93.
161. Schwarz M, Rottgen P, Takada Y, Le Gall F, Knackmuss S, Bassler N, Buttner C, Little M, Bode C and Peter K. Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin α IIb β 3 designed by subtractive selection from naive human phage libraries. *Faseb J*. 2004;18:1704-6.
162. Lim B, Yao Y, Huang AL, Yap ML, Flierl U, Palasubramaniam J, Zaldivia MTK, Wang X and Peter K. A Unique Recombinant Fluoroprobe Targeting Activated Platelets Allows In Vivo Detection of Arterial Thrombosis and Pulmonary Embolism Using a Novel Three-Dimensional Fluorescence Emission Computed Tomography (FLECT) Technology. *Theranostics*. 2017;7:1047-1061.
163. Metzger K, Vogel S, Chatterjee M, Borst O, Seizer P, Schonberger T, Geisler T, Lang F, Langer H, Rheinlaender J, Schaffer TE and Gawaz M. High-frequency ultrasound-guided disruption of glycoprotein VI-targeted microbubbles targets atheroprogession in mice. *Biomaterials*. 2015;36:80-9.
164. Shim CY, Liu YN, Atkinson T, Xie A, Foster T, Davidson BP, Treible M, Qi Y, Lopez JA, Munday A, Ruggeri Z and Lindner JR. Molecular Imaging of Platelet-Endothelial Interactions and Endothelial von Willebrand Factor in Early and Mid-Stage Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8:e002765.

165. Sirokmany G and Geiszt M. The Relationship of NADPH Oxidases and Heme Peroxidases: Fallin' in and Out. *Frontiers in immunology*. 2019;10:394.
166. Madamanchi NR, Vendrov A and Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29-38.
167. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ and Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. 2004;45:993-1007.
168. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ and Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5134-8.
169. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, Drake TA, Territo MC and Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res*. 1997;80:810-8.
170. Libby P, Lichtman AH and Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 2013;38:1092-104.
171. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S and Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *Jama*. 2001;285:1711-8.
172. Briley-Saebo KC, Shaw PX, Mulder WJ, Choi SH, Vucic E, Aguinaldo JG, Witztum JL, Fuster V, Tsimikas S and Fayad ZA. Targeted molecular probes for imaging atherosclerotic lesions with magnetic resonance using antibodies that recognize oxidation-specific epitopes. *Circulation*. 2008;117:3206-15.
173. Briley-Saebo KC, Cho YS, Shaw PX, Ryu SK, Mani V, Dickson S, Izadmehr E, Green S, Fayad ZA and Tsimikas S. Targeted Iron Oxide Particles for In Vivo Magnetic Resonance Detection of Atherosclerotic Lesions With Antibodies Directed to Oxidation-Specific Epitopes. *J Am Coll Cardiol*. 2011.
174. Briley-Saebo KC, Nguyen TH, Saeboe AM, Cho YS, Ryu SK, Volkova ER, Dickson S, Leibundgut G, Wiesner P, Green S, Casanada F, Miller YI, Shaw W, Witztum JL, Fayad ZA and Tsimikas S. In vivo detection of oxidation-specific epitopes in atherosclerotic lesions using biocompatible manganese molecular magnetic imaging probes. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:616-26.
175. Nguyen TH, Bryant H, Shapsa A, Street H, Mani V, Fayad ZA, Frank JA, Tsimikas S and Briley-Saebo KC. Manganese G8 dendrimers targeted to oxidation-specific epitopes: in vivo MR imaging of atherosclerosis. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41:797-805.
176. Senders ML, Que X, Cho YS, Yeang C, Groenen H, Fay F, Calcagno C, Meerwaldt AE, Green S, Miu P, Lobatto ME, Reiner T, Fayad ZA, Witztum JL, Mulder WJM, Perez-Medina C and Tsimikas S. PET/MR Imaging of Malondialdehyde-Acetaldehyde Epitopes With a Human Antibody Detects Clinically Relevant Atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:321-335.
177. Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, Furukawa J, Kaihara K, Inagaki J, Atsumi T, Sakairi N, Yasuda T, Voelker DR and Koike T. A specific ligand for beta(2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *J Lipid Res*. 2001;42:697-709.
178. Greco TP, Conti-Kelly AM, Anthony JR, Greco T, Jr., Doyle R, Boisen M, Kojima K, Matsuura E and Lopez LR. Oxidized-LDL/beta(2)-glycoprotein I complexes are associated with

- disease severity and increased risk for adverse outcomes in patients with acute coronary syndromes. *American journal of clinical pathology*. 2010;133:737-43.
179. Sasaki T, Kobayashi K, Kita S, Kojima K, Hirano H, Shen L, Takenaka F, Kumon H and Matsuura E. In vivo distribution of single chain variable fragment (scFv) against atherothrombotic oxidized LDL/beta2-glycoprotein I complexes into atherosclerotic plaques of WHHL rabbits: Implication for clinical PET imaging. *Autoimmun Rev*. 2017;16:159-167.
180. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC and Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol*. 2013;93:185-98.
181. Shao B, Tang C, Sinha A, Mayer PS, Davenport GD, Brot N, Oda MN, Zhao XQ and Heinecke JW. Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ Res*. 2014;114:1733-42.
182. Rashid I, Maghzal GJ, Chen YC, Cheng D, Talib J, Newington D, Ren M, Vajandar SK, Searle A, Maluenda A, Lindstedt EL, Jabbour A, Kettle AJ, Bongers A, Power C, Michaelsson E, Peter K and Stocker R. Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*. 2018;39:3301-3310.
183. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT and Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006;116:59-69.
184. Hyafil F, Vucic E, Cornily JC, Sharma R, Amirbekian V, Blackwell F, Lancelot E, Corot C, Fuster V, Galis ZS, Feldman LJ and Fayad ZA. Monitoring of arterial wall remodelling in atherosclerotic rabbits with a magnetic resonance imaging contrast agent binding to matrix metalloproteinases. *Eur Heart J*. 2011;32:1561-71.
185. Razavian M, Tavakoli S, Zhang J, Nie L, Dobrucki LW, Sinusas AJ, Azure M, Robinson S and Sadeghi MM. Atherosclerosis plaque heterogeneity and response to therapy detected by in vivo molecular imaging of matrix metalloproteinase activation. *J Nucl Med*. 2011;52:1795-802.
186. Hemadou A, Laroche-Traineau J, Antoine S, Mondon P, Fontayne A, Le Priol Y, Claverol S, Sanchez S, Cerutti M, Ottonnes F, Clofent-Sanchez G and Jacobin-Valat MJ. An innovative flow cytometry method to screen human scFv-phages selected by in vivo phage-display in an animal model of atherosclerosis. *Scientific reports*. 2018;8:15016.
187. Hemadou A, Giudicelli V, Smith ML, Lefranc MP, Duroux P, Kossida S, Heiner C, Hepler NL, Kuijpers J, Groppi A, Korlach J, Mondon P, Ottonnes F, Jacobin-Valat MJ, Laroche-Traineau J and Clofent-Sanchez G. Pacific Biosciences Sequencing and IMGT/HighV-QUEST Analysis of Full-Length Single Chain Fragment Variable from an In Vivo Selected Phage-Display Combinatorial Library. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1796.
188. Jacobin MJ, Robert R, Pouns O, Laroche-Traineau J, Nurden A, Peter K, Little M and Clofent-Sanchez G. Improving selection of alphaIIb beta3-binding phage antibodies with increased reactivity derived from immunized donors. *Clin Immunol*. 2003;108:199-210.
189. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A and Libby P. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J*. 2011;162:597-605.

LEGEND

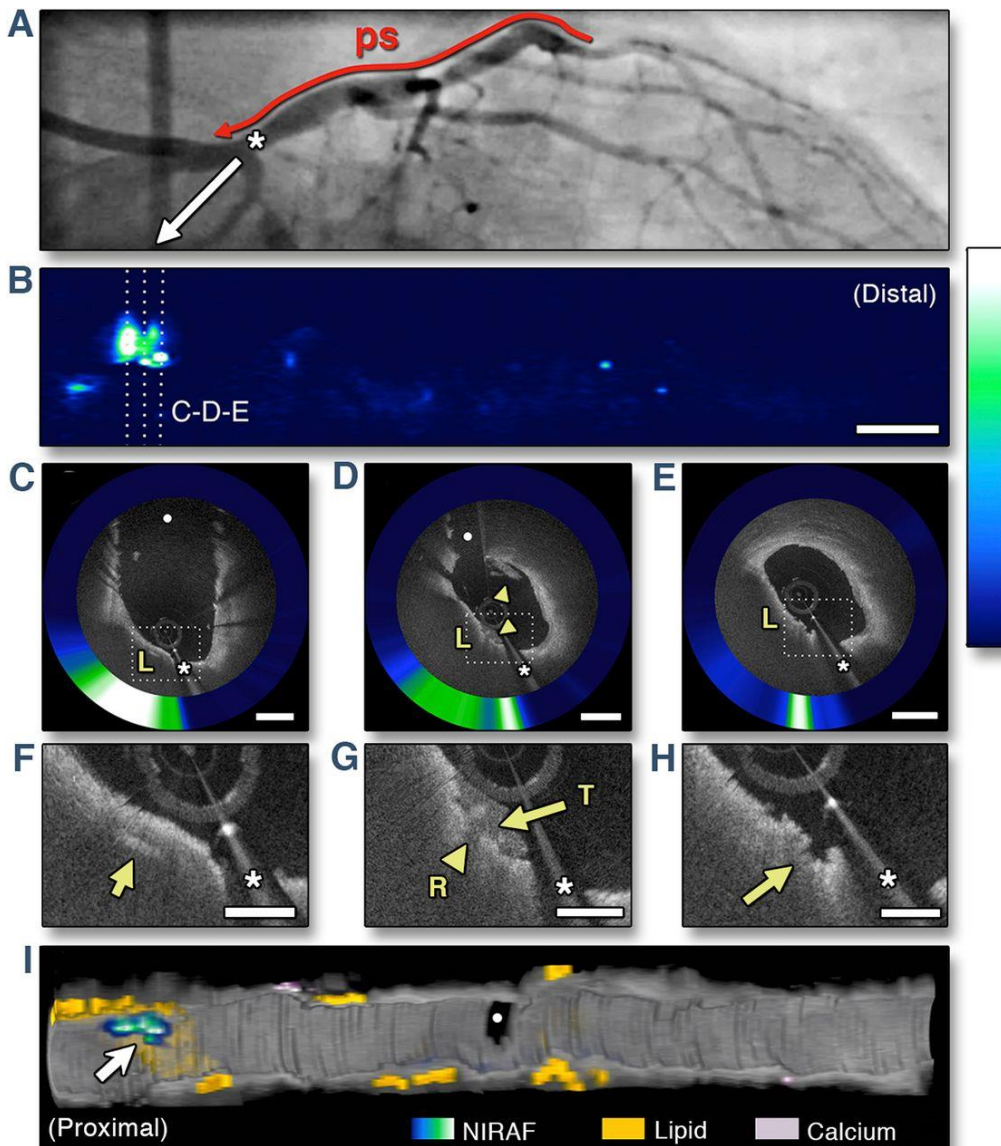


Figure 1: (A) Coronary angiogram of the left anterior descending coronary artery (LAD). (B) Two-dimensional NIRAF map showing a focal region of elevated NIRAF in the ostial LAD. (C to E) OCT-NIRAF cross sections from sites in (B) with elevated NIRAF, revealing subclinical OCT-TCFA fibrous cap rupture. Magnification of a cholesterol crystal (arrow) below the cap, colocalized with high NIRAF (F) and magnified views of the rupture site (G,H). In (G), the rupture site (arrowhead) is covered by a small white luminal thrombus (arrow), and the arrow in (H) points to the site of the thin-cap rupture, demonstrating colocalized and very high focal NIRAF signal. (I) Three-dimensional cutaway rendering showing that the highest NIRAF spot appears focally within a large lipid pool (arrow), and the remaining portion of the vessel shows diffuse disease that was negative for NIRAF. Scale bars on OCT images and magnifications are equal to 1 mm and 0.5 mm, respectively; scale bar in (B) is equal to 5 mm. (*) Indicates a guidewire shadow. ps $\frac{1}{4}$ pullback segment; L $\frac{1}{4}$ lipid; R $\frac{1}{4}$ rupture site; T $\frac{1}{4}$ thrombus; TCFA $\frac{1}{4}$ thin-cap fibroatheroma. Used with permission from Ughi et al, 2016, JACC Cardiovasc Imaging.⁵³

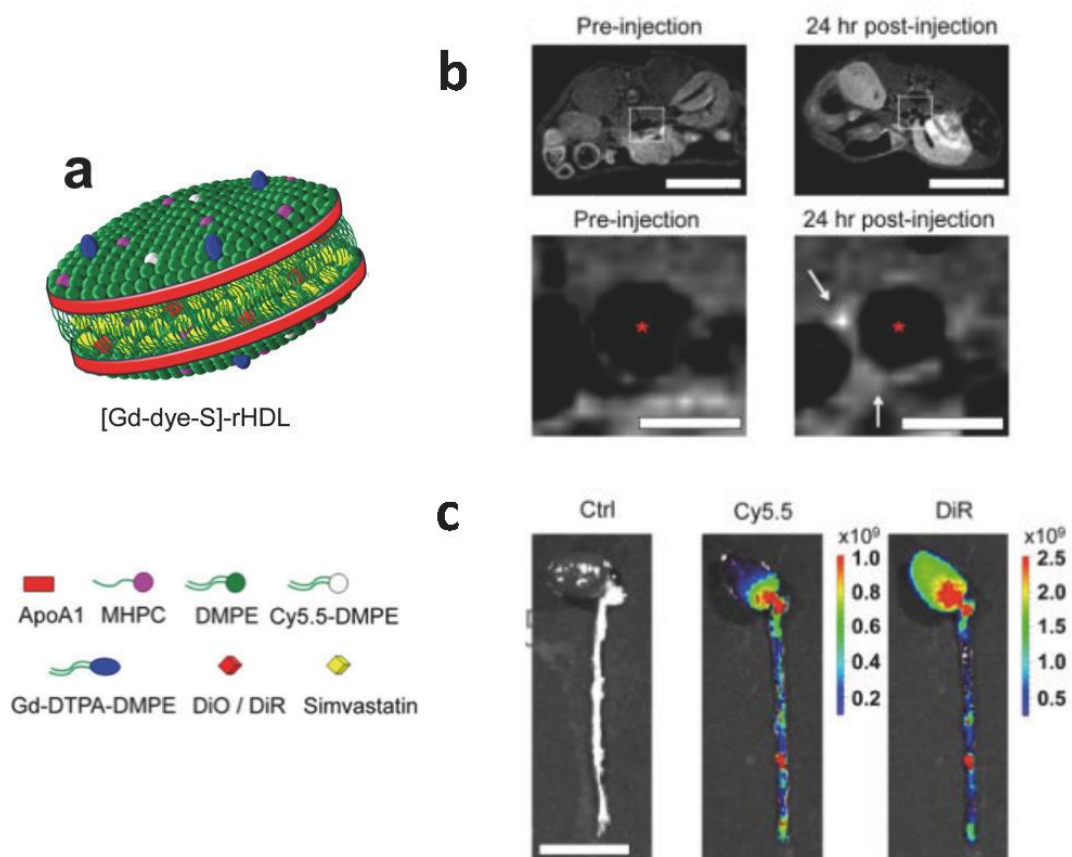


Figure 2: (a) Schematic representation of dual gadolinium and fluorescent dye (Cy5.5, DiO, DiR) labeled statin-containing reconstituted high density lipoprotein ([Gd-dye-S]-rHDL); (b) Typical T1-weighted images of the abdominal aorta of an ApoE^{-/-} mouse before and 24 hours after injection of [Gd-Dye-S]-rHDL. The lumen is indicated by *. The 24h post-injection image shows signal enhancement in the vessel wall (white arrows), indicative of nanoparticle infiltration and retention in the aortic plaques. (c) [S]-rHDL labeled with Cy5.5 (lipid monolayer) and DiR (hydrophobic core) was intravenously injected to ApoE^{-/-} mice. NIRF shows that Cy5.5 and DiR preferentially accumulate in the areas rich with atherosclerotic lesions. Used with permission from Duivenvoorden et al., 2014, Nature communications.⁸⁷

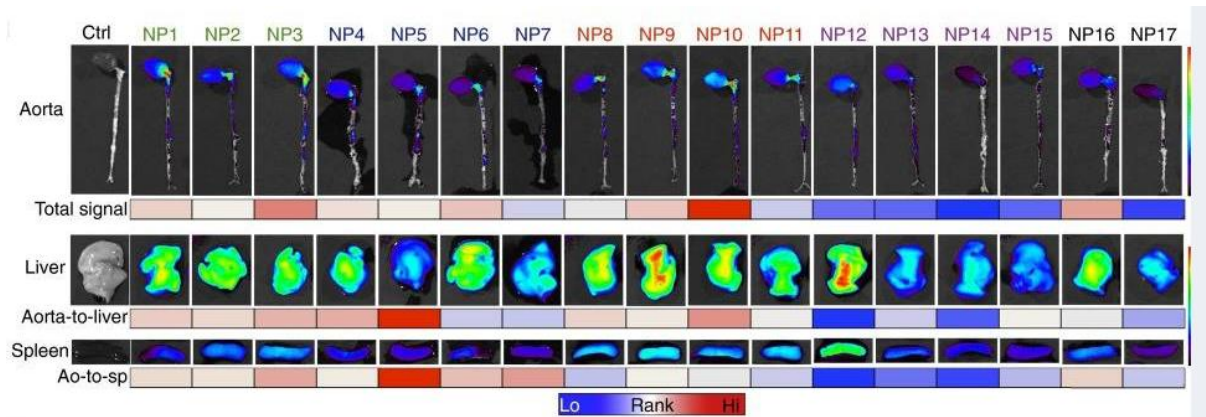


Figure 3: Representative near infrared fluorescence images of nanoparticle accumulation in aorta, liver, and spleen. The heat map below the aorta images ranks the mean total fluorescent tissue signal, the heat map below the liver images ranks the total aorta-to-liver signal, and the heat map below the spleen images ranks the mean aorta-to-spleen accumulation (Ao-to-sp) ratio, with the red indicating a high and the blue a low ratio ($n = 5$ for each nanoparticle). Used with permission from Tang et al, 2016, Proc Natl Acad Sci U S A.⁸⁹

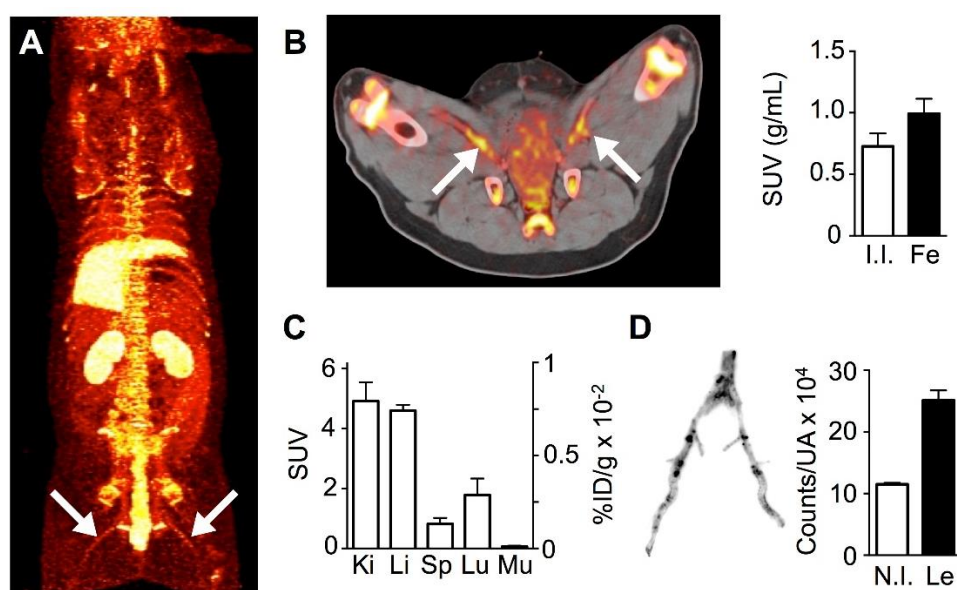


Figure 4: (A) Whole-body maximum intensity projection PET image of a pig injected with ^{89}Zr -PL-HDL at 48 h post-injection (arrows indicating atherosclerotic femoral arteries). (B) Axial PET/CT image showing high radioactivity accumulation in lesions (indicated by arrows) at 48 h post-injection (left), and quantification of radioactivity concentrations (right) in internal iliac (I.I., chosen as control) and femoral arteries (Fe) ($n = 3$). (C) Radioactivity distribution in selected tissues for ^{89}Zr -PL-HDL at 48 h post-injection determined by gamma counting ($n = 3$). (D) Autoradiography of femoral arteries (left) and quantification of radioactivity concentration (counts per unit area) in noninjured tissue (N.I.) and lesions (Le) determined from the autoradiography analysis (right) ($n = 3$). Used with permission from Perez-Medina, 2016, JACC Cardiovasc Imaging.⁹⁰

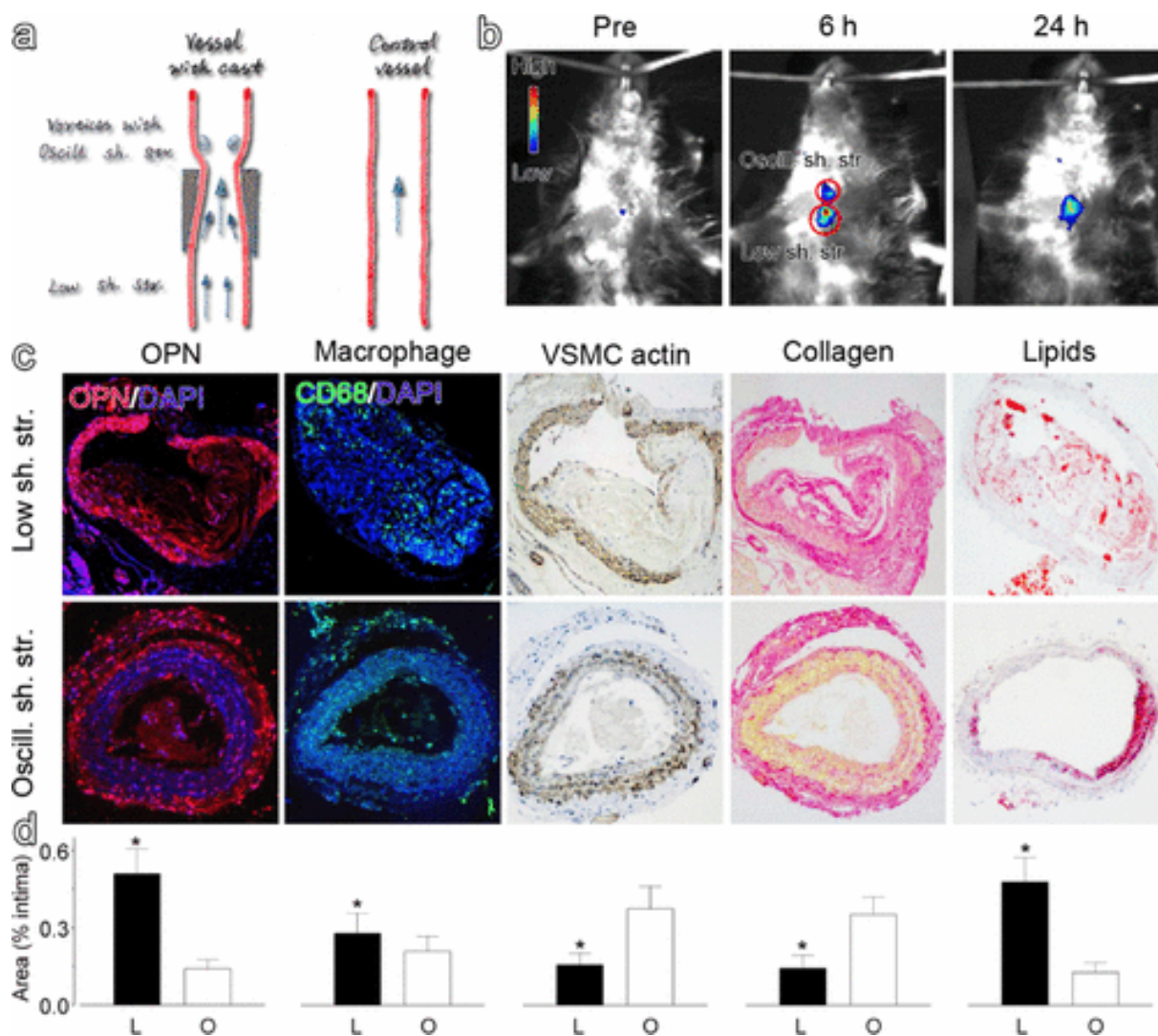


Figure 5: A schematic drawing for showing the varied stress-induced plaques in ApoE-/- mouse (a), *in vivo* upconversion luminescent images captured before and at different time points after intravenous injection of the UCNP-anti-OPN probe (the region of interest is encircled with red circles for showing the oscillatory shear stress (top) and lowered shear stress region (bottom) of the constrained vessel) (b), histological analyses (c), and quantified data of the different plaque regions upon various staining (*P < 0.05) (d). Reprinted with permission from Qiao et al, 2017, ACS Nano.¹⁰⁸ Copyright 2017 American Chemical Society.

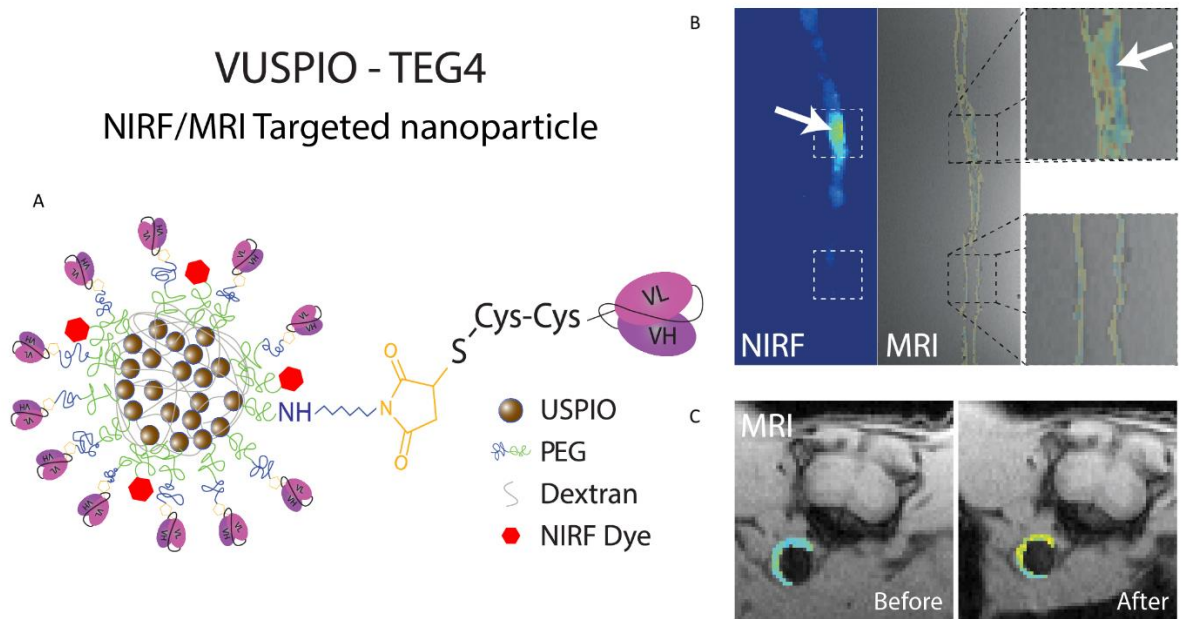


Figure 6 : A : scFvs activated by reduction with TCEP reacting with the surface maleimides of the VUSPIO nano-object to ensure site-directed bioconjugation. B: *Ex vivo* fluorescence images (left) and their corresponding MRI magnitude images with segmented T2* maps overlay (right) of atherosclerotic aorta after injection in the heart of ApoE^{-/-} mice. A specific contrast agent-driven R2* enhancement of the atheroma plaques was detected by MRI at 7 T, confirmed by a matching NIRF signal distribution and consistent with the observed atherosclerotic lesions pattern. C : Segmented relaxation rate R2* maps overlaid on their corresponding magnitude images obtained before and after *in vivo* injection of VUSPIO-TEG4. MR imaging at 4.7 T highlighted a significant R2* enhancement in the plaque 20 min after injection, which persisted 24 h after injection. Figure from the authors reused with permission from Larivière M, Lorenzato CS, Adumeau L, Bonnet S, Hémadou A, Jacobin-Valat MJ, Noubhani A, Santarelli X, Minder L, Di Primo C, Sanchez S, Mornet S, Laroche-Traineau J and Clofent-Sanchez G. Multimodal molecular imaging of atherosclerosis: Nanoparticles functionalized with scFv fragments of an anti- α IIb β 3 antibody. *Nanomedicine*. 2019

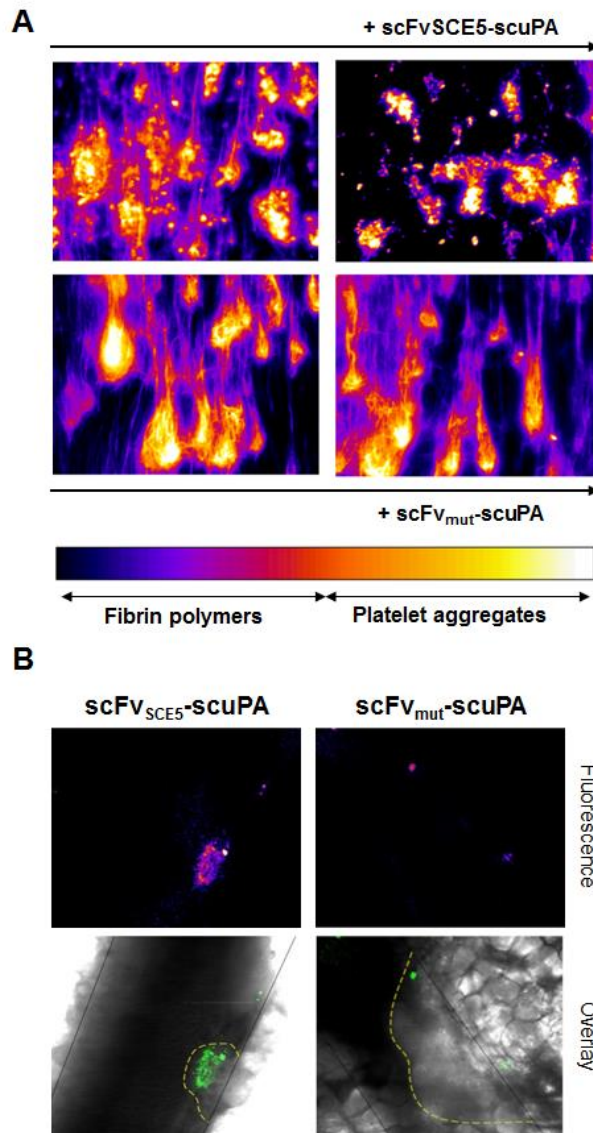


Figure 7: Binding of scFvSCE5–scuPA to microthrombi resulting in fibrin degradation in vitro and fluorescence staining of scFvSCE5–scuPA in vivo. A, scFvSCE5–scuPA caused fibrin degradation in vitro on microfluidic flow channels. Fibrin degradation was observed at platelet aggregation perfused with scFvSCE5–scuPA but not with scFvmut–scuPA. (n=3 each). Image analysis was done with ImageJ applying a median filter (1.5 pixels) and a fire false color look-up table. B, Intravital microscopy demonstrating the binding of scFvSCE5–scuPA conjugated with Cy-3 fluorescence dye to thrombi in vivo. Representative images showing the binding of scFv–scuPA fusion proteins to thrombi induced by ferric chloride injury in the mesenteric arteriole (n=3 each). scFv–scuPA fusion proteins conjugated with Cy-3 fluorescence dye were injected into the mice after the formation of stable thrombi. Increased binding of scFvSCE5–scuPA to activated platelets/thrombus was detected on the fluorescence channel. No specific fluorescence/binding was observed using scFvmut–scuPA. Overlay indicates the differential interference contrast image overlay with the corresponding fluorescence image; scFv: single-chain antibody fragments; and scuPA: single-chain urokinase plasminogen activator. Modified from Wang et al, 2014, Circulation Research.¹⁶⁰

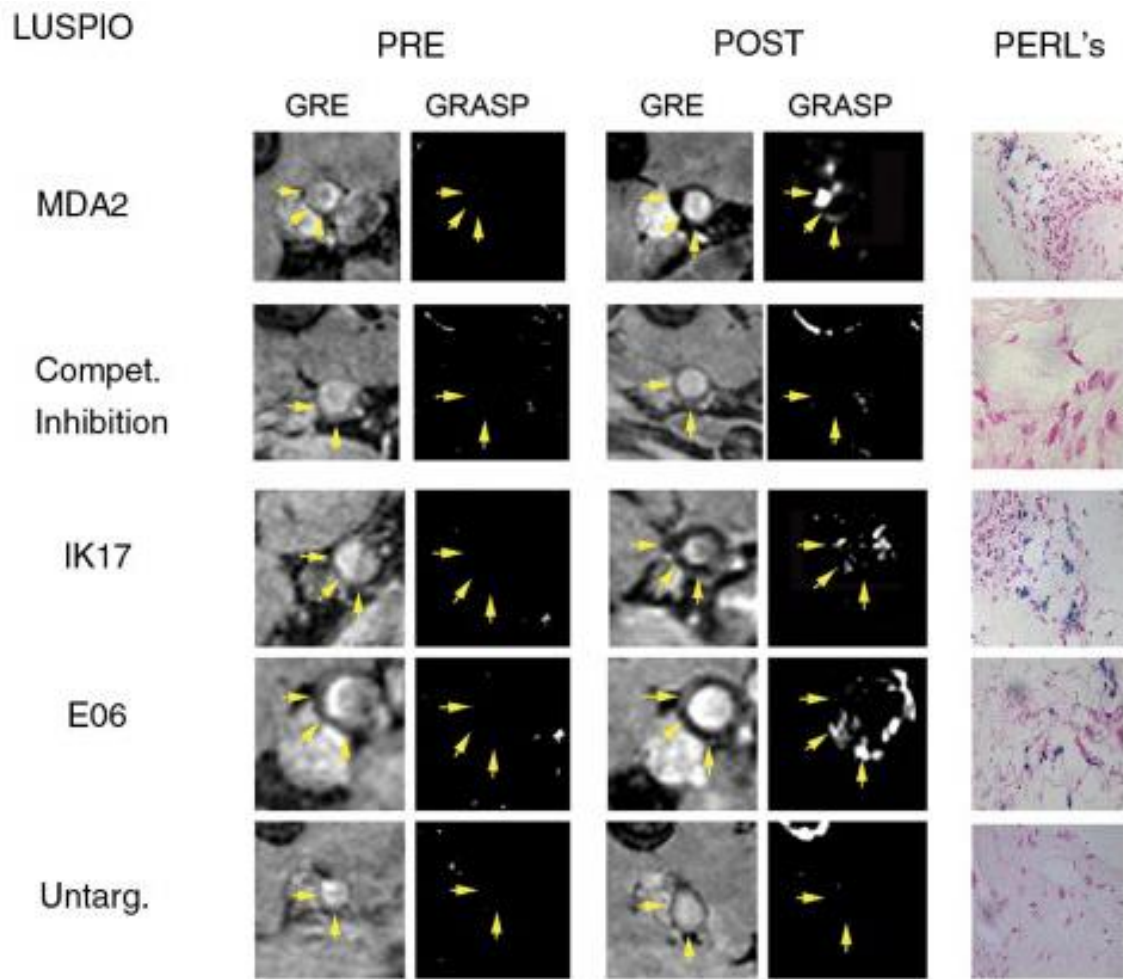


Figure 8: Representative *in vivo* LUSPIO magnetic resonance images obtained before (PRE) and 24 h after (POST) administration of a 3.9-mg Fe/kg dose in ApoE^{-/-} mice. The yellow arrows indicate the position of the lumen associated with the abdominal aorta. All gradient echo (GRE) images shown were obtained with an echo time of 7 ms. Corresponding white marker gradient echo acquisition for superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP) images are also shown. The ApoE^{-/-} mice were administered free excess MDA2 antibody at the time of MDA2-labeled LUSPIO injection, for the competitive inhibition results. Matched histology sections show iron deposition (blue) within foam cells associated with the arterial wall. Used with permission from Briley-Saebo et al, 2011, J Am Coll Cardiol.¹⁷³

Ciblage moléculaire de l'athérosclérose par des nanoparticules fonctionnalisées avec des anticorps humains : développement et applications d'un protocole d'IRM paramétrique chez le petit animal

Résumé : La rupture de la plaque athéromateuse est la cause d'environ 70% des attaques cardiaques soudaines et souvent mortelles. Les lésions athéroscléreuses sont des épaissements focaux riches en lipides dans les parois des artères. Développer un (ou des) agent de contraste ciblant est d'un intérêt clinique crucial pour évaluer les composants à l'origine du risque de rupture. L'imagerie moléculaire nécessite des sondes hautement sensibles et spécifiques constituées de ligands pour le ciblage. Les ligands sont ici des fragments d'anticorps humains recombinants (scFv) qui sont fonctionnalisés sur des nanoparticules multimodales chargées (1) d'oxyde de fer pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) non-invasive et (2) de fluorophores dans le proche infrarouge (PIR) pour l'imagerie de fluorescence au niveau tissulaire et cellulaire. Les particules à base d'oxyde de fer (USPIOs) sont employées en IRM pour leurs propriétés superparamagnétiques qui induisent localement (au niveau des tissus d'accumulation) un hyposignal. Ces particules sont aussi caractérisées par leur capacité à diminuer les valeurs tissulaires d'un paramètre physique temporel appelé T2*. L'évaluation quantitative de l'accumulation des USPIOs au sein de la plaque d'athérome par IRM paramétrique est depuis une dizaine d'années un champ d'investigation en plein essor. Bien que la recherche pré-clinique en imagerie moléculaire soit très active dans le domaine de la conception de sondes dédiées à l'athérosclérose, elle nécessite en parallèle le développement et la validation de protocoles d'imagerie paramétrique robustes chez le petit animal. L'objectif de cette thèse a été de développer des outils d'imagerie permettant la caractérisation pré-clinique de la plaque d'athérome chez le petit animal (protocole d'imagerie et agents de contraste ciblant). La première phase du projet a permis la synthèse et la caractérisation de différents agents de contraste multimodaux (IRM/PIR). Dans un second temps, un travail a été consacré à la production d'anticorps humains recombinants spécifiques de la plaque d'athérome (scFv). Dans une optique de démarche qualité s'inspirant de la méthode « Six Sigma », un protocole d'imagerie paramétrique par IRM a ensuite été développé et validé afin de permettre une caractérisation robuste du T2* de la plaque d'athérome chez des souris ApoE^{-/-}. Au cours d'une dernière étape, les scFv produits ont été fonctionnalisés sur les USPIOs par différentes voies de greffage. La cinétique d'accumulation des agents de contraste ciblant a finalement été étudiée *in vivo* chez la souris ApoE^{-/-} à partir du protocole d'imagerie validé.

Mots clés : athérosclérose, agents de contraste, IRM paramétrique, ciblage, anticorps humains

Molecular targeting of atherosclerosis by nanoparticles functionalized with human antibodies: development and application of a parametric MRI protocol in small animals

Abstract : The project will address the problem of unstable atherosclerotic plaque rupture, which is the mechanistic cause of about 70 % of all sudden and often fatal heart attacks. Atherosclerotic lesions are lipid-rich focal thickenings in the walls of the arteries. Engineering targeted contrast agents to assess the components that underlie the risk of rupture is of crucial interest. Molecular imaging requires highly sensitive and specific probes grafted with ligands for targeting. Here single chains fragment variable of human antibodies (scFv) are proposed as specific ligands to functionalize multi-modal nanoparticles loaded with (1) iron oxide for non-invasive *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) and (2) Near InfraRed (NIR) fluorophores for fluorescence imaging at the tissular and cellular level. Iron oxide-based particles (USPIOs) are used in MRI for their superparamagnetic properties which locally induce (in the tissues where they accumulate) an hyposignal. These particles are also characterized by their ability to reduce the tissue values of a temporal physical parameter called T2 *. The quantitative evaluation of the accumulation of USPIOs in atheroma plaque by parametric MRI has been a growing field of investigation for about ten years. Although the pre-clinical research of new molecular imaging probes dedicated to atherosclerosis is very active, it also requires the development and validation of robust parametric imaging protocols dedicated to small animals. The aim of this thesis was to develop imaging tools allowing the preclinical characterization of atheromatous plaque in small animals (imaging protocol and targeting contrast agents). The first part of the project allowed the synthesis and characterization of different multimodal contrast agents (MRI / NIR). In a second step, work has been devoted to the production of recombinant human antibodies specific for atheroma plaque (scFv). In a quality state of mind approach inspired by the "Six Sigma" method, a parametric MRI imaging protocol was developed and validated to allow a robust characterization of the T2 * values of atheromatous plaque in ApoE^{-/-} mice. In a final step, the scFv products were functionalized on the USPIOs by different grafting pathways. Thanks to the validated imaging protocol, the accumulation of targeting contrast agents into the atheroma plaque during time was finally assessed *in vivo* in ApoE^{-/-} mice.

Keywords : atherosclerosis, contrast agents, parametric MRI, targeting, human antibodies

Unité de recherche : CRMSB (Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques)
UMR5536 – 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cédex