



HAL
open science

Nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique in vivo

Quentin Le Masne de Chermont

► **To cite this version:**

Quentin Le Masne de Chermont. Nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique in vivo. Matériaux. Chimie ParisTech, 2007. Français. NNT: . tel-00294982

HAL Id: tel-00294982

<https://pastel.hal.science/tel-00294982>

Submitted on 10 Jul 2008

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 DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

École Doctorale Inter///Bio

Spécialité : Chimie des matériaux, imagerie optique

présentée par :

Quentin le Masne de Chermont

pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS VI

Nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique *in vivo*

soutenue le X décembre 2007

devant le jury composé de :

M. Benoit Dubertret
M. Thierry Gacoin
M. Alain Courtière
M. Bertrand Tavitian
M. Germain Trugnan
M. Daniel Scherman
M. Michel Bessodes

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Table des matières

Introduction	3
I Luminescence persistante: vers un nouvel outil en imagerie optique	7
1 Présentation de différentes techniques d'imagerie	9
1.1 Imageries aux rayons X, spectroscopique, nucléaire et ultrasonore	10
1.1.1 Radiologie et scanner	10
1.1.2 Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	11
1.1.3 Imagerie nucléaire	14
1.1.4 Échographie	15
1.2 Imagerie optique	17
1.2.1 Mécanisme de luminescence mis en jeu	17
1.2.2 Utilisation des sondes optiques en imagerie	22
1.2.3 Instrumentation et acquisition des données en imagerie optique	31
1.3 Contraintes en imagerie optique	36
1.3.1 Contraintes liées aux sondes optiques	36
1.3.2 Contraintes liées aux milieux biologiques	42
1.4 Récapitulatif sur les techniques d'imagerie	47
2 Luminescence persistante et nanoparticules	49
2.1 Matériaux à luminescence persistante	50
2.1.1 Matériaux à luminescence persistante et applications	50
2.1.2 Mécanismes de la luminescence persistante	54
2.2 Silicates et luminescence persistante	60
2.2.1 Exemple de silicate à luminescence persistante	60
2.2.2 Polymorphisme de l'enstatite (MgSiO_3)	61
2.3 Colloïdes et procédé sol-gel	64
2.3.1 Caractérisation de colloïdes	64
2.3.2 Procédé Sol-Gel	68
II Synthèse et détection <i>in vivo</i> de nanoparticules à luminescence persistante	71
3 Composés à luminescence persistante synthétisés	73
3.1 Synthèse des matériaux et caractérisations	73

3.1.1	Synthèses des matériaux	73
3.1.2	Caractérisations de la luminescence	76
3.2	Composés à luminescence persistante rouge/infrarouge	78
3.2.1	MgSiO ₃	78
3.2.2	ZnMgSi ₂ O ₆	86
3.2.3	Ca _{0,2} Zn _{0,9} Mg _{0,9} Si ₂ O ₆	88
4	Détection <i>in vivo</i> de particules non modifiées	99
4.1	Injections locales	100
4.1.1	Injection sous-cutanée	100
4.1.2	Injection intramusculaire	102
4.2	Injection par voie intraveineuse	103
4.2.1	Biodistribution des particules non modifiées	105
4.2.2	Effet de la taille sur la biodistribution des particules	106
4.3	Expériences sur des animaux de taille plus importante	107
III	Fonctionnalisation et applications biologiques	111
5	Modification de la surface des nanoparticules	113
5.1	Stratégie de fonctionnalisation et méthodes	113
5.1.1	Fonctionnalisation	113
5.1.2	Exemples de fonctionnalisation	115
5.2	Couplage de molécules à la surface des nanoparticules	120
5.3	Greffage de fluorophores en surface	122
6	Expériences <i>in vivo</i>	125
6.1	Biodistribution des nanoparticules selon leur charge de surface	125
6.1.1	Particules positives	126
6.1.2	Particules négatives	127
6.1.3	Particules neutres	129
6.1.4	Analyse <i>ex vivo</i> et microscopie	130
6.1.5	Effet de l'injection de compétiteurs du système réticulo-endothélial sur la biodistribution	134
6.1.6	Temps de circulation des nanoparticules dans le sang	136
6.2	Détection de tumeurs	137
6.2.1	Tumeurs 3LL	138
6.2.2	Tumeurs B16	139
6.3	Évaluation de la reperfusion du foie après ischémie partielle	141
6.3.1	Expériences de visualisation de la reperfusion avec les nanopar- ticules	141
6.3.2	Évaluation de la toxicité hépatique des nanoparticules	142
6.4	Tolérance des nanoparticules: études toxicologiques préliminaires	145
6.4.1	Expériences <i>in vitro</i>	145
6.4.2	Expériences de suivi des particules au long terme	145
6.4.3	Évolution du poids des souris après injection intraveineuse de nanoparticules non fonctionnalisées	148

IV	Imagerie bimodale et imagerie 3D en luminescence	151
7	Imagerie bimodale	153
7.1	Intérêt des agents bimodaux	153
7.2	Fonctionnalisation pour l'obtention d'agents bimodaux	154
7.2.1	Agents bimodaux optique-scintigraphie	154
7.2.2	Agents bimodaux optique-IRM	154
7.3	Utilisation de agents bimodaux en imagerie	156
8	Imagerie optique tridimensionnelle	163
8.1	Principe de la reconstruction	164
8.2	Simulation du transport des photons par la méthode de Monte-Carlo .	164
8.3	Acquisition des données et reconstruction	166
8.3.1	Montage expérimental	168
8.3.2	Images obtenues	169
8.3.3	Reconstruction tridimensionnelle	170
8.4	Résultats	173
	Conclusion générale et perspectives	177
A	Partie expérimentale	181
B	Origine de l'autofluorescence	187
C	Effets des anions sur les gels	189
D	Composées à luminescence persistante verte ou bleue	195
E	Films des biodistributions (inclus uniquement dans le fichier pdf)	199

Introduction

L'objectif de cette thèse a été de développer et d'utiliser une *nouvelle classe de sondes optiques ayant des propriétés de luminescence persistante*. La luminescence persistante, plus connue du grand public sous le terme phosphorescence, est la propriété que possèdent certains matériaux de continuer à émettre de la lumière après la fin de l'excitation.

L'imagerie médicale, dont les principes physiques ont été développés pour la plupart il y a plus de 50 ans (plus de 100 ans pour la radiographie), connaît depuis une vingtaine d'années un développement fulgurant notamment grâce à l'amélioration de la précision des mesures et l'amélioration des capacités informatiques. L'image obtenue par les différentes techniques actuelles permet de condenser dans un espace réduit une somme d'informations extrêmement importantes. Dans le cas d'images scientifiques, ces informations sont généralement analysées et mémorisées bien plus rapidement qu'il ne serait possible à la lecture de données brutes.

Ce développement rapide répond à un besoin croissant d'images pour les biologistes et les médecins. De la simplification des travaux expérimentaux à une détection précoce de maladies, une dynamique s'est créée autour des recherches en imagerie. Chaque technique possède avantages et inconvénients, rendant ainsi complémentaires l'ensemble des imageries.

L'imagerie optique, utilisant les photons comme source d'information, est un domaine en pleine expansion avec des retombées directes en pharmacologie, dans le développement d'outils d'aide au diagnostique et de recherches en biologie moléculaire et cellulaire. Toutefois, les techniques de fluorescence présentent aujourd'hui de nombreuses limitations pour les études *in vivo*, notamment dues à l'autofluorescence des tissus, qui est très importante pour les longueurs d'ondes nécessaires à l'excitation de la plupart des fluorophores utilisés en biologie.

En analysant ces contraintes, un nouveau concept d'imagerie a éclos. Et s'il n'était plus nécessaire d'exciter les sondes optiques *in vivo*? Sachant que la bioluminescence utilise une réaction enzymatique pour produire de la lumière, que la scintigraphie et la tomographie à émission de positons utilisent une énergie stockée dans les atomes, n'est-il pas possible de stocker de la lumière dans des particules et de graduellement la restituer? C'est ainsi que ce sujet de thèse à l'interface entre science des matériaux et biologie est né.

Face au défi de l'interaction lumière-tissu que nous décrivons plus longuement au chapitre 1.3, nous avons défini un cahier de charge des caractéristiques principales du matériau recherché. Le matériau devait avoir les propriétés suivantes :

- une émission dans le rouge ou le proche infrarouge,
- une longue durée d'émission (au moins 10 min après la fin de l'excitation),
- une stabilité du signal en milieu aqueux,

- une taille nanométrique,
- la possibilité de modifier la surface des particules à des fins de ciblage.

Une émission dans le rouge ou le proche infrarouge permet de répondre aux contraintes liées à l'absorption des milieux biologiques. Plus la longueur d'onde d'émission se trouvera dans le rouge, moins les particules devront produire de luminescence pour avoir un signal détectable *in vivo* car le signal sera moins atténué par les tissus. Nous n'avons pas fixé de contraintes sur l'excitation, celle-ci se faisant généralement dans l'UV ou dans le bleu pour les matériaux à luminescence persistante. Un matériau qui aurait la capacité de se charger lors d'une excitation dans le rouge serait bien entendu très intéressant.

La longue durée d'émission de lumière après la fin de l'excitation permet de se débarrasser du bruit de fond dû à l'autofluorescence des tissus. L'autofluorescence des tissus ne dure que quelques dizaines de nanosecondes, une stratégie alternative peut être proposée. Il existe en effet des composés ayant un déclin de fluorescence supérieur aux fluorophores endogènes, notamment les Quantum dots et les chélates de terres rares/matériaux dopés terre rare. Il est donc envisageable de faire une acquisition différée dans le temps en faisant des pulses très courts d'excitation (via un laser). Toutefois, la mise en place d'une acquisition décalée dans le temps de quelques nano ou microsecondes (pour les terres rares) n'est pas évidente.

La stabilité du signal en milieu aqueux est une nécessité puisque les applications recherchées sont biologiques. Nous ne pouvons pas être sûr de cette stabilité au début de ce travail. En effet, certains matériaux commerciaux (notamment les matériaux de type sulfure) sont dégradés au cours du temps à cause de l'humidité. Il existe toutefois des techniques pour limiter cet effet en effectuant des traitements de surface [1].

La taille nanométrique est un critère important de sélection. Si les matériaux synthétisés étaient de taille trop importante (supérieure à quelques μm), le risque de ne pas pouvoir les injecter ou qu'ils ne puissent pas avoir accès à l'ensemble du réseau vasculaire aurait été important, réduisant ainsi grandement l'intérêt de telles sondes.

La possibilité de modifier chimiquement la surface des particules est également des plus importantes. Sans cela, il nous serait impossible de modifier le tropisme naturel des particules. Nous voulions de plus que cette fonctionnalisation soit simple et reproductible.

Le principe des expériences *in vivo* envisagées a été le suivant. Une suspension de particules est illuminée avec une source de lumière afin de charger les particules en énergie. Une quantité de nanoparticules est alors prélevée puis injectée dans un animal anesthésié. L'acquisition du signal se fait ensuite sans recourir à aucune source d'illumination externe. Seul un détecteur sensible aux faibles intensités est nécessaire.

L'avantage principal vient de l'absence totale de bruit de fond pour l'acquisition du signal. La seule source de lumière provient des particules. La seule source de signaux parasites proviendra donc du bruit lié à la caméra, qui est très faible.

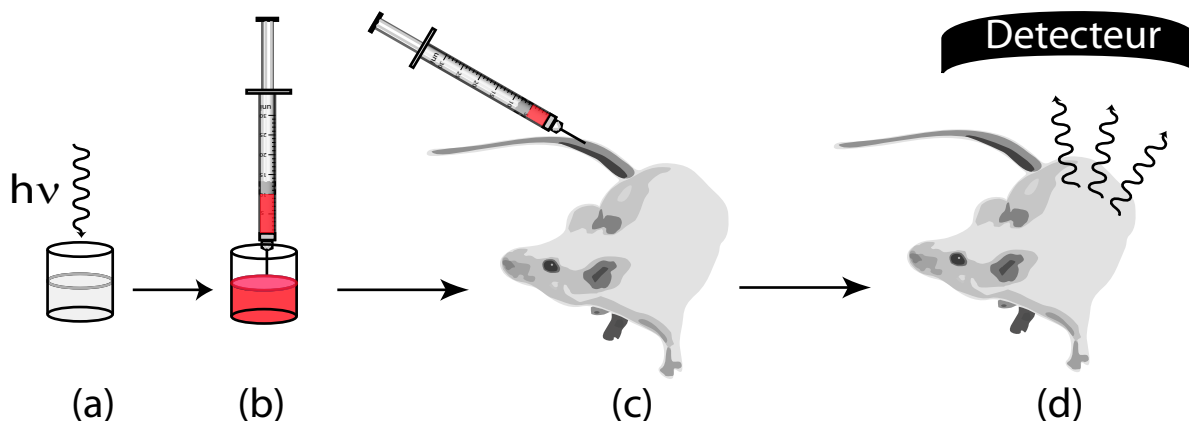


FIG. 1: Principe des expériences *in vivo* réalisées. a) Une suspension de particules est irradiée avec une lampe UV de laboratoire. b) La quantité nécessaire de liquide est alors prélevée puis c) injectée dans un animal anesthésié. d) L'acquisition du signal provenant de l'animal peut alors commencer sans besoin de source extérieur d'illumination.

Cette thèse a été découpée en 8 chapitres constituant quatre grandes parties.

Chapitre 1 : Présentation de différentes techniques d'imagerie

Nous présenterons brièvement les techniques d'imagerie qui sont actuellement largement utilisées en clinique à savoir les imagerie utilisant les rayons X (radiographie, scanner), l'Imagerie par Résonance Magnétique, les imageries utilisant des isotopes (Tomographie par émission de positons, scintigraphie et tomographie par émission monophotonique) et les imageries utilisant les ondes ultrasonores (échographie, doppler).

Nous présenterons ensuite les techniques d'imagerie optique qui concerne plus particulièrement ce travail en insistant sur les avancées récentes de ce domaine et en mentionnant les contraintes.

Chapitre 2 : Luminescence persistante et nanoparticules

La luminescence persistante sera présenté à travers les matériaux présentant cette propriété et à marquer la différence entre les applications actuelles de ces matériaux et l'application recherchée dans ce travail. Nous présenterons également le procédé Sol-Gel qui nous a permis de synthétiser les matériaux désirés sous forme de nanoparticules.

Chapitre 3 : Composés à luminescence persistante synthétisés

Nous détaillerons la synthèse des particules. Nous décrirons ainsi un certain nombre de matériaux qui ont été synthétisés durant cette thèse.

Chapitre 4 : Détection *in vivo* de particules non modifiées Les expériences *in vivo* réalisées avec les nanoparticules seront décrites dans ce chapitre. La détection *in vivo* de particules non fonctionnalisés après injection sous-cutanée, intramusculaire et intraveineuse ont été testée. Des essais visant à connaître la limite de détection ainsi que les profondeurs de tissus accessibles ont également été conduits.

Chapitre 5 : Modification de la surface des nanoparticules

Nous décrirons les méthodes de fonctionnalisation des particules, qui nous ont permis d'obtenir des particules portant différents groupements chimiques. Ces groupements permettent d'envisager le greffage d'un ensemble de fonctions chimiques.

Chapitre 6 : Expériences *in vivo*

La fonctionnalisation nous a permis d'obtenir des particules possédant des caractéristiques physico-chimiques variées. Celles-ci ont ainsi été testées *in vivo* et les biodistributions de différents types de nanoparticules étudiées. Des expériences montrant la localisation de tumeurs et portant sur le suivi de la reperfusion après ischémie hépatique seront présentées. Nous présenterons également ici quelques données sur la tolérance des particules *in vitro* et *in vivo* que nous avons pu analyser.

Chapitre 7 et 8 : Imagerie bimodale et imagerie optique tridimensionnelle

Ces deux chapitres sont un peu en marge du travail effectué. Le chapitre 7 vise à présenter des fonctionnalisations permettant d'effectuer de l'imagerie bimodale (optique-scintigraphie et optique-IRM) ainsi que des résultats préliminaires d'imagerie utilisant ces sondes. Le chapitre 8 décrit une tentative de reconstruction tridimensionnelle d'un signal optique.

Première partie

Luminescence persistante : vers un nouvel outil en imagerie optique

Chapitre 1

Présentation de différentes techniques d'imagerie

Sommaire

1.1	Imageries aux rayons X, spectroscopique, nucléaire et ultrasonore	10
1.1.1	Radiologie et scanner	10
1.1.2	Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	11
1.1.3	Imagerie nucléaire	14
1.1.4	Échographie	15
1.2	Imagerie optique	17
1.2.1	Mécanisme de luminescence mis en jeu	17
1.2.2	Utilisation des sondes optiques en imagerie	22
1.2.3	Instrumentation et acquisition des données en imagerie optique	31
1.3	Contraintes en imagerie optique	36
1.3.1	Contraintes liées aux sondes optiques	36
1.3.2	Contraintes liées aux milieux biologiques	42
1.4	Récapitulatif sur les techniques d'imagerie	47

Avant de présenter les techniques d'imagerie optique, nous allons présenter brièvement les techniques d'imagerie qui sont les plus utilisées en clinique. Historiquement développées pour des applications humaines, une miniaturisation a été nécessaire pour les adapter à l'étude du petit animal, le principe physique de chaque technique restant bien entendu identique. Nous donnerons plus de détails sur les techniques avec lesquelles nous avons réalisé des expériences durant ce travail, à savoir l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), la radiographie (scanner CT) et la scintigraphie.

Chaque technique d'imagerie possède des avantages et des inconvénients. Il est ainsi courant, notamment en clinique, d'associer plusieurs techniques pour arriver à un diagnostic final. Un tableau récapitulatif présentant les différentes caractéristiques principales de différents types d'imagerie sera présenté en conclusion de cette partie.

1.1 Imageries aux rayons X, spectroscopique, nucléaire et ultrasonore

1.1.1 Radiologie et scanner

Découverts en 1895 par W.C. Röntgen (prix Nobel en 1901), les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques haute fréquence dont la longueur d'onde est comprise entre 0.1 et 100 Å. L'énergie associée à ces rayonnements varie ainsi de quelques eV à plusieurs MeV. Après quelques expériences sur la capacité de ces rayonnements à traverser la matière sans être absorbés, Röntgen réalisa la première radiographie connue sur la main de son épouse. Cette nouvelle classe de rayons a trouvé très rapidement des applications en imagerie.

Le principe de la radiographie est basé sur l'absorption différentielle des rayons X selon les tissus. Les tissus peu denses comme les poumons absorbent peu les RX, tandis que les tissus denses, par exemple les os, les absorbent. Les RX ayant traversé le patient sont alors détectés soit sur une plaque photographique soit directement de façon numérique grâce à un détecteur RX couplé à un ordinateur. Les zones ayant fortement absorbé les RX apparaissent alors en blanc tandis qu'une zone noire traduit une faible absorption (voir Figure 1.1). Grâce à l'amélioration progressive de la précision des images ainsi que la diminution de la dose de rayons X nécessaire à l'acquisition des données, il s'agit d'une technique incontournable en clinique. La tomographie axiale calculée ou imagerie CT (Computed Tomography) correspond à une évolution de la radiographie. Le principe du scanner réside dans l'obtention d'un ensemble de projections (correspondant à une radiographie simple) avec une rotation du tube à rayons X autour du patient. L'ensemble de ces vues permettent ensuite par le calcul d'obtenir une reconstruction tridimensionnelle. Le premier scanner à rayons X a été développé par G.N. Hounsfield (prix Nobel 1979) en 1972.

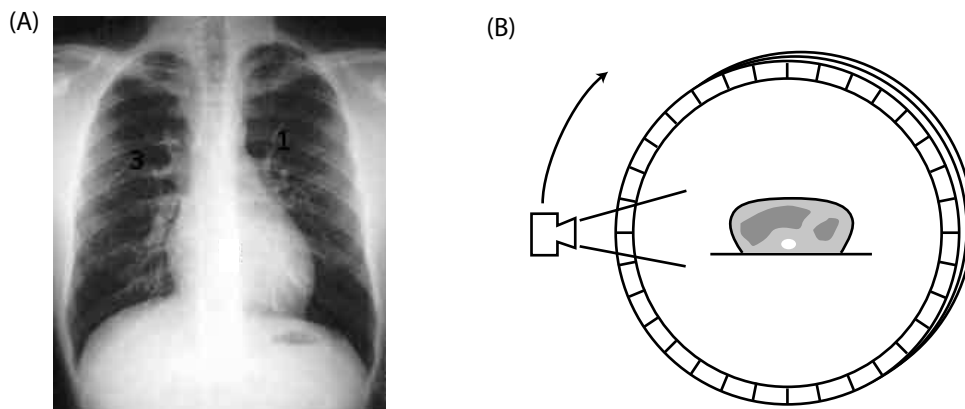


FIG. 1.1: (A) Radiographie des poumons. Les poumons, peu denses, n'absorbent pas les RX et apparaissent en noir, tandis que la masse osseuse apparaît en blanc. (B) Principe du scanner. Un tube à rayons X tourne autour du patient permettant l'acquisition d'un ensemble de coupes selon plusieurs vues. Une reconstruction informatique permet la visualisation tridimensionnelle du patient.

Les applications de la radiographie sont principalement osseuses, pulmonaires et sénologiques (mammographie). Pour le scanner, les applications les plus courantes sont des examens abdominaux et cérébraux. Des produits de contraste à base d'iode sont utilisés pour les études vasculaires.

1.1.2 Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'Imagerie par Résonance Magnétique est basée sur le phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Cette technique permet de sonder les propriétés d'une molécule et de son environnement chimique via l'interaction d'un champ magnétique avec les moments magnétiques nucléaires de certains atomes. E.M Purcell et F. Bloch furent les premiers à mettre en évidence ce phénomène en 1946, ce qui leur valut de recevoir un prix Nobel en 1952.

Le noyau de certains atomes possède un nombre impair de nucléons (protons et neutrons) comme par exemple ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si , ^{31}P . . . Ces noyaux possèdent alors un moment magnétique non nul caractérisé par une grandeur quantique, le spin nucléaire, détectable en RMN. En IRM, le spin le plus étudié est celui du proton, l'eau étant le constituant principal du corps humain.

Grâce à l'application d'un champ magnétique continu B_0 , le moment magnétique nucléaire s'aligne soit dans le sens du champ (spin $+1/2$) soit dans le sens opposé (spin $-1/2$). Un moment magnétique macroscopique lié à l'ensemble de spins se crée alors grâce au peuplement légèrement plus important de l'état le plus stable (spin $+1/2$). L'IRM, tout comme la RMN, étudie l'évolution de l'aimantation macroscopique lors de son retour à l'équilibre (alignement selon B_0) après une perturbation externe. La perturbation est provoquée par une bobine alimentée en courant haute fréquence créant un champ auxiliaire perpendiculaire au champ B_0 . En jouant sur la durée et l'amplitude de l'impulsion radiofréquence, il est possible de faire basculer l'aimantation selon un axe faisant un angle quelconque avec B_0 . Une fois l'impulsion réalisée, le système revient spontanément à l'équilibre par un phénomène de relaxation caractérisé par plusieurs temps : le temps T_1 , T_2 et T_2^* (voir Figure 1.2).

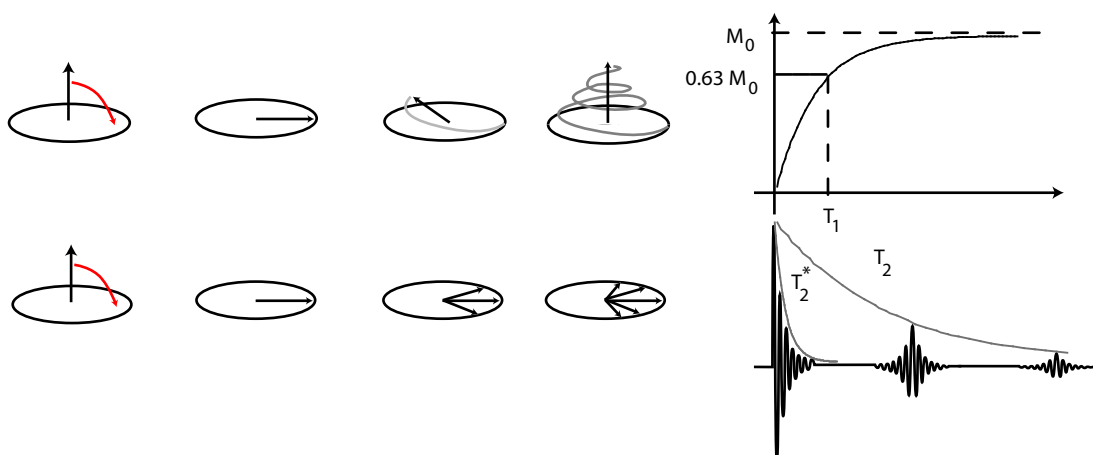


FIG. 1.2: Retour à l'équilibre de l'aimantation après perturbation. Le temps T_1 correspond à la relaxation longitudinale (selon l'axe du champ) tandis que T_2 et T_2^* sont des temps caractéristiques de la relaxation transversale (plan perpendiculaire au champ)

Le temps T_1 correspond à la relaxation longitudinale. C'est le temps pour lequel 63 % du signal original est retrouvé. Le temps T_2 correspond à la perte du signal transversal. Cette perte est due à la fois à la relaxation du signal et aux inhomogénéités du champ dues aux spins voisins. Comme le champ magnétique vu par chaque spin n'est pas homogène et que les spins précessent proportionnellement à leur champ local, un déphasage des spins est observée. Ce déphasage diminue ainsi l'aimantation transversale plus rapidement que le retour réel à l'équilibre du moment magnétique macroscopique. Le temps T_2^* tient compte quant à lui des inhomogénéités du champ B_0 et des variations locales de susceptibilité magnétique dans l'échantillon.

Le passage de la RMN à l'IRM nécessite de pouvoir localiser tridimensionnellement le signal. Cette localisation n'est pas possible directement par analyse des signaux radiofréquences. Il est nécessaire de réaliser un encodage spatial des spins par l'application d'un champ magnétique à gradient linéaire. La fréquence de résonance des spins dépendra alors de leur position dans ce gradient. L'image est ensuite classiquement reconstruite en appliquant une transformée de Fourier.

Une séquence classiquement utilisée en IRM est la séquence d'écho de spin (voir Figure 1.3). Elle consiste à appliquer un pulse RF 90° pour faire basculer l'aimantation dans le plan transverse. Après cette impulsion, les inhomogénéités provoquent un déphasage de l'ensemble des spins qui vont être partiellement rephasés par une impulsion RF 180° . Ce pulse va engendrer une récupération du signal, appelée écho. Le signal observé varie selon :

$$S = k\rho(1 - e^{-TR/T_1})e^{-TE/T_2} \quad (1.1)$$

où T_1 et T_2 sont les temps caractéristiques de l'échantillon, TR le temps de répétition (temps entre deux séquences consécutives), TE le temps d'écho (temps entre le pulse 90° et le pulse 180°), ρ la densité de protons et k une constante.

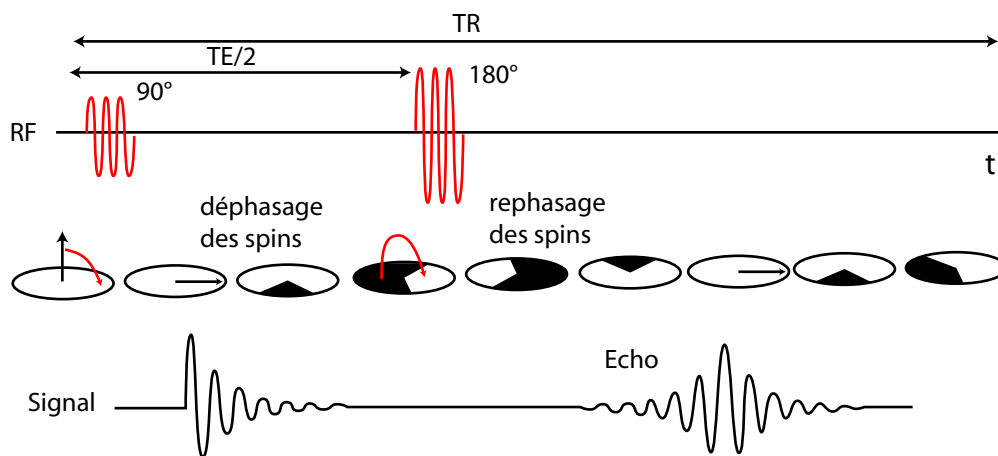


FIG. 1.3: Principe d'une séquence IRM écho de spin. Après basculement dans le plan transverse, un déphasage des spins est observé. Une séquence radiofréquences 180° permet le rephasage partiel des spins, créant un "écho" au niveau du signal récupéré.

Selon les temps TR et TE utilisés, il est possible de mettre en valeur soit les inhomogénéités des T_1 de l'échantillon soit les temps T_2 .

Pondération en T_1 La séquence de Spin Echo T_1 est une séquence Spin Echo pour laquelle les paramètres TR et TE sont optimisés afin de refléter les différences de relaxation T_1 . On choisira des temps TR et TE courts. Les tissus à T_1 court (comme l'eau) vont apparaître en blanc (hypersignal), tandis que les structures à T_1 long apparaissent en noir (hyposignal).

Pondération en T_2 La séquence de Spin Echo T_2 va mettre en relief les différences de relaxation en T_2 en fixant un temps TR et TE longs. Les tissus à T_2 long vont apparaître en hypersignal alors que les structures à T_2 court qui apparaîtront en hyposignal.

Des exemples d'images obtenues avec les deux types de pondération sont donnés à la Figure 1.4.

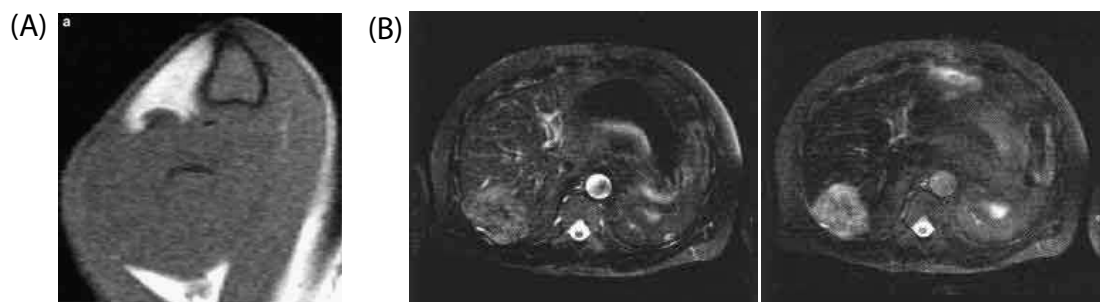


FIG. 1.4: (A) Injection intramusculaire de Dotarem (Guerbet) montrant un réhaussement du signal (en haut à gauche) en IRM avec une acquisition en pondération T_1 (d'après [2]) (B) Images avant et après injection systémique d'Endorem (Guerbet) – particules de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – montrant une diminution du signal en IRM en pondération T_2 au niveau du foie. La tumeur captant moins les particules ressort donc en blanc (Images : Dr Adrian Knowles, Hull MRI Centre)

Les applications de l'IRM en clinique sont nombreuses en pathologie neurologiques, ostéo-articulaires et cardiaques. L'IRM se substitue au scanner en cas d'allergie aux produits iodés. L'IRM peut également être une imagerie fonctionnelle, révélant par exemple dans le cerveau des zones activées par un stimulus. Il est possible de réaliser des examen corps entier (assez rare à cause de la durée de l'acquisition) ou sur des zones particulières (tête, genoux ...).

Pour augmenter le signal, il est possible d'utiliser des agents de contraste. Ces derniers se divisent en deux grandes catégories : ceux qui vont favoriser la relaxation et donc le retour à l'équilibre (influençant ainsi les temps T_1 et T_2), et ceux qui vont favoriser le désordre et le déclin de l'aimantation transversale (influençant les temps T_2). Le gadolinium, sous forme de complexe, est l'agent classiquement utilisé pour réaliser une IRM en T_1 , avec un hypersignal marquant la présence de l'agent de contraste. Les nanoparticules de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ appelé SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxide ou Small particles of Iron Oxide) ou USPIO (Ultra-small SPIO) provoquent quant à elles un hyposignal localisable en contraste T_2 .

1.1.3 Imagerie nucléaire

Scintigraphie et tomographie par émission mono-photonique (SPECT)

La scintigraphie et la tomographie par émission mono-photonique (SPECT) utilise des isotopes émetteurs de rayonnements γ comme le ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I ou ^{131}I . La détection se fait à l'aide de caméras appelées γ -caméras (voir Figure 1.5) qui sont composées :

- d'un collimateur servant à améliorer la résolution spatiale de l'image,
- d'un scintillateur capable de transformer les photons γ en photons visibles,
- d'un photomultiplicateur permettant la transformation des photons visibles en électrons par effet photoélectrique. Le signal est alors recueilli et transféré à l'électronique du système.

Avant détection, ces rayonnements sont légèrement absorbés par les tissus, le coefficient d'absorption variant de $0,05\text{ cm}^{-1}$ à $0,5\text{ cm}^{-1}$ selon les tissus traversés et l'isotope utilisé. Par effet Compton, un phénomène de diffusion des photons γ est également observé au niveau du patient et du détecteur, ce qui provoque une augmentation du bruit de fond.

Il existe de nombreux marqueurs utilisés en scintigraphie. On pourra citer sans être exhaustif l'utilisation d'iode 123 pour un examen de la thyroïde, des biphosphonates marqués au technétium en scintigraphie osseuse, l'albumine ou les globules rouges marqués juste avant injection intraveineuse ou encore des ligands marqués pour la détection de zones particulières comme des tumeurs.

Cette technique, tout comme le PET décrit ci-dessous, permet de réaliser une imagerie à la fois atomique et fonctionnelle.

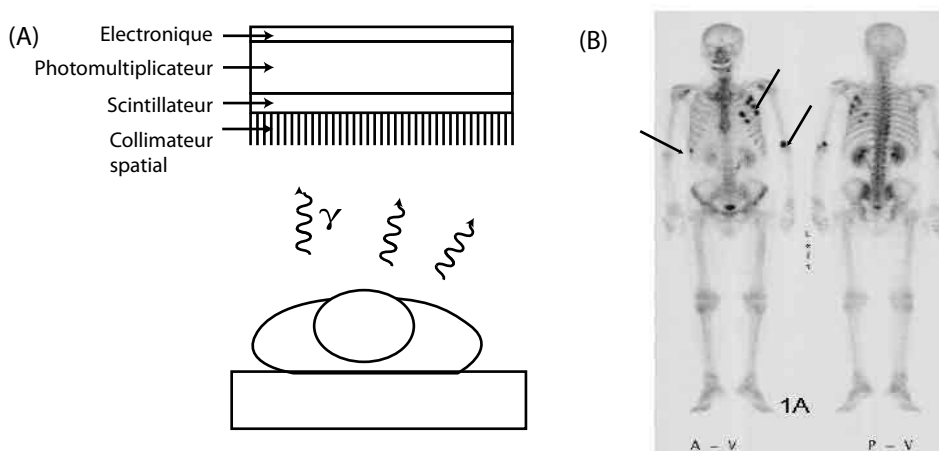


FIG. 1.5: (A) Principe de l'acquisition SPECT. Un isotope émetteur de rayonnement γ est administré à un patient et détecté à l'aide d'une caméra dédiée. (B) Applications cliniques des études scintigraphiques. On pourra citer la scintigraphie cardiaque, thyroïdienne ou encore osseuse comme le montre cette figure. Les liaisons osseuses, marquées par une flèche noire, sont visibles en utilisant des biphosphonates marqués. [3]

Tomographie par émission de positons (PET)

La technique PET enregistre des rayonnements plus énergétiques que ceux utilisés en SPECT. Certains noyaux émettent en se désintégrant des électrons chargés positivement appelés positons. Ces positons perdent leur énergie cinétique sur une distance relativement importante avant de se recombiner avec un électron. De cette réaction qui aboutit à la disparition de la paire positon-électron sont produits deux photons γ d'énergie 511 keV, émis de façon synchrone dans des directions opposées. Une couronne de détecteur entourant le patient permet de détecter ces photons γ (voir Figure 1.6). Une reconstruction informatique complexe et coûteuse en ressource informatique permet de visualiser la distribution tridimensionnelle du traceur. Il est à noter que l'émission des photons γ ne se produisant pas exactement à l'endroit où se trouve l'isotope émetteur de positon, il en résulte une imprécision inhérente à la technique PET sur la détermination de la position spatiale du traceur qui ne peut être corrigée.

Certaines molécules biologiques peuvent être marquées à l'aide d'un isotope émetteur de positon comme le ^{11}C , le ^{13}N , le ^{15}O ou le ^{18}F . L'utilisation du PET est variée. Une des applications courantes est la détection de tumeur par un marquage au glucose ^{18}F -FDG. Contrairement à son analogue naturel, le 2-déoxyglucose, il ne peut suivre la même voie métabolique et ainsi s'accumule dans les cellules. Les organes consommant les plus de glucose, comme le cerveau, le cœur ou une tumeur, sont ainsi mis en évidence. La sensibilité de cette technique est excellente et permet ainsi de détecter de 10^5 à 10^6 cellules cancéreuses (correspondant à une tumeur de quelques mm [4]).

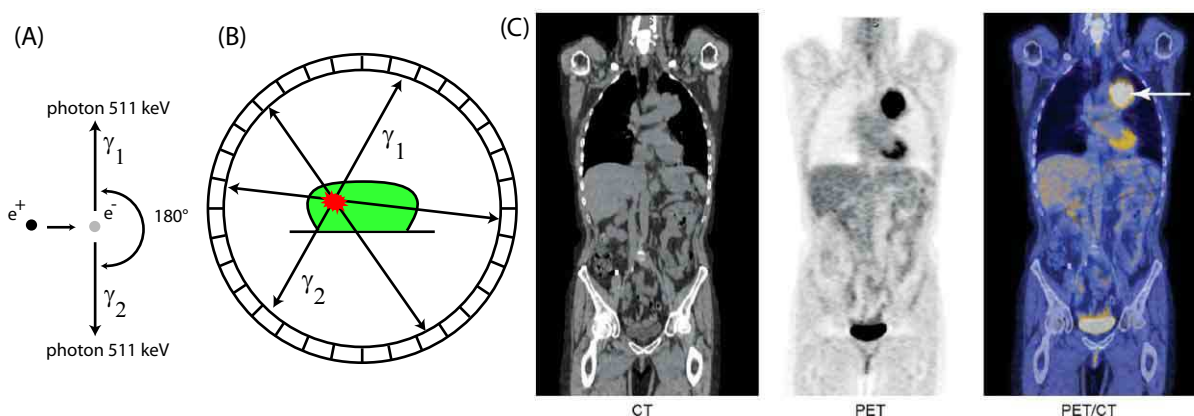


FIG. 1.6: (A) Recombinaison de la paire positon-électron provoquant la création de 2 photons γ dans des directions opposées (B) Schéma représentatif d'une machine PET (C) Applications du PET pour la détection de tumeur par l'utilisation de ^{18}F -FDG. L'utilisation en parallèle d'une imagerie CT permet de localiser anatomiquement la position des centres émetteurs (image tirée de [5])

1.1.4 Échographie

L'échographie et le doppler sont deux techniques d'imagerie couramment utilisées en clinique employant des ultrasons. Les ultrasons des ondes élastiques à la différence

des ondes électromagnétiques. L'élément de base de l'échographie est un matériau piézoélectrique qui a la propriété de transformer l'énergie électrique en énergie mécanique. Situé dans une sonde, elle génère des ultrasons grâce à des impulsions électriques (fonctionnement en émission) et inversement génère des signaux électriques grâce à des vibrations mécaniques (fonctionnement en réception).

L'échographie utilise les variations de la vitesse de propagation des ondes acoustiques à travers les différents tissus. Associé à l'échographie, le Doppler utilise quant à lui la différence entre la fréquence de l'onde acoustique émise et celle de l'onde réfléchie lorsque la cible est en mouvement.

Les fréquences des ultrasons varient de 2 à 14 MHz selon l'application et la profondeur des tissus à imager. L'atténuation des ultrasons dépend des milieux traversés, mais aussi des caractéristiques de l'onde ultrasonore, et en particulier de la fréquence des ultrasons. Une augmentation de la fréquence des ultrasons permet une amélioration de la résolution spatiale avec toutefois une atténuation du signal plus importante limitant la profondeur des tissus observables lors de l'examen.

Les échos du signal (qui correspondent à des réflexions de l'onde dans les tissus) sont captés par cette même céramique, qui joue alors le rôle de récepteur : on parle alors de transducteur ultrasonore. L'image ultrasonore est reconstituée à partir des informations recueillies par la sonde et transmises à l'appareil. Les informations sont traitées pour déterminer la position et l'intensité de l'écho, et représenter l'image (ou le signal) à interpréter par l'opérateur.

Les applications de l'échographie sont principalement les examens obstétricaux, cardiologiques, et vasculaires. Les agents de contraste réhaussant le signal échographique sont des microbulles de type coquille/gaz où le gaz peut être de l'air ou des gaz fluorés.

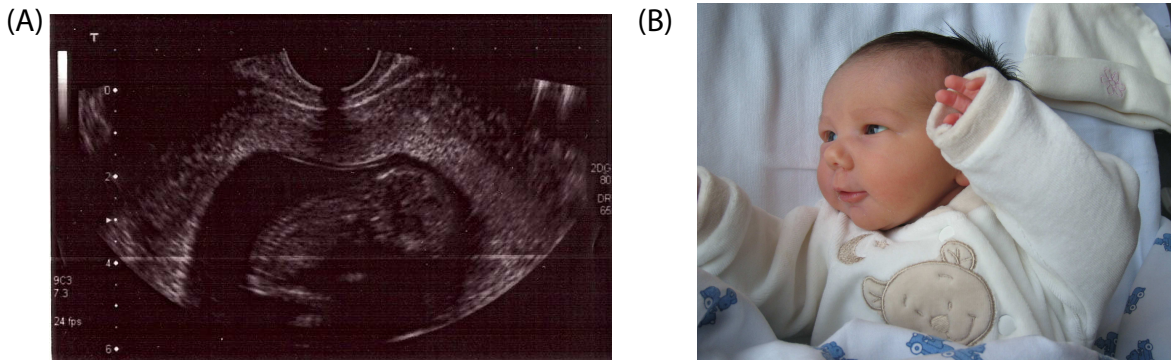


FIG. 1.7: Échographie de Pauline, ma petite nièce, 6 mois avant sa naissance. (B) Pauline, 3 jours.

1.2 Imagerie optique

L'imagerie optique utilise les photons comme source d'information. Il s'agit d'une technique émergente comparativement aux autres techniques d'imagerie précédemment décrites. Ce type d'imagerie est toutefois en pleine évolution tant au niveau des sondes et de leur utilisation qu'au niveau du matériel et des logiciels de traitement des données. Nous ne présenterons pas ici les techniques d'imagerie optique n'employant pas de fluorophores, comme l'imagerie par transillumination ou l'OCT (Optical coherence tomography). Il s'agit toutefois de techniques physiques de premier plan en pleine expansion avec des applications d'or et déjà en clinique (mammographie, dermatologie et ophtalmologie).

En biologie, les sondes lumineuses sont largement utilisées et ont trouvé de nombreux domaines d'applications [6]. Par leur coût relativement faible tant au niveau des molécules que de l'appareillage, les méthodes optiques sont de plus en plus utilisées remplaçant ainsi d'autres techniques comme les sondes isotopiques. Elles permettent de visualiser des mécanismes biologiques que cela soit au niveau cellulaire ou au niveau d'un organisme entier. L'imagerie optique est ainsi un domaine en pleine expansion avec des retombées directes en pharmacologie, dans le développement d'outils d'aide au diagnostic et de recherches en biologie moléculaire et cellulaire.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord expliciter les différents mécanismes physiques qui donnent lieu à l'émission de lumière par une molécule, une protéine ou un matériau. Le cas particulier de la luminescence persistante sera abordé dans la partie 2. Nous passerons ensuite en revue quelques applications d'études biologiques issues de la littérature utilisant les différents types de sondes optiques disponibles.

1.2.1 Mécanisme de luminescence mis en jeu

La *luminescence* se caractérise par l'émission spontanée de photons par une substance ayant absorbée de l'énergie au cours d'une excitation non thermique (à la différence de l'incandescence). L'excitation de ce composé se fait par apport d'énergie d'origines diverses. On peut citer, sans être exhaustif, l'excitation par des longueurs d'ondes de l'ultraviolet (UV), du visible ou de l'infrarouge (IR), par des rayonnements X, par des réactions chimiques (chimiluminescence) ou enzymatiques (bioluminescence), par des excitations électriques (électroluminescence) ou encore mécaniques (triboluminescence). La luminescence est issue d'une désactivation d'une molécule excitée vers un état énergétique moins élevé. Les mécanismes de désexcitation sont variés, ce qui explique la diversité des termes employés en optique. Nous allons décrire certains mécanismes particuliers comme la fluorescence, la phosphorescence, la fluorescence retardée. . . , chaque mécanisme ayant trouvé des applications en biologie.

Fluorescence Le mécanisme de la fluorescence est le suivant : les photons d'une source lumineuse peuvent être absorbés par un atome ou une molécule, la faisant passer de son état fondamental à un état excité. Cette absorption de lumière se fait de façon extrêmement rapide (environ 10^{-15} s). La relaxation à l'état singulet excité de plus faible énergie, appelée conversion interne, se produit par échange thermique avec le milieu en environ 10^{-11} s.

Ensuite, chaque molécule peut perdre son énergie soit de façon radiative en émettant un photon - c'est la fluorescence qui se produit en un temps de l'ordre de la nanoseconde - soit de façon non radiative en transformant cette énergie en énergie de rotation ou de vibration.

Phosphorescence La définition du terme phosphorescence donnée par l'IUPAC¹ est la suivante : il s'agit de la luminescence impliquant un changement de multiplicité de spin, comme par exemple des désexcitations d'un niveau triplet à singulet ou vice-versa. De même, une désexcitation radiative impliquant le passage d'un état quartet à un état doublet sera également appelée phosphorescence.

Dans la majorité des cas, le phénomène de phosphorescence intervient entre un niveau singulet et un niveau triplet. Une partie de l'énergie d'excitation est transférée d'un état excité singulet vers un état excité triplet par croisement inter-système. Le retour vers l'état fondamental n'est alors pas immédiat. En effet, pour des raisons quantiques, les émissions avec changement de multiplicité de spin sont interdites (règle de spin) ; l'électron reste donc bloqué dans l'état triplet pendant un temps relativement long (de quelques millisecondes à quelques secondes), avant que des modifications de son environnement lui permettent une désexcitation radiative. Ainsi la phosphorescence aura toujours une durée de vie plus longue qu'une fluorescence classique. Toutefois il n'y a pas équivalence (à part dans le langage commun) entre durée d'émission et phosphorescence. D'autres phénomènes peuvent être en effet à l'origine de durées d'émission longues.

Ces différents scénarii entre fluorescence et phosphorescence sont résumés dans le diagramme de Jablonski (voir Fig. 1.8). Ce diagramme illustre les différentes transitions électroniques et les différents phénomènes de désexcitation possibles. Il est à noter qu'une molécule ayant des propriétés de phosphorescence aura également des propriétés de fluorescence.

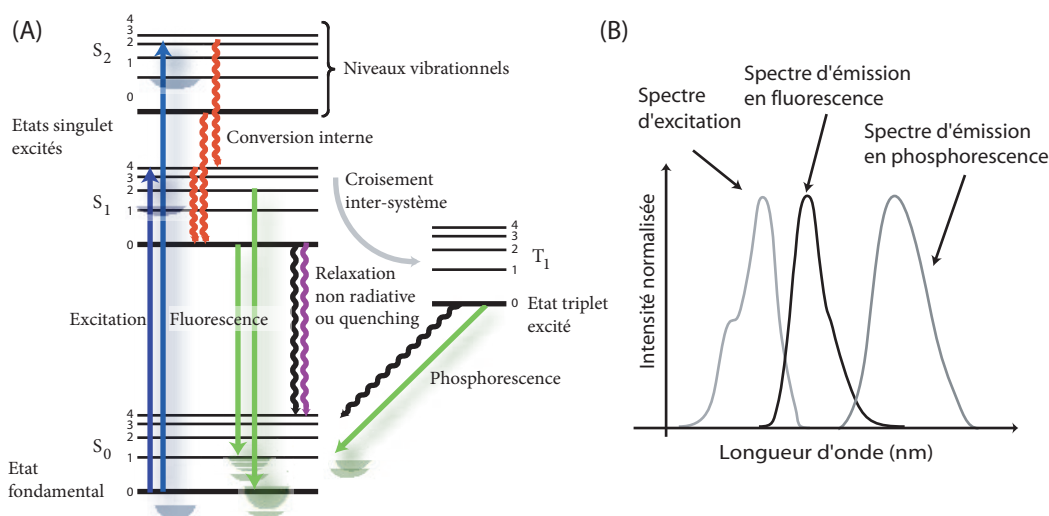


FIG. 1.8: (A) Diagramme de Jablonski (B) Spectre d'excitation d'une molécule avec son spectre d'émission en fluorescence et en phosphorescence

¹International Union of Pure and Applied Chemistry

Outre le fait qu'en phosphorescence la durée d'émission sera plus longue, le spectre d'émission sera également décalé vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à celui obtenu en fluorescence. Ceci vient du fait que l'état excité triplet est de plus faible énergie que l'état singulet dont il est issu. De plus, à la différence de la fluorescence, la durée de phosphorescence est grandement affectée par la température. Il est ainsi plus aisé de mettre en évidence le phénomène de phosphorescence à basse température. A température ambiante, il peut être difficile de distinguer fluorescence et phosphorescence tant les temps d'émission sont proches.

Plus rarement rencontrés, on peut citer comme exemple de composés phosphorescents l'oxygène triplet (état fondamental : $^3\text{O}_2$, état excité $^1\text{O}_2$, $\lambda_{em}=1270\text{nm}$) ou les composés aromatiques conjugués (porphyrines, chlorophylle ...).

Fluorescence retardée La fluorescence retardée est un phénomène plus complexe mais bien connu. Trois mécanismes différents ont été mis en évidence :

- la fluorescence retardée de type E (pour éosine) : Il s'agit d'un processus dans lequel un état triplet excité est converti en état singulet grâce à une activation thermique (voir Figure 1.9). Comme il y a équilibre entre les populations d'état triplet et singulet, les temps de vie de la fluorescence retardée et de la phosphorescence du composé sont égaux.
- la fluorescence retardée de type P (pour pyrène) : Ce processus provient de l'interaction de deux molécules qui se trouvent dans un état triplet excité. Il y a alors une annihilation triplet-triplet engendrant la création d'une molécule dans un état singulet et l'autre dans l'état fondamental. La molécule excitée revient alors à son niveau fondamental par fluorescence.
- la fluorescence retardée issue de recombinaisons : un état singulet peut être peuplé par recombinaison d'un ion radicalaire avec des électrons ou par recombinaison avec une charge opposée.

La fluorescence retardée dure ainsi plus longtemps après la fin de l'excitation, tout en ayant le même spectre d'émission que celui observé en fluorescence spontanée. Ceci permet de différencier fluorescence retardée et phosphorescence.

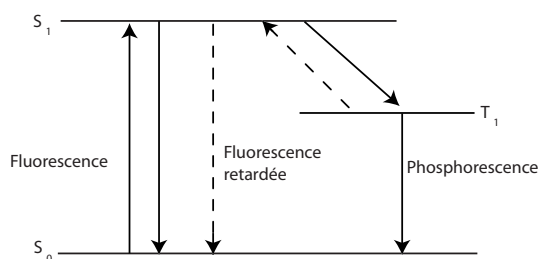


FIG. 1.9: Phénomène de fluorescence retardée de type E

Excitation multiphotonique L'excitation lumineuse d'une molécule se fait normalement par l'absorption d'un photon ayant une énergie E . L'excitation biphotonique consiste à concentrer un faisceau lumineux afin de provoquer l'absorption simultanée de deux photons ayant une énergie $E/2$. Une fois excitée, la molécule va alors émettre un photon en fluorescence, comme si elle avait été excitée par un photon unique. Il s'agit

d'un processus assez inhabituel puisque des photons de faible énergie sont " transformés " en photons d'énergie supérieure (déplacement anti-Stockes). Ce processus non-linéaire d'absorption a été proposé en 1931 par M. Göpper-Mayer [7].

On peut comprendre ce mécanisme par la création d'un état virtuel qui se trouverait entre l'état fondamental et l'état excité. En raison de la très faible probabilité de cette double absorption, ce type d'excitation nécessite des sources lumineuses intenses et focalisées. Des lasers à impulsions très courtes sont en général utilisés. L'excitation multiphotonique correspond au même phénomène avec un nombre de photons absorbés simultanément plus élevé.

L'excitation multiphotonique s'observe pour la plupart des fluorophores organiques. Il s'agit donc d'une technique alternative d'excitation. Par exemple, une molécule pourra avoir un spectre d'excitation dans le bleu et un spectre d'excitation biphotonique dans le rouge ou l'infrarouge.

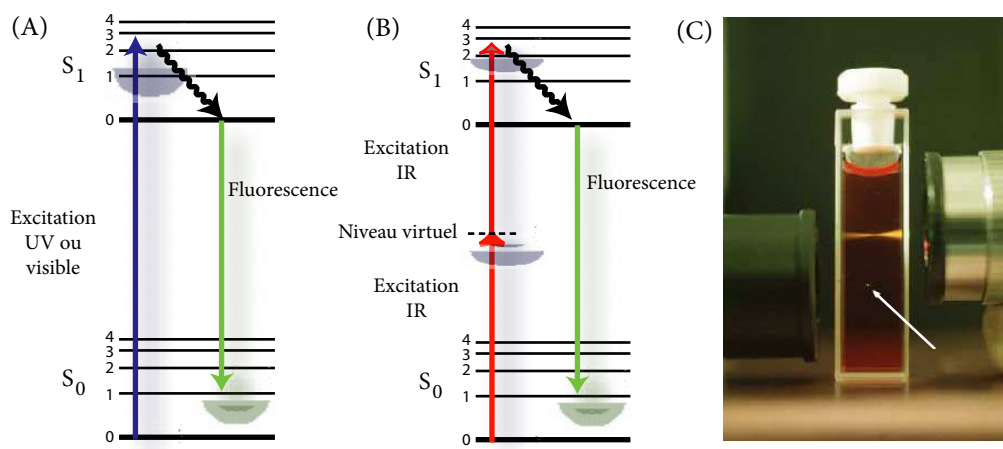


FIG. 1.10: Phénomène d'absorption bi-photonique pour une molécule (A) Fluorescence par excitation simple (B) Mécanisme d'excitation en biphotonique (C) exemple d'excitation dans une cuve safranin O. en haut excitation à laser helium-neon en bas laser nD YLF femtoseconde (1046 nm) (Photo :Brad Amos,MRC, Cambridge)

Un des avantages de l'excitation biphotonique provient du fait que l'excitation est ponctuelle (de part la focalisation de la source lumineuse). Utilisant ce principe, W. Denk a développé en 1990 une nouvelle technique d'imagerie basée sur la microscopie de fluorescence par balayage laser [8]. En balayant la surface d'un échantillon (comme un tapis de culture cellulaire), on peut réaliser une image dans un plan (comme en microscopie confocale) dont la résolution dépend du volume d'excitation à deux photons. En modifiant la position de l'optique de focalisation par rapport à l'échantillon, on déplace la position, ce qui permet d'obtenir une série de plan de coupes d'imagerie qui après reconstruction donne une image en trois dimensions de l'échantillon et de ses structures. Son utilisation *in vivo* permet également d'obtenir des images très précises (notamment au niveau des neurones) avec des profondeurs d'analyse relativement importantes (quelques centaines de μm) [9].

Chimiluminescence et bioluminescence La chimiluminescence correspond à la production de photons grâce à une excitation provenant d'une réaction chimique. Il n'y a

donc pas d'excitation externe mais conversion d'énergie chimique en énergie lumineuse. Les exemples de réactions chimiques donnant lieu à la production de lumière sont nombreux. La plus connue reste la réaction du luminol avec l'eau oxygénée, réaction intervenant dans des produits industriels comme les sticks lumineux.

La bioluminescence est une chimiluminescence particulière puisqu'elle fait intervenir une réaction enzymatique.

FRET et BRET La fluorescence par transfert résonant d'énergie (FRET) correspond à un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes par un mécanisme de couplage faible dipôle-dipôle. Pour que ce phénomène apparaisse, deux paramètres sont essentiels. Le premier est un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur. Le deuxième est la proximité spatiale entre donneur et accepteur. L'efficacité de transfert, décrit par T. Förster dans les années 1960 [10], décroît en effet avec la distance R séparant les deux fluorophores selon une loi en $1/(1 + (R/R_0)^6)$, R_0 étant le rayon de Förster caractérisant la distance où 50% de l'énergie est transférée². Cette distance dépend des propriétés spectroscopiques des fluorophores et de leur orientation l'un par rapport à l'autre. Toutefois, si la distance séparant donneur et accepteur excède 10 nm, le transfert d'énergie n'aura pas lieu. L'acronyme BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) correspond à un FRET où le donneur est une molécule bioluminescente.

Depuis 40 ans, les techniques de FRET et de BRET ont ainsi été largement utilisées pour des études de changements de conformations intra ou inter-moléculaires. Les propriétés de transfert d'énergie permettent également de mesurer des distances d'ordre nanométrique intervenant pour l'analyse moléculaire de processus biologiques.

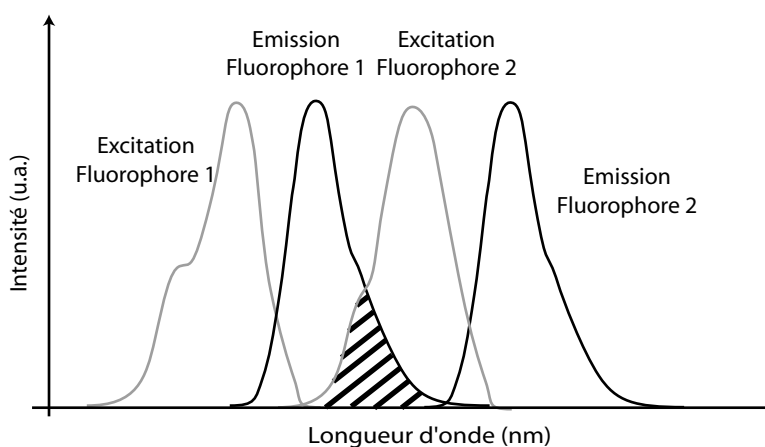


FIG. 1.11: Principe du FRET. Le recouvrement entre spectre d'émission du fluorophore 1 et le spectre d'excitation du fluorophore 2 correspond à la zone striée.

²la valeur de R_0 est donnée par $R_0 = (8,79 \times 10^{-5} J \eta n^{-4} \kappa^2)^{1/6}$, où J est le recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, η le rendement quantique du donneur, n l'indice de réfraction du milieu et κ^2 le facteur d'orientation qui est fonction de l'orientation entre les dipôles électroniques d'émission du donneur et de l'accepteur. Sans orientation particulière, κ^2 vaudra $2/3$

Conclusion sur les mécanismes de luminescence Comme nous avons pu le voir, il existe un grand nombre de mécanismes physiques donnant lieu à la production de lumière. Dans certains cas, une distinction entre mécanismes n'est pas aisée, comme par exemple entre fluorescence retardée et phosphorescence. Au delà de l'aspect sémantique, la compréhension des différents phénomènes permet de classer les différentes techniques d'imagerie optique. Chaque sonde optique peut ainsi être rattachée à son mécanisme de luminescence.

1.2.2 Utilisation des sondes optiques en imagerie

Nous allons présenter quelques sondes ainsi que leurs applications. Il existe une grande variété de sondes optiques, chacun ayant des caractéristiques propres. L'expérimentateur devra ainsi choisir la sonde qui lui semble la plus appropriée à son expérience.

Fluorophores organiques et inorganiques

Fluorophores organiques Les fluorophores organiques sont principalement utilisés en tant que marqueurs lors d'expériences *in vitro*. Le choix du fluorophore (voir tableau 1.1) dépend de nombreux critères, comme sa couleur d'émission, son spectre d'excitation, son rendement quantique de luminescence, sa stabilité optique, les possibilités de le greffer à l'objet d'étude...

Ils sont utilisés soit directement comme marqueurs cellulaires soit par greffage sur un peptide, une protéine ou encore sur un anticorps pour faire de l'immunomarquage. Ainsi, le marquage du noyau s'effectue généralement avec du DAPI se liant à l'ADN alors que le marquage de la tubuline, permettant de visualiser le cytosquelette, peut se faire par greffage de FITC sur un anticorps anti-tubuline.

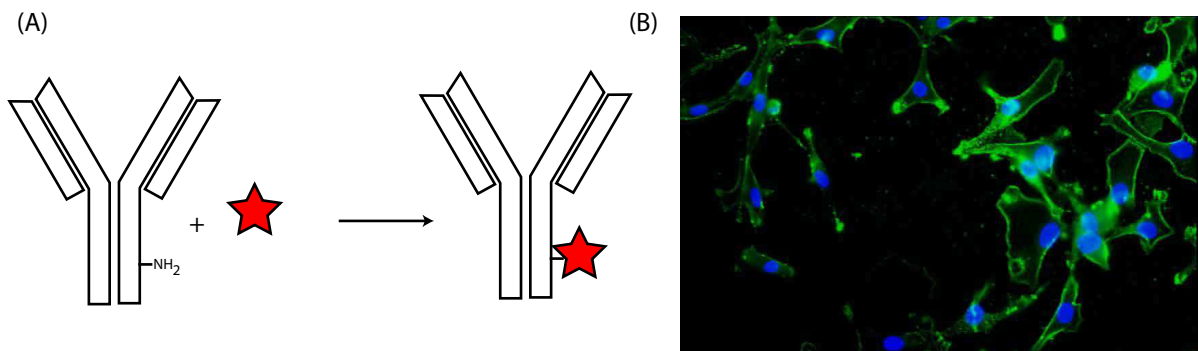


FIG. 1.12: (A) Greffage d'un fluorophore sur un anticorps. La présence de groupements amine ou thiol permet la liaison covalente avec un fluorophore. (B) Exemple de marquage cellulaire. Les noyaux de cellule U87MG ont été marqués au DAPI. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées dans cette lignée cellulaire sont révélées par un anticorps marqué au FITC.

Avec le développement de nouvelles sondes (notamment la famille de Cyanines et des AlexaFluor), l'utilisation des fluorophores s'est étendue progressivement aux études *in vivo*. Il est en effet possible de suivre le ciblage de molécules par des méthodes optiques.

Fluorophores	λ_{ex}	λ_{em}
Allophycocyanin (APC)	650	660
Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)	490	520
Rhodamine B-Isothiocyanate (RITC)	570	595
Texas Red	596	620
Cy 3	552	565
Cy 5	650	667
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
AlexaFluor 488	495	519
AlexaFluor 546	556	573
AlexaFluor 647	650	668
AlexaFluor 750	749	775
Fluorescamine	390	460
Eosin-Isothiocyanate	524	548
Acridine Orange	490	530, 640
4, 6-Diamidino-2-Phenylindole HCl (DAPI)	372	456
Ethidium Bromide	545	605
Hoechst 33258	365	465
Propidium Iodide	530	615
Ethidium Bromide	545	605
Evans Blue	550	610

TAB. 1.1: Exemples de fluorophores

in vivo, les fluorophores émettant dans le rouge ou le proche infrarouge sont préférentiellement utilisés. Leur utilisation est extrêmement variée. On peut citer comme exemple, leur utilisation pour le suivi de la biodistribution et le ciblage d'anticorps (ex : arthrite utilisant le fluorophore NIR2 [11] ou cyanine [12–14]), la biodistribution de peptides (comme le peptide RGD avec une sonde Cy5.5 [15]), d'aptamères, de molécules (ex : analogue de somatostatine avec sonde cyanine [16], récepteur au folate [17]) ou de protéine.

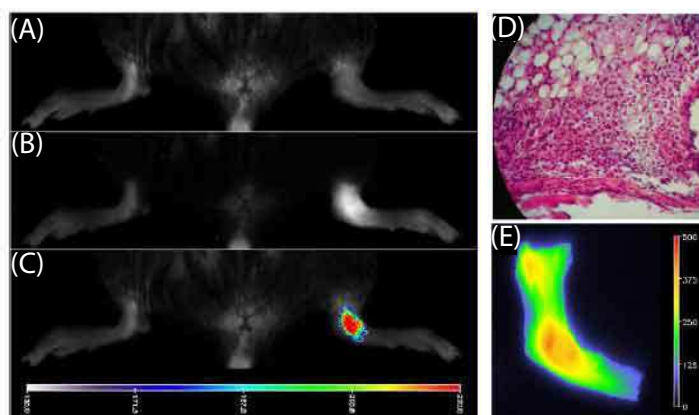


FIG. 1.13: Ciblage de zone arthritique par anticorps [17]

"Quantum dots" Les "quantum dots" (QDs) sont des nanoparticules inorganiques, composés d'un coeur semiconducteur inorganique (CdS, CdSe, ZnO, InP, InAs, ...), responsable de l'émission lumineuse, auquel est associée en général une coquille inorganique (par exemple du ZnS) afin d'augmenter le rendement quantique et d'accroître la

stabilité de leurs propriétés optiques. La taille du cristal inorganique varie généralement entre 2 et 8 nm.

Lors de l'excitation d'un quantum dot, une paire électron-trou (appelée exciton) est créée dans le matériau. Le rayon de Bohr associé à la fonction d'onde de cet exciton étant plus grand que les dimensions du cristal inorganique, il y a un effet de confinement dans le QD. Lors de la recombinaison de l'exciton, un photon est émis dont la longueur d'onde dépend de la largeur de la bande interdite. Dans le cas d'un confinement fort, la largeur de la bande interdite dépend de la taille des particules (en fait du nombre d'orbitales atomiques présentes). Plus le confinement est important (ie pour des petits QDs), plus la longueur d'onde est déplacée vers le bleu. A l'inverse, plus le confinement est faible (taille du QD grande), plus l'émission se fait dans des longueurs d'onde élevées. Pour une composition chimique donnée, la couleur d'émission est donc liée à la taille du QD.

La recombinaison électron-trou n'est pas aussi rapide que le phénomène de fluorescence classique. La durée de décroissance du signal lumineux est en effet de 20 à 30 ns pour un QD contre quelques ns pour la fluorescence d'une molécule organique.

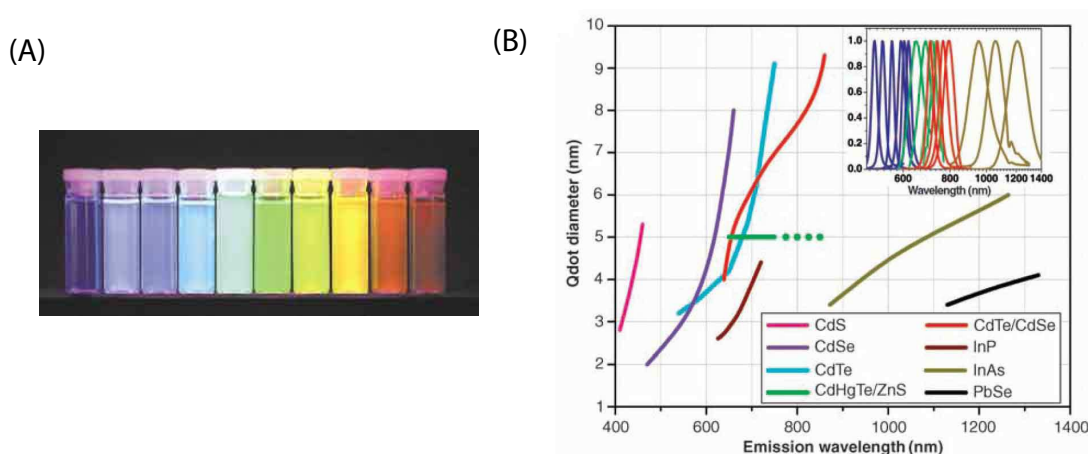


FIG. 1.14: Propriétés spectroscopiques des Quantum Dots (A) Dix couleurs distinguables de QDs, composés de CdSe recouvert de ZnS, excités à l'aide d'une lampe UV. De droite à gauche, le maximum d'émission se trouve à 443, 473, 481, 500, 518, 543, 565, 587, 610, et 655 nm (d'après [18]) (B) Longueur d'onde d'émission maximum de QDs selon leur composition et leur taille (d'après [19])

L'utilisation des QDs en biologie est relativement récente. Tout d'abord objets d'études physiques, leurs propriétés optiques ont été appliquées à des études *in vitro* et *in vivo*. Les problèmes liés à la fonctionnalisation de la surface des QDs ont retardé longtemps leur utilisation en biologie [20]. En effet, lors de la synthèse, un surfactant (TOPO) est utilisé pour limiter et contrôler la croissance des particules, rendant les QDs hydrophobes. Aujourd'hui, il existe un grand nombre de façons de modifier la surface de QDs, avec toutefois comme conséquence l'augmentation de la taille des particules. Les QDs commerciaux ont en effet une taille d'environ 20 nm.

Par rapport à des fluorophores classiquement utilisés, les QDs possèdent une stabilité au photoblanchiment (voir chapitre suivant) largement supérieure. En revanche, à l'échelle du QD unique, on observe des clignotements (blinking) de la fluorescence.

Ce phénomène qui dépend de la nature de la particule, de son environnement et de la puissance d'excitation n'est pas encore complètement compris.

Les applications des QDs sont extrêmement vastes : ils peuvent être utilisés comme alternatives aux fluorophores organiques. De nombreuses expériences tant *in vitro* (marquage cellulaire, tracking cellulaire, ciblage par anticorps ou peptide) qu'*in vivo* (drainage lymphatique, ciblage tumorale) ont été rapportées dans la littérature (voir l'exemple de la Figure 1.15).

Il est également à noter que récemment So et al. [21] ont synthétisé un complexe BRET Renilla reniformis luciferase - quantum dots, permettant de transformer les longueurs d'ondes peu favorables de la luciferase en infrarouge. L'activation des QDs n'est alors plus une excitation externe mais un transfert d'énergie. Ce système d'imagerie est à mettre en parallèle de la méthode développée dans ce travail.

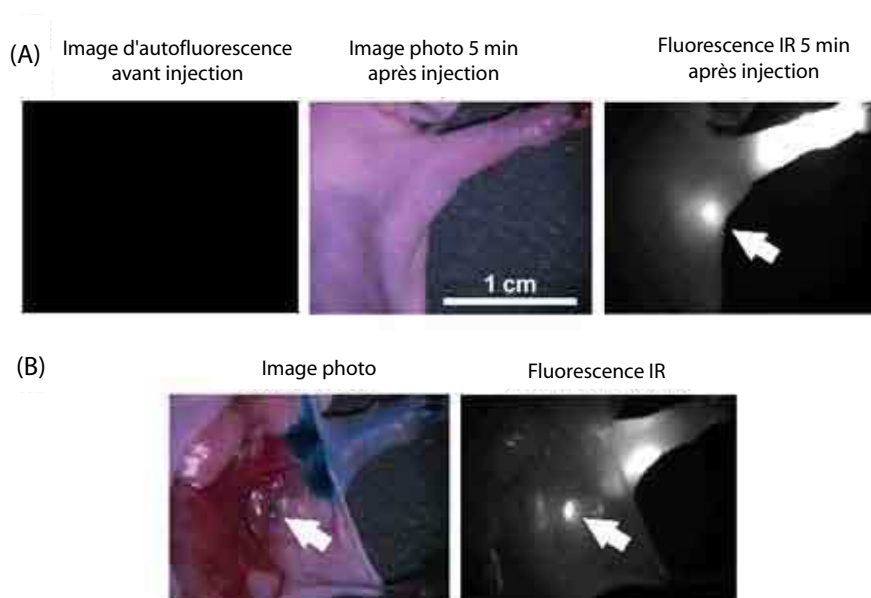


FIG. 1.15: Utilisation de Quantum Dots pour l'observation du mécanisme de drainage lymphatique chez la souris (A) Avant injection, l'auto fluorescence est très faible due à la longueur d'onde d'excitation des QDs faite entre 725 et 775nm. Seulement 5 min après injection des nanoparticules, le noeud lymphatique est clairement visible. (B) La dissection de la souris permet de confirmer la colocalisation du bleu d'isosulfan (qui est le standard pour les études de drainage lymphatique) et des QDs. Une expérience similaire chez le cochon est rapportée dans le même article [22].

Nanotubes de carbone Les nanotubes de carbone sont une forme de structure cristalline du carbone proche des fullerènes. Les fullerènes (C60) ont été découverts en 1985 par Harold Kroto, Robert Curl et Richard Smalley [23], ce qui leur valut d'obtenir collectivement le prix Nobel de chimie en 1996.

En 1990, W. Krätschmer et al. [24] découvrent un procédé permettant de synthétiser des quantités importantes de fullerènes, permettant à la recherche de travailler sur des échantillons plus significatifs. Un an après, les nanotubes eux-mêmes sont découverts par S. Iijima [25], dans un sous-produit de fullerènes.

Les propriétés spectroscopiques des nanotubes de carbone n'ont été étudiées que plus récemment [26,27]. Chaque forme cristalline de nanotubes (selon leur enroulement) possède un spectre d'émission particulier. Un mélange de nanotubes possède ainsi un spectre d'excitation dans le proche infrarouge avec une émission se situant entre 800 et 1600 nm. L'observation de nanotubes individualisés est en effet difficile s'il n'y a pas de fonctionnalisation adéquate (les nanotubes, composés exclusivement de carbone, sont fortement hydrophobes). Les nanotubes possèdent des propriétés de fluorescence dans l'infrarouge (entre 800 et 1600 nm). Ces propriétés optiques permettent d'obtenir un signal ayant un rapport signal sur bruit important. La détection de nanotubes uniques est alors possible. Le rendement quantique est pour l'instant relativement faible puisqu'il n'est que de 0,1%. Ceci est compensé par une stabilité optique très importante permettant une observation sur de longues périodes de temps. Après fonctionnalisation, les nanotubes ont été utilisés en biologie pour leur propriétés optiques pour des essais *in vitro* (capture par des macrophages) [28] et *in vivo* (biodistribution dans un lapin) [29].

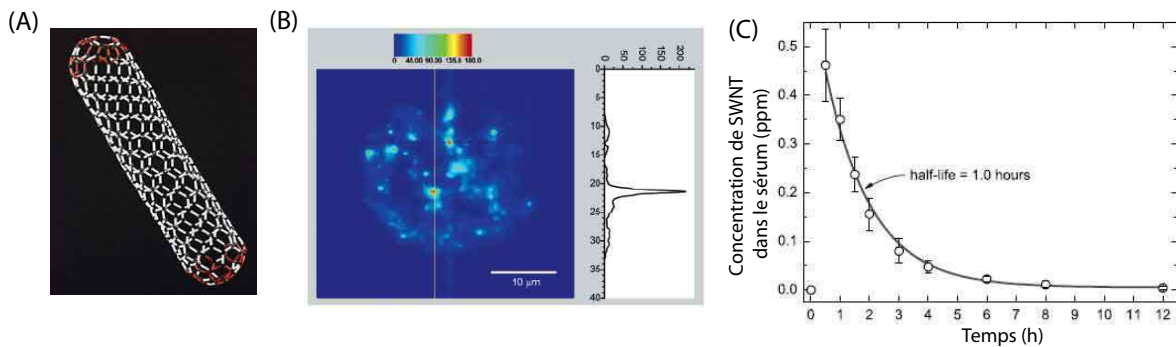


FIG. 1.16: Applications des propriétés optiques des nanotubes de carbone en biologie (A) Schéma d'un nanotube de carbone. (B) Image d'un macrophage ayant capté des nanotubes de carbones. (C) Évolution en fonction du temps de la concentration en nanotubes recouverts de pluronic dans le plasma après injection intraveineuse chez le lapin. (figures d'après [28, 29])

Gène rapporteur luminescent

Le principe de la technique du gène rapporteur luminescent est de faire produire par l'organisme d'étude soit directement une protéine luminescente pour marquer une cellule, soit une protéine chimérique comportant le gène d'intérêt et un gène dit rapporteur luminescent permettant sa visualisation. Aujourd'hui, les gènes de la GFP (Green Fluorescent Protein) et de la luciférase sont les plus utilisés pour des études à fois *in vitro* et *in vivo*.

Cette technique permet de visualiser et de quantifier des évènements cellulaires avec une résolution spatiale et temporelle excellente. Les protéines fluorescentes ou bioluminescentes sont devenues un outil indispensable pour explorer les processus cellulaires dans des expériences *in vitro* ou impliquant des animaux. Il est en effet possible de sonder une grande variété de signaux grâce à la diversité des protéines existantes permettant l'étude de la localisation protéique, de la physiologie cellulaire ou des interactions protéiques.

Protéines fluorescentes La GFP est la plus connue des protéines fluorescentes. Elle a été découverte par Shimura et al. dans les années 60 [30] comme protéine couplée à l'aequorin, une protéine chimiluminescente présente dans la méduse *Aequorea victoria*. Le spectre d'émission de la GFP possède un maximum à 508 nm avec deux bandes d'excitation à 395 et 470 nm. La méduse *Aequorea* peut émettre naturellement une lumière verte associée à la GFP sans excitation externe. Le fait que cette méduse possède une protéine bioluminescente (aequorine) possédant un maximum d'émission à 470 nm, la lumière verte émise a été rapidement associée à un transfert d'énergie entre deux protéines (aequorine-GFP).

Le clonage du gène de la GFP par Prasher *et al.* [31], puis la démonstration qu'il est possible d'exprimer cette protéine dans d'autres organismes [32, 33] ont permis l'utilisation des propriétés de fluorescence de la GFP dans de nombreux domaines y compris *in vivo* [34] (voir Figure 1.17).

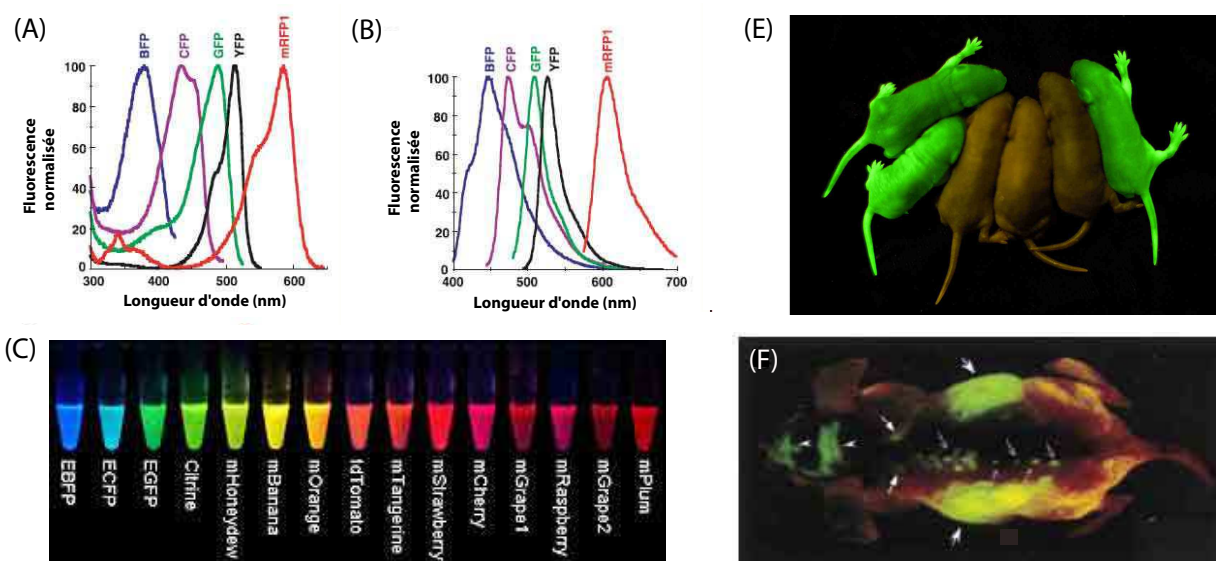


FIG. 1.17: Propriétés spectroscopiques et utilisation de protéines fluorescentes. (A) Spectre d'excitation et (B) spectre d'émission de différents mutants de la GFP (C) Couleur de fluorescence de différents mutants GFP (photo : Tsien) (E) Souris transgéniques exprimant constitutivement la GFP (site www.upenn.edu) (F-H) Utilisation de tumeurs GFP *in vivo* pour le suivi de métastases [35].

Des variantes de la GFP ont été développées, notamment par Heim *et al.* [36–38], pour modifier les longueurs d'onde d'émission. La recherche de mutants ou d'homologues a également permis la découverte de protéines émettant dans le rouge profond, longueur d'onde plus propice à la détection *in vivo*. Par exemple, la DsRed (Discomania coral Red) découverte par Matz *et al.* [39, 40] est issue de récifs coralliens (*Anthozoa*). On notera également plus récemment le développement par Patterson *et al.* [41, 42] d'une GFP photoactivable à 413 nm par conversion de la forme phénolique en forme phénolate.

Protéines bioluminescentes L'imagerie optique par bioluminescence (BLI) représente une alternative intéressante à l'imagerie par fluorescence pour le suivi de l'expres-

sion ou de la régulation d'un gène. L'avantage de la bioluminescence vient du fait que, ne nécessitant pas d'excitation lumineuse externe, elle permet d'obtenir des signaux non bruités par l'autofluorescence. Le gain en rapport signal sur bruit est donc important.

Il existe de nombreux systèmes bioluminescents, chacun se caractérisant par un couple enzyme-substrat particulier (avec généralement comme cosubstrat l'ATP ou l'oxygène). La luciférase de luciole (FLuc pour Firefly luciferase - substrat : Luciférine) est certainement la plus utilisée avec la luciférase de pensée de mer (RLuc pour Renilla luciferase - substrat : Coelentérazine). A cela s'ajoutent l'aéuorine de méduse³, du taupin (petit coléoptère) ou de bactéries (*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*).

Cette diversité de couples enzymes-substrat permet de marquer différemment deux types cellulaires à l'aide de gène rapporteur bioluminescent. En effet, si un type cellulaire est marqué avec de la luciférase Firefly et un autre avec de la luciférase Renilla, l'injection de luciférine n'engendrera une bioluminescence qu'au niveau des cellules exprimant la luciférase Firefly, tandis que les autres cellules ne seront visibles que par injection de coelenterazine. Un exemple de cette stratégie des rapporteurs doubles a été donné par S. Bhaumik et S.S. Gambhir [43] (voir Figure 1.18).

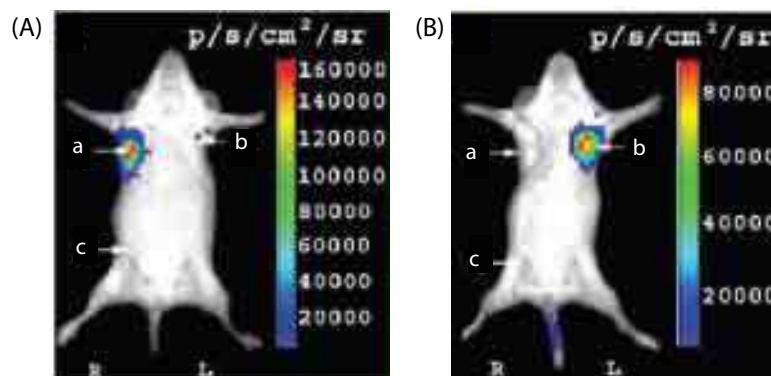


FIG. 1.18: Principe de la stratégie de rapporteur double. Sur la même souris, des cellules C6 transfectées avec le gène de la Luciférase Firefly et Luciférase Renilla ont été implantées en sous cutanée respectivement en a) et en b) tandis que les cellules C6 contrôle ont été implantées en c). Après injection de D-luciférine (A) seule la zone exprimant la F-Luc est allumée tandis que l'injection de coelenterazine (B) marquera spécifiquement la localisation des cellules exprimant R-Luc. Les cellules non transfectées ne produiront dans tous les cas aucun signal. [43]

L'imagerie de bioluminescence a de nombreuses applications utilisant le système luciférine/luciférase. Il est par exemple possible de marquer des cellules cancéreuses. Ces cellules tumorales sont alors implantées chez un animal et exprimeront la luciférase. Lors de l'injection de luciférine, la tumeur produira alors une quantité de lumière proportionnelle au nombre de cellules présentes. Ce marquage tumoral permet ainsi de visualiser et de quantifier l'évolution d'une tumeur. L'efficacité d'un traitement peut être alors évaluée de façon longitudinale.

³Issu de la méduse *Aequorea*, elle permet de faire un BRET vers la GFP

Fluorescence retardée et phosphorescence

Chélates de lanthanides et oxydes dopés terres rares Le mécanisme de fluorescence retardée explique la luminescence particulière des chélates de lanthanides, notamment europium(III), terbium(III) et dysprosium(III). L'excitation directe de ces ions trivalents est difficile car les transitions f-f ont des coefficients d'absorption molaire faibles. La luminescence des ions lanthanides, qui est très faiblement dépendante de l'environnement, est caractérisée par des bandes fines de faible intensité.

Pour augmenter la luminescence de ces ions, il est possible d'utiliser des chélates qui ont pour rôle de collecter et de transférer l'énergie de la source lumineuse à l'ion lanthanide. De façon plus précise, un des électrons du ligand est excité à un niveau singulet, puis relaxé à un niveau triplet. L'énergie de cet électron est ensuite transférée sur un des niveaux accepteurs de l'ion lanthanide (par un mécanisme de transfert de type Förster). Dès lors, la désexcitation de l'ion lanthanide donne lieu à l'émission d'un photon, émission favorisée par le mélange des orbitales de l'ion lanthanide et du ligand. Il en résulte, lorsque le transfert est efficace, une forte luminescence du complexe.

Le temps de transfert d'énergie et des considérations quantiques sur les terres rares font que la durée d'émission des ces complexes peut atteindre plusieurs ms. La détection décalée dans le temps permet d'éliminer l'autofluorescence d'un échantillon et ainsi faciliter la mesure. Plusieurs systèmes commerciaux d'analyse d'interactions moléculaires (reconnaissance anti-gène/anti-corps, hybridation de l'ADN...) utilisant ces marqueurs sont commercialisés.

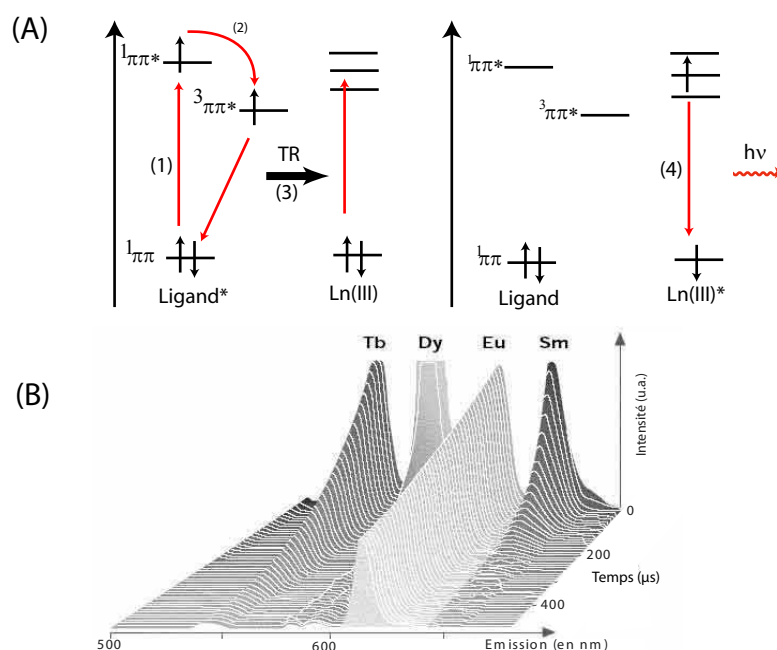


FIG. 1.19: (A) Mécanisme de luminescence des lanthanides (B) Spectres de luminescence et durées de vie des chélates de lanthanides(d'après Perkin Elmer)

Il existe également des matériaux utilisant les propriétés optiques des ions de terres rares. Pour leur conférer des propriétés optiques, ces matériaux sont dopés avec des cations lanthanides. Les propriétés optiques sont alors identiques à celles décrites précédemment pour les complexes de lanthanides avec une durée de luminescence de l'ordre

de la ms.

Molécules phosphorescentes Les caractéristiques de phosphorescence de certaines métalloporphyrines sont connues depuis les années 1970 [44]. De nombreuses protéines sont également phosphorescentes à cause de la présence de groupe indole des tryptophanes [45]. Il n'existe actuellement que peu d'applications à la phosphorescence en raison de la difficulté de mise en oeuvre. Toutefois, ce mécanisme a été utilisé avec des sondes tissulaires sensibles à l'oxygène.

La phosphorescence issue du triplet créé lors de l'excitation d'une porphyrine est annihilée de façon efficace par l'oxygène. L'oxygène, dont l'état fondamental est triplet, peut en effet être excité par transfert d'énergie de la porphyrine et passer ainsi en état singulet. La phosphorescence de la porphyrine est donc transformée en phosphorescence de l'oxygène qui a lieu dans l'infrarouge et sera donc généralement non détectable. La détermination du temps de vie de phosphorescence de la porphyrine fournit une méthode efficace pour doser l'oxygène dans un tissu [46]. C'est notamment ce qu'ont réalisé Vinogradov et al. grâce à la synthèse de métallo-porphyrines ayant un spectre d'émission et d'absorption situé à des longueurs d'ondes plus élevées (voir figure 1.20). Ils ont ainsi pu mettre en évidence le phénomène d'anoxie au niveau d'une tumeur [47].

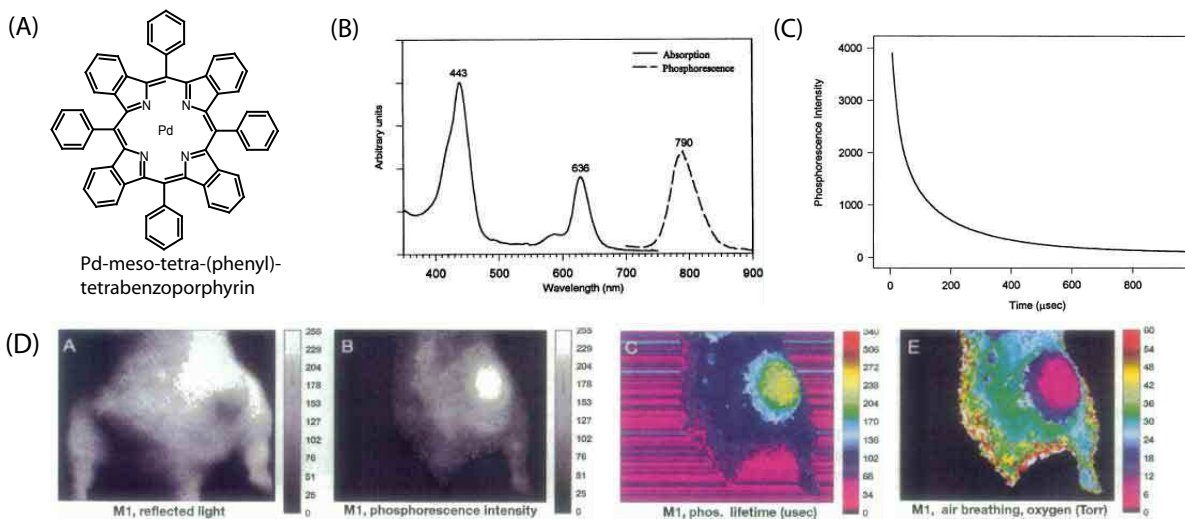


FIG. 1.20: Utilisation de la phosphorescence de métallo-porphyrines *in vivo*. (A-B) Une porphyrine peut chélater un ion en son centre. L'association avec du palladium a permis d'obtenir un spectre d'émission dans l'infrarouge, favorisant la détection à travers les tissus. (C) Le temps de vie de la luminescence est relativement long, même à température ambiante. (D) Images obtenues par injection intraveineuse de métallo-porphyrines. La zone tumorale montre clairement un temps de vie en phosphorescence plus long, marquant l'anoxie du tissu.(tiré [47])

Une autre application intéressante provient du travail de Lo et al. qui ont mesuré la concentration en oxygène dans le foie d'un rat lors d'une ischémie-reperfusion [48]. Ce travail est à rapprocher de celui présenté dans ce manuscrit.

1.2.3 Instrumentation et acquisition des données en imagerie optique

Fonctionnement de l'oeil

Toute perception visuelle passe par l'oeil. Le processus de photoréception commence lorsqu'un quantum de lumière est absorbé par un photopigment. Chez l'homme deux entités contiennent des photopigments : les bâtonnets et les cônes.

La rhodopsine fut le premier photopigment à être découvert (voir Figure 1.21). Ce pigment se trouve dans les saccules des bâtonnets. Cette molécule est l'association d'une protéine, l'opsine, et d'un chromophore, le rétinol. La molécule de rétinol est liée de façon covalente à une lysine de la protéine. Il résulte de cet assemblage une absorption dans le visible pour la partie rétinol et dans l'ultraviolet pour l'opsine. Les bâtonnets et les cônes diffèrent par leur partie protéique. On classe ainsi les cônes en trois catégories selon leur opsine. Ceci permet une absorption dans des longueurs d'onde différentes. Chez l'homme, les maxima d'absorption sont situés respectivement à 415-420 nm, 530-535 nm et 560-565 nm pour les cônes, c'est-à-dire dans le bleu violet, le vert et le jaune vert, et 495-500 nm pour les bâtonnets [49-51]. L'homme possède donc l'équivalent d'un système de vision trichromatique fort comparable à celui d'une caméra.

Le photon provoque une isomérisation du rétinol 11-cis en rétinol tout trans. Cette réaction est très exergonique. Après cette transformation, une suite de réactions mène à la dislocation du complexe opsine - rétinol. Ce dernier se reforme ensuite par une suite de réactions représentant un cycle long. Mais il serait faux de croire qu'il s'agit d'une simple transformation de l'énergie lumineuse en énergie électrique. En fait, le changement de conformation libère une énergie déjà contenue dans l'environnement de la rétine.

L'oeil possède grâce à cette conversion une sensibilité à la lumière qui est très bonne mais extrêmement variable selon la longueur d'onde. Le candela est l'unité de référence pour les intensités lumineuses. Un candela correspond à l'intensité lumineuse, dans une direction donnée, d'une source qui émet un rayonnement monochromatique de fréquence 540×10^{12} Hz (longueur d'onde de 555 nm) et dont l'intensité énergétique dans cette direction est 1/683 watt par stéradian. Une bougie standard émet approximativement 1 cd (d'où cette unité), une ampoule à incandescence classique émet environ 120 cd. La limite de détection d'un oeil standard est de 0,32 mcd/m², ce qui correspond à $4,69 \cdot 10^{-7}$ W/sr/m² soit une source émettant $1,3 \cdot 10^8$ photons/s/sr/cm². Cette dernière unité (ph/s/sr/cm²) a été choisie dans les articles d'imagerie optique en biologie. La sensibilité de l'oeil de 0,32 mcd/m² est calculée à 555nm. Quand on s'en écarte, dans le rouge ou dans le bleu, la sensibilité peut chuter d'un facteur 1000.

Les intensités que l'on retrouve en imagerie optique varient énormément entre bioluminescence et fluorescence. En bioluminescence, les flux lumineux sont de l'ordre de 10^3 à 10^6 photons/s/sr/cm². En fluorescence, cet ordre de grandeur peut être multiplié par 1000. On obtient ainsi des niveaux détectables à l'oeil.

Toutefois, même à des niveaux détectables par l'oeil, une caméra CCD classique (type appareil photo) peut produire une image de mauvaise qualité. C'est pourquoi l'utilisation de caméra haute sensibilité est nécessaire.

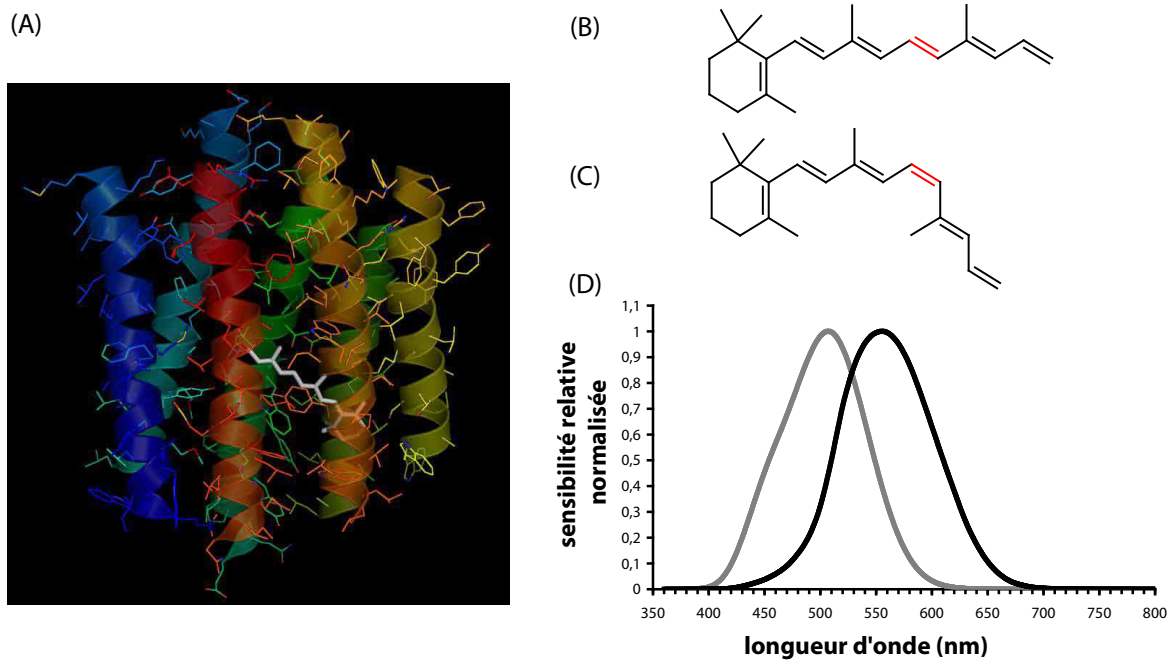


FIG. 1.21: (A) Structure tridimensionnelle de la Rhodopsine. Le rétinal est représenté en blanc. (B) Structure chimique du tout-trans rétinal (C) Structure chimique du 11-cis rétinal (D) Courbe photopique (vision de jour, en noir) scopique (vision de nuit, en gris) pour un oeil humain moyen

Fonctionnement des caméras utilisées

Le fonctionnement d'une caméra est relativement simple : le principe est de convertir la position et l'intensité d'un flux de lumière en signaux électriques qui seront ensuite traités informatiquement pour reconstruire une image. Cela nécessite la présence d'un convertisseur photoélectrique.

On peut classer les différents types de caméras CCD (Charge Coupled Device) en deux grandes sous-familles selon leur fonctionnement :

- par intégration de charges
- par multiplication d'électrons.

La méthode d'intégration de charges consiste à augmenter la sensibilité du capteur par une augmentation du temps d'exposition. Les caméras CCD refroidies utilisent ce principe d'intégration. Pour la méthode de multiplication d'électrons, la sensibilité accrue provient de la démultiplication du nombre d'électrons créés pour chaque photon reçu. On trouve dans cette catégorie les CCD intensifiées (ICCD), les EB-CCD (electron bombardement) ou les EM-CCD (electron multiplication). Les caméras à multiplication d'électrons présentent l'avantage de pouvoir effectuer une capture d'images à une cadence de 25 à 30 images/s.

Caméra CCD refroidie Une caméra CCD refroidie diffère d'une caméra CCD classique dans la manière dont sont traitées trois composantes du bruit : bruit de lecture, bruit thermique et bruit sur le signal reçu de type Poisson. Le bruit de lecture peut être éliminé par une lecture du CCD ralentie et par une amélioration des composants électroniques. Le bruit thermique correspond au courant d'obs-

curité dû aux charges générées spontanément dans le semiconducteur constituant le détecteur, en l'absence de source lumineuse. Ce bruit est essentiellement dépendant de la température. Pour limiter sa part relative dans le signal recueilli, il est souvent nécessaire de refroidir le capteur jusqu'à des températures pouvant atteindre -100°C . Le bruit relié au signal correspond à l'incertitude sur la mesure. Si on mesure un signal d'intensité N , l'incertitude de la mesure varie en \sqrt{N} . Ainsi, plus les signaux seront faibles, plus le bruit est important. Pour limiter cet effet, il est nécessaire d'avoir un capteur ayant une efficacité quantique élevée. De plus une amélioration a été apportée par la génération des capteurs CCD à exposition arrière et à substrat aminci (back-thinned illuminated CCD) par rapport aux CCD classiques (front-illuminated CCD).

Camera CCD intensifiée Le processus d'amplification dans un ICCD est plus complexe. Le signal lumineux est transformé en électrons au niveau de la cathode. Ces électrons sont ensuite multipliés dans une galette de microcanaux. En passant à travers une série de dynodes, chaque électron engendre un nuage d'électrons qui est ensuite projeté sur un écran fluorescent créant une lumière accrue. Une lentille ou une série de fibres optiques renvoie ensuite la lumière sur un CCD classique. Nous avons utilisé durant ce travail de thèse une caméra de ce type (Photon Imager de Biospace).

Camera EB-CCD Le principe de fonctionnement des EB-CCD est relativement simple. Une fois la photoconversion effectuée, l'électron est accéléré par l'application d'une forte différence de potentiel entre la photocathode et un CCD à exposition arrière. L'énergie de la collision engendre ainsi la création de plusieurs électrons. Cette technique pâtit toutefois d'un risque de dégradation rapide du détecteur à cause de l'énergie qu'il doit pouvoir supporter.

Camera EM-CCD Cette technologie utilise la multiplication des électrons au niveau de la puce CCD elle-même. Ainsi à la lecture, un électron à l'entrée est converti en quelques milliers de photons à la sortie. Cette multiplication est en revanche extrêmement sensible à la température, ce qui nécessite l'utilisation de système de refroidissement stable.

Acquisition des données *in vivo*

Expériences en fluorescence Les expériences de fluorescence nécessitent une illumination de l'animal afin d'exciter les fluorophores (endogènes ou exogènes) de façon continue. Il existe deux grandes techniques d'acquisition de données *in vivo* (voir Figure 1.23) :

Acquisition par réflexion : Les systèmes les plus simples d'acquisition utilisent le principe de la réflexion du signal. Pour cela, une rampe ou un anneau d'illumination est utilisé pour illuminer l'animal de façon homogène. la lumière pénètre à l'intérieur de l'animal et excite les sondes optiques présentes. Il est toutefois nécessaire d'utiliser des filtres afin d'éliminer les photons réfléchis directement par l'animal. L'addition de filtres permet également de réaliser une analyse spectrale afin d'éliminer l'auto fluorescence (voir chapitre suivant).

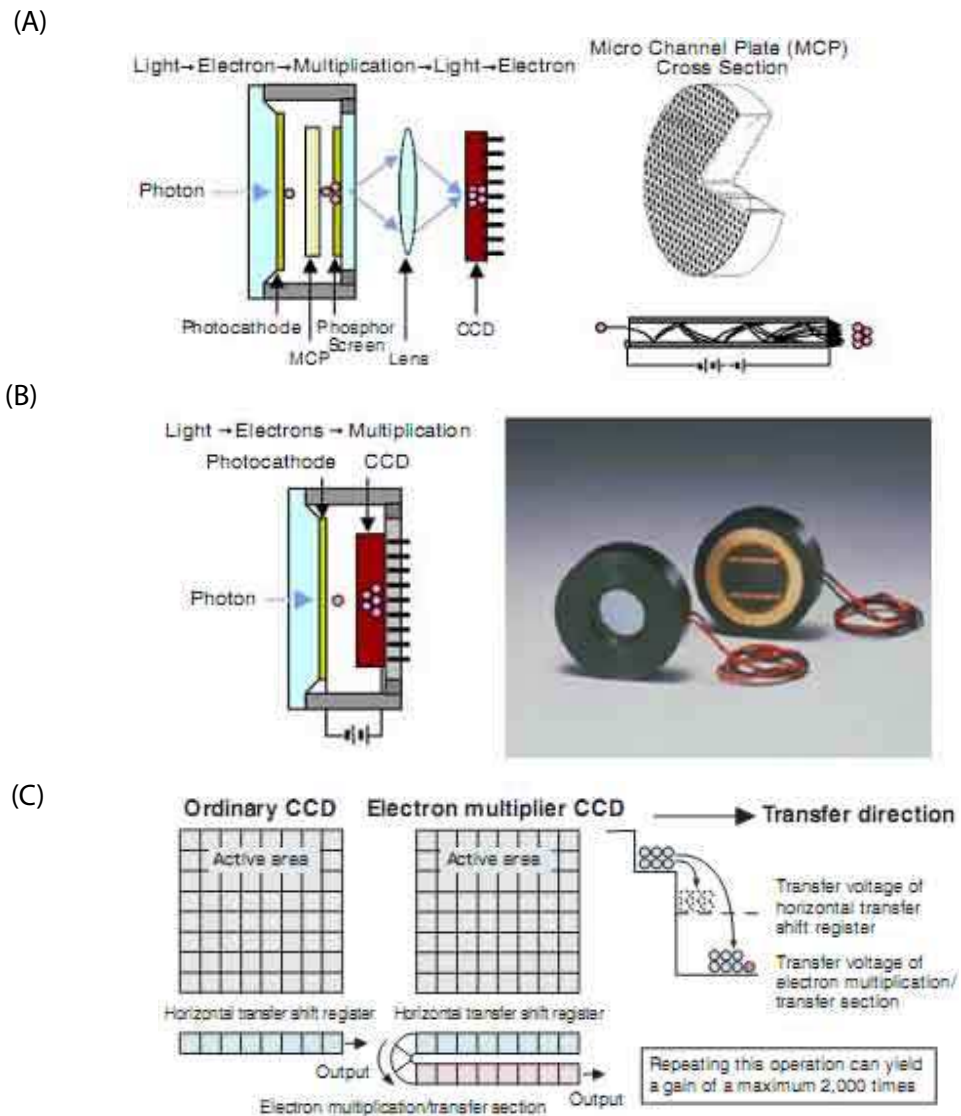


FIG. 1.22: Principes physiques des différents capteurs utilisés en imagerie optique (A) CCD intensifié (B) EB-CCD (C) EM-CCD. La caméra utilisée dans ce travail est basée sur une ICCD (images tirées d'une documentation technique de Hamamatsu [52]).

Acquisition par transillumination : La deuxième technique d'acquisition consiste à illuminer l'animal par le dessous à l'aide d'un laser. En balayant de façon précise la surface d'intérêt et en utilisant des algorithmes de reconstruction, il est possible d'utiliser cette technique pour effectuer une tomographie 3D d'une souris.

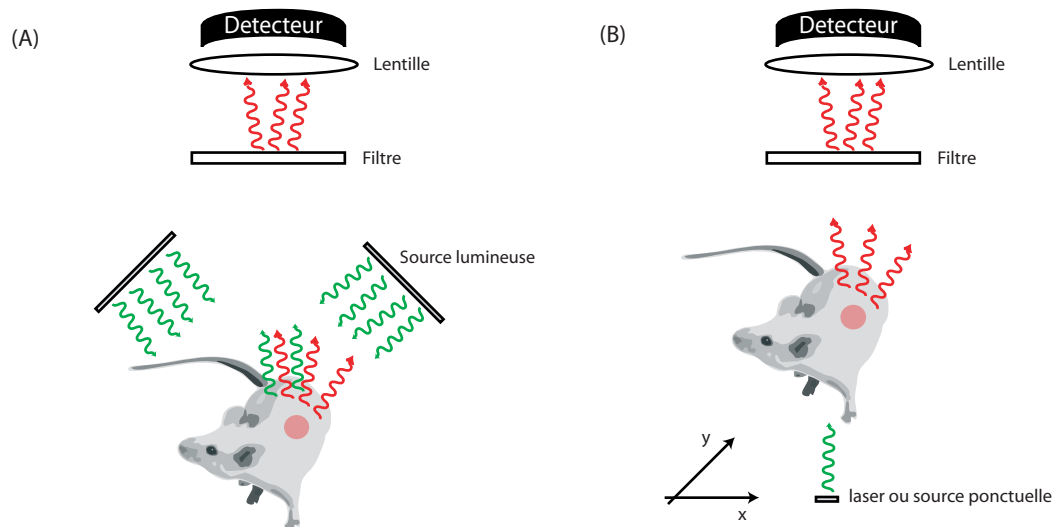


FIG. 1.23: Expériences de détection de fluorophores dans une souris par acquisition en fluorescence (A) acquisition par réflexion (B) acquisition par transillumination.

Expériences en bioluminescence La bioluminescence se différencie de la fluorescence par sa simplicité de mise en oeuvre (seul le détecteur est nécessaire) avec toutefois des niveaux de luminescence plus faibles. Généralement, l'acquisition se fait sans filtre à l'émission. On peut toutefois utiliser des filtres lorsque l'on désire réaliser des expériences en multiplexage (utilisation de sondes émettant à plusieurs longueurs d'onde différentes)

1.3 Contraintes en imagerie optique

En imagerie optique, on rencontre des difficultés de différents types. Ces contraintes sont à la fois liées aux sondes optiques utilisées mais aussi aux environnements extrêmement complexes que sont les milieux biologiques. Nous rechercherons toutefois à montrer que chacune de ces contraintes a été mise à profit pour le développement de nouvelles techniques d'analyse ou d'imagerie.

1.3.1 Contraintes liées aux sondes optiques

Photoblanchiment

La limitation la plus importante en imagerie de fluorescence *in vitro* est due au phénomène de photoblanchiment de l'échantillon. En effet, le chromophore n'est pas indéfiniment stable mais il est détruit après un certain nombre de cycles d'absorption et d'émission. Comme ordre de grandeur, la fluorescéine est dégradée après 10^4 à 10^5 cycles excitation-émission. Les raisons du photoblanchiment sont variées et mal comprises. Elles dépendent de plus du fluorophore. Toutefois, les causes principales sont l'absorption multiphotoniques, des croisements intersystèmes, des réactions à partir d'un état triplet et d'un état excité lors de l'absorption lumineuse (notamment avec l'oxygène).

Le développement relativement récent de nouvelles classes de fluorophores chimiques telles que les "Alexa Fluor" ou les cyanines permet de prolonger le temps d'observation. Le temps de vie de l'AlexaFluor 488 est par exemple dix fois plus élevé que celui de la fluorescéine. En microscopie optique, il existe également des kits "antifading" efficaces.

Les fluorophores organiques peuvent également être remplacés par d'autres composés présentant un très faible photoblanchiment. On peut citer comme exemple les Quantum Dots, les nanotubes de carbone ou encore les oxydes de terres rares. L'utilisation préférentielle des QDs en microscopie s'explique par le fait qu'elle ne nécessite pas de développement matériel particulier, les longueurs d'onde d'excitation classiquement utilisées permettant l'excitation des QDs. L'utilisation des nanotubes reste limitée pour des raisons de détection à l'émission (les capteurs ne sont généralement pas sensibles à l'infrarouge) et de faible rendement quantique. Enfin, les oxydes de terres rares pâtissent d'une excitation se faisant dans l'UV.

Le photoblanchiment comme outil en biologie Même si le phénomène de photoblanchiment est problématique pour l'observation prolongée d'un marquage cellulaire au microscope, il a été mis à profit pour l'étude de l'organisation spatio-temporelle de protéines et de molécules d'intérêt dans les membranes ou dans le cytoplasme.

La technique FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a été développée dès 1973 par Poo et Cone [53]. En 1976, Axelrod développa la première analyse mathématique du phénomène permettant de réaliser des mesures quantitatives en FRAP [54]. Après une période d'oubli cette technique fut repopularisée lors d'expériences faites par Cole et al. sur la mobilité de la membrane de l'appareil de Golgi en utilisant une protéine chimérique GFP, puis par Lippincott-Schwartz également avec la GFP. Les applications aujourd'hui sont nombreuses dans le domaine de mobilité de protéines

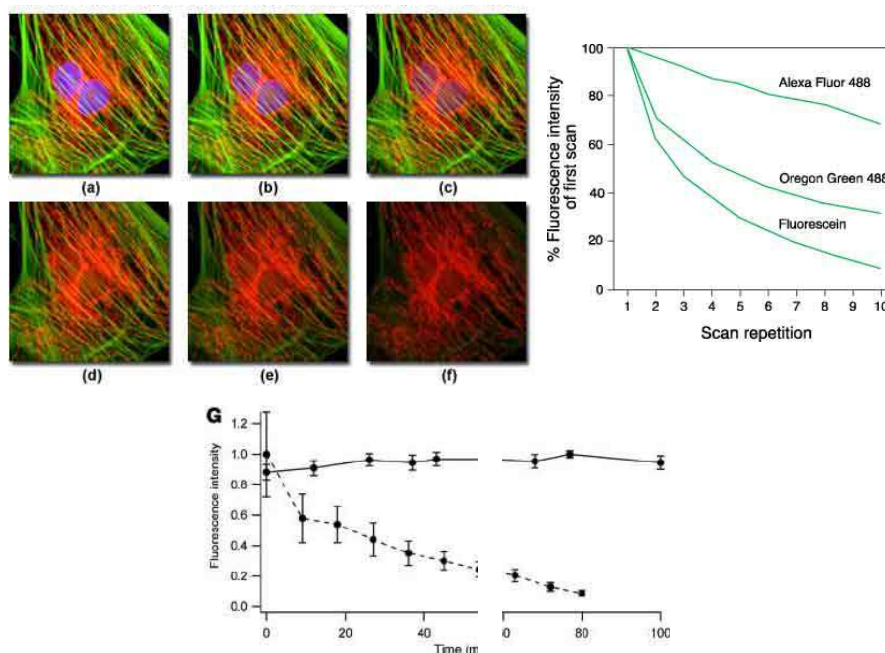


FIG. 1.24: Photoblanchiment (A) sur coupe (olympus) (B) quantification (invitrogen) (C) stabilité des QDs

dans le cytoplasme [55] grâce au développement d'outils mathématiques d'analyse plus performants [56, 57].

La technique FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) est une technique proche du FRAP qui consiste à irradier en permanence une région de la cellule en analysant la fluorescence d'une autre région. Si les molécules fluorescentes s'échangent entre la région non irradiée et celle qui est irradiée, la fluorescence diminue dans la zone non excitée (voir 1.25).

Sensibilité des fluorophores à leur environnement

Les molécules fluorescentes sont sensibles à leur environnement. Les facteurs influençant les propriétés optiques de sondes fluorescentes sont nombreux. On citera le pH, la polarité du solvant, la molarité de la solution, le potentiel électrique, les liaisons hydrogène. . .

Ces modifications de l'environnement chimique peuvent considérablement modifier les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores. Ainsi l'intensité de fluorescence mesurée pour des longueurs d'onde d'émission et d'excitation fixées pourra être altérée. Il est possible pour un dosage en fluorescence de contrôler ces paramètres pour une analyse sur plaque. Ce n'est pas le cas dans une cellule où les différents organites ou structures de la cellule possèdent leur propre composition chimique. Cette sensibilité à l'environnement est donc problématique en microscopie optique car le signal provenant d'une zone donnée est affecté par des paramètres inconnus, rendant ainsi la quantification de la concentration locale d'un fluorophore difficile.

Nous allons citer deux exemples où la sensibilité des fluorophores a pu être mise à profit en biologie : les sondes dont le spectre d'émission change selon leur environnement

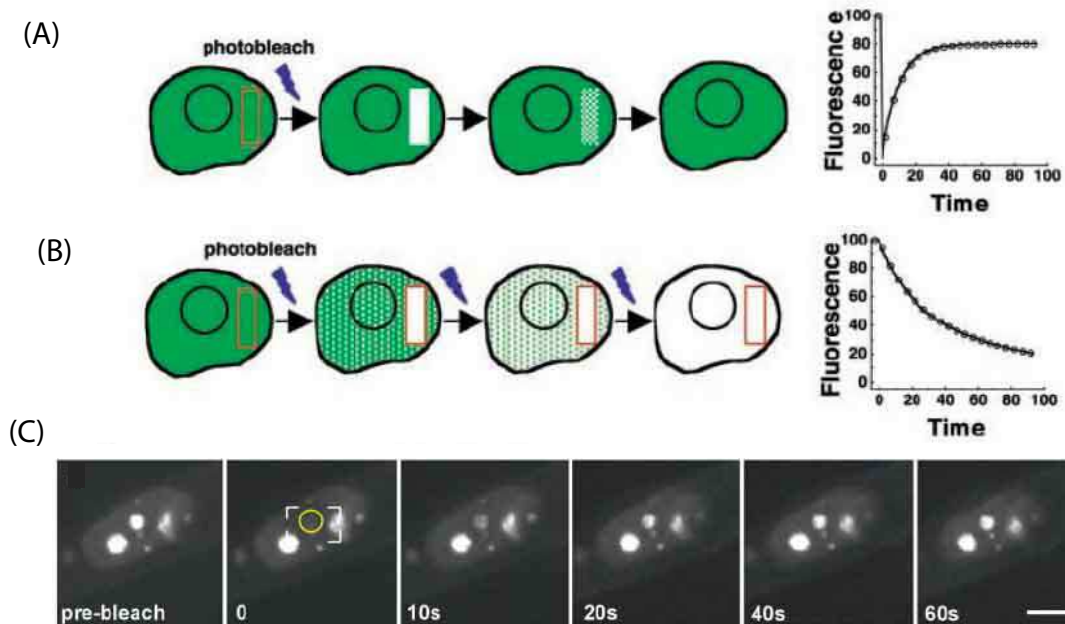


FIG. 1.25: (A) FRAP et FLIP (d'après [58]) (C) exemple d'après C'est ce qui est observé (Robert D. Phair Tom Misteli, (2000) *Nature*, 404, 604-609) dans le noyau de cellules NHK transfectées par des protéines marquées à la GFP. [55]

et la technique d'imagerie par mesure du temps de vie (FLIM).

Sondes réagissant à l'environnement Les facteurs qui altèrent ou modifient la fluorescence des composants ont été mis à profit pour sonder l'environnement local des fluorophores. Par exemple, la 3-hydroxy flavone s'insère dans la membrane cellulaire. Son spectre d'excitation et d'émission sont altérés par le potentiel électrique de la membrane, permettant un suivi de la dépolarisation de la cellule pendant des événements particuliers [59,60]. De même, la concentration en calcium influence la fluorescence du Fluo-3 et du Fura-red, permettant ainsi le dosage local de cet ion.

La technique FLIM Une technique émergente, le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), a été développée pour sonder indirectement l'environnement d'un fluorophore. Il existe deux méthodes pour faire de l'imagerie par temps de vie de fluorescence : la première, plus largement utilisée, correspond à une analyse temporelle du signal, l'autre fait intervenir une analyse fréquentielle.

Pour l'analyse temporelle (Time-domain FLIM), l'image est obtenue par l'utilisation d'un obturateur au niveau du détecteur (de nature physique ou électronique). La durée de vie du fluorescence est alors obtenue sur chaque pixel de l'image en faisant varier le délai entre la fin de l'excitation (effectuée à l'aide d'un laser picosecondes) et l'acquisition. Grâce à des obturateurs performants, il est ainsi possible d'acquérir des temps de vie de l'ordre de la nanoseconde.

Dans l'analyse fréquentielle (Frequency-domain FLIM), la durée de vie de fluorescence est calculée en mesurant le déphasage et la diminution de l'intensité de la

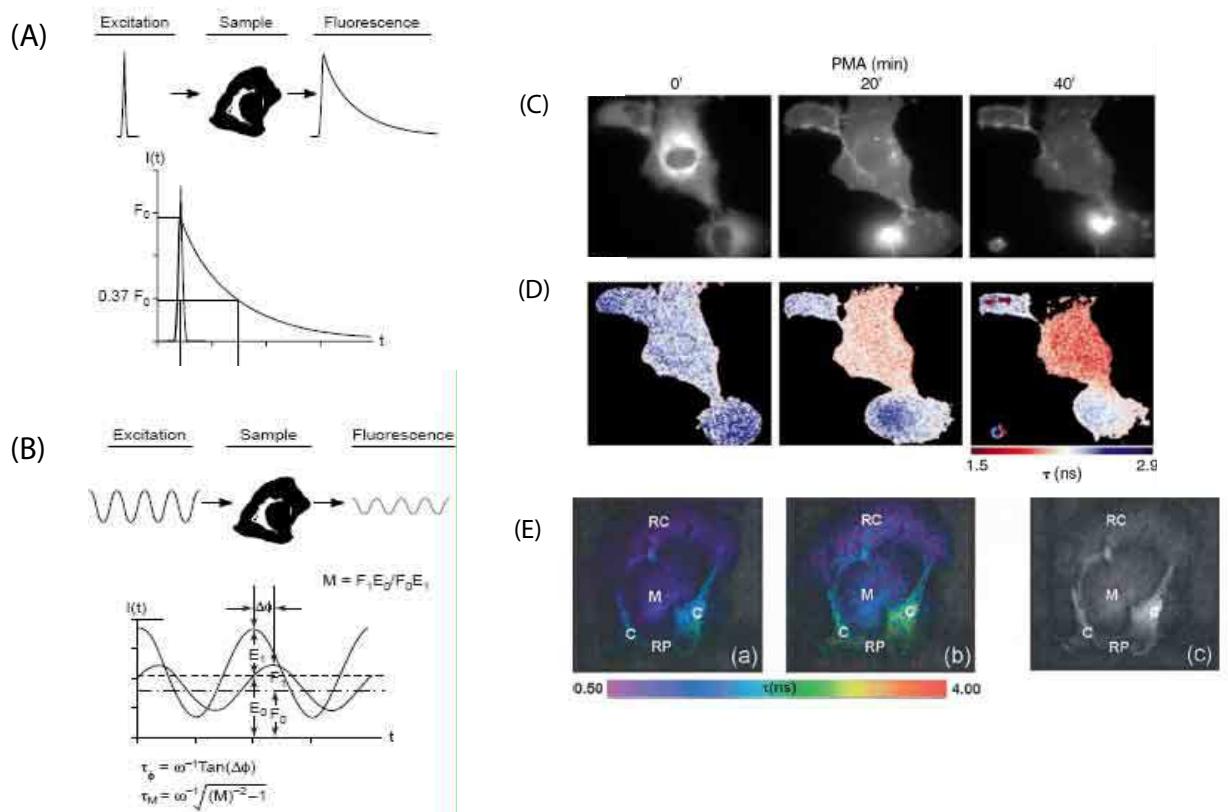


FIG. 1.26: La technique FLIM (Fluorescence Lifetime IMaging) (A) Acquisition des données par analyse temporelle (B) Acquisition des données par analyse fréquentielle (C-E) Exemples d'images obtenues par FLIM. Les déclinés de luminescence sont calculés pour chaque pixel (d'après [61]).

fluorescence en utilisant un détecteur avec un modulateur de gain. L'étude de ces variations nécessite l'utilisation comme source lumineuse d'excitation d'un laser modulé en fréquence (1 à 200 MHz). La mesure peut être réalisée soit par le balayage d'un laser (via un photomultiplicateur) ou à l'aide d'un CCD.

Ces différences de déclin peuvent également être observée en utilisant un fluorophore unique. En effet, l'environnement du fluorophore (l'hydrophobie du milieu, la concentration en oxygène, la liaison à une autre molécule ou encore la présence d'accepteur FRET) influence la durée de déclin de fluorescence. Comme le temps de vie de la molécule est indépendant de sa concentration locale (tant que les concentrations sont suffisamment faibles pour éviter les problèmes de quenching), il est possible de sonder de façon précise l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore, d'en suivre les modifications et de comparer les résultats avec des coupes histologiques.

Cette technique est également applicable en utilisant plusieurs fluorophores. En effet, chaque molécule fluorescente possède son propre déclin de fluorescence à partir de son état excité. En mesurant les différences de temps de vie, il est possible de différencier chaque fluorophore, même s'il ont des couleurs d'émission proche. Il est également possible d'identifier l'autofluorescence des tissus.

Cette technique a été transposée récemment pour des études *in vivo* par Requejo-Isidro et al. par l'élaboration d'un endoscope [62], l'acquisition des images se faisant à 29 images/s. L'utilisation d'un tel dispositif sert par exemple à suivre les modifications moléculaires intervenant dans les tissus tumoraux.

Quenching

Le quenching correspond à une désexcitation non radiative induisant une diminution du signal de fluorescence. Deux grand types de quenching existent : le quenching dynamique et le quenching statique.

Le *quenching dynamique* a lieu lorsque le fluorophore entre en contact avec un atome ou une molécule ce qui facilite une transition non radiative vers l'état fondamental. La présence d'oxygène, d'ions comme l'ion iodure ou encore l'acrylamide peuvent jouer ce rôle. Le FRET est un cas particulier de quenching dynamique.

Le *quenching statique* est dû quant à lui à la formation d'un complexe entre le fluorophore et une autre molécule. Ce complexe peut être à l'origine de l'absence de fluorescence par inhibition de l'état excité. Un cas particulier de quenching statique est le self-quenching. Le fluorophore et le quencher sont alors la même molécule. Ce phénomène peut être mis en évidence dans des solutions concentrées en fluorophores.

Il est assez rare de rencontrer le phénomène de quenching lié à une trop forte concentration en fluorophores. Le phénomène de FRET non désiré (avec une protéine quelconque) qui perturbera l'analyse du signal est quant à lui relativement courant. Le contrôle du quenching est donc difficile. En revanche, quand celui-ci est maîtrisé, il donne naissance à une catégorie de sondes optiques prometteuses : les sondes activables.

Sondes activables Le phénomène de quenching a été utilisé pour le développement de sondes activables dite intelligentes. Le principe est ingénieux. Il s'agit d'associer volontairement un fluorophore à un quencher. Dans sa configuration normale, la sonde n'émet pas de lumière car le quencher se trouve à proximité du fluorophore. Par action

d'une enzyme clivant ce complexe ou modification de l'environnement de la sonde, le quencher est éloigné, libérant ainsi la fluorescence. Ce système permet ainsi l'obtention d'un signal lumineux à des endroits précis (par exemple au niveau d'une tumeur) permettant sa localisation avec un important rapport sur bruit (voir Figure 1.27).

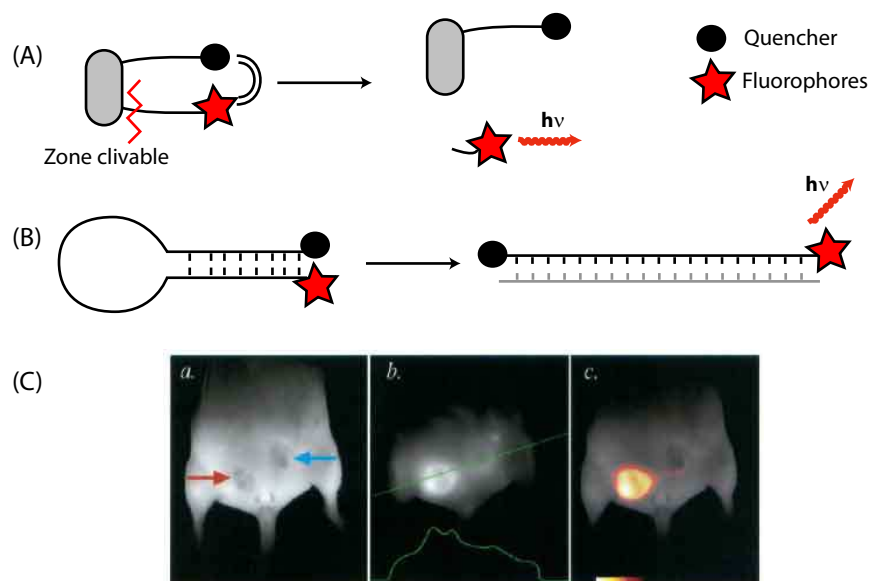


FIG. 1.27: Schéma décrivant le principe des sondes activables. Un quencher est associé à un fluorophore. Un événement extérieur (clivage par une enzyme, éloignement du quencher par association avec une molécule . . .) permet de libérer la fluorescence (C) Exemple de l'utilisation de sondes activables *in vivo*. Deux tumeurs différentes sont implantés chez une souris, l'une exprimant une protéase particulière (Cathepsin D) l'autre pas. Le fluorophore greffé à un polymère par une séquence clivable par l'enzyme est ainsi relargué principalement dans la tumeur exprimant la protéase (d'après [63, 64]).

"Blinking"

Lors de l'apparition des quantum dots en biologie, un problème de scintillement ("blinking") a pu être observé. Il s'agit d'une intermittence du signal avec des périodes d'émission (état "on") et des périodes où malgré l'excitation aucun signal de fluorescence n'est observable (état "off"). A la différence du photoblanchiment, ce phénomène est réversible (voir Figure 1.28).

L'origine de ce phénomène n'est pas aujourd'hui complètement comprise mais d'importants progrès notamment sur la synthèse des QDs permettent de limiter cet effet. Ce phénomène qui peut être problématique pour le suivi du déplacement des QDs au niveau cellulaire [66] est souvent considéré comme propre aux QDs. Cependant le blinking existe également avec d'autres sondes fluorescentes. Non observable quand l'analyse se fait sur un ensemble de molécules, le blinking a été observé par exemple par Dickinson et al. [67] sur la GFP. Par analyse du signal par FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), il a été montré que la protéine scintillait alternant état "on" et état "off" avec des constantes de temps extrêmement variables (de qqs μs à plusieurs minutes).

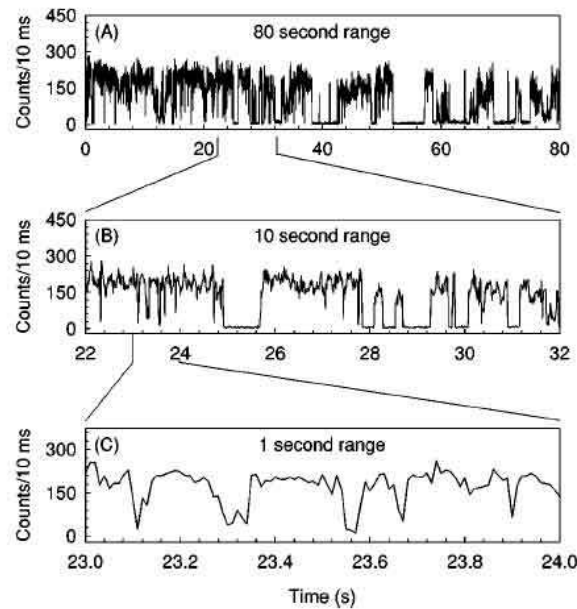


FIG. 1.28: Variation de l'intensité observée sur un quantum dot au cours du temps. On observe ainsi une alternance entre états "on" et états "off" (d'après [65]).

Ce scintillement a été attribué à la présence de plusieurs états non fluorescents dans la protéine.

Cette différence d'appréciation entre phénomène de blinking pour les QDs et les fluorophores plus "classiques" vient du fait que l'observation d'une entité unique pour le fluorophore nécessite un appareillage spécifique, alors que, à cause de sa taille, un quantum dot est facilement visualisable de façon unique à l'aide d'un microscope.

1.3.2 Contraintes liées aux milieux biologiques

Trois grandes contraintes vont limiter l'utilisation de l'imagerie optique *in vivo* : d'une part, l'autofluorescence des tissus qui correspond à un phénomène d'absorption/-réémission des tissus, d'autre part, l'absorption de la lumière par l'ensemble des constituants des tissus et enfin, la diffusion de la lumière par les structures des tissus qui empêche une localisation précise du signal.

Autofluorescence

Implications de l'autofluorescence en imagerie *in vivo* L'autofluorescence résulte de la présence d'un grand nombre de fluorophores endogènes. L'excitation du composé fluorescent d'intérêt provoque également l'excitation de ces composants. Il peut être alors difficile de discriminer le signal du fluorophore du bruit de fond.

Toutefois, comme pour tout fluorophore, l'excitation de ces composés endogènes n'est pas équivalente sur l'ensemble du spectre. Ainsi, les longueurs d'onde longues (rouge et proche infrarouge) produiront moins d'autofluorescence que des longueurs d'onde courtes (bleu, vert et a fortiori UV) [68].

L'origine de cette fluorescence est explicitée pour un certain nombre de composés endogènes dans le Appendix B.

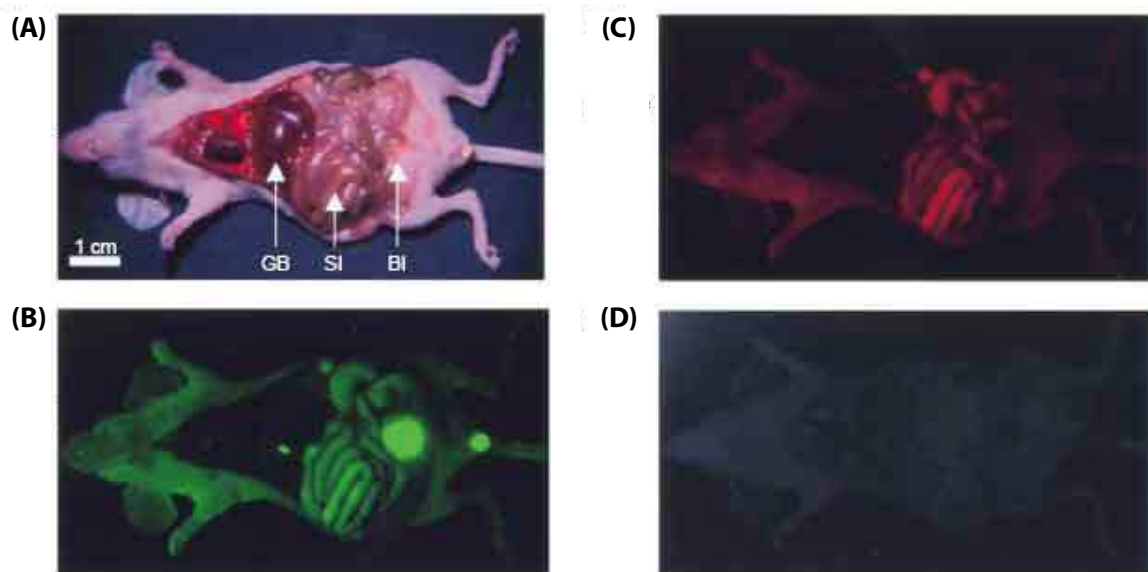


FIG. 1.29: Autofluorescence d'une souris (A) lumière blanche (B) filtre bleu/vert(460-500 nm/505-560 nm); (C) vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm); and (D) Infrarouge (725-775 nm/790-830 nm) [68]

La présentation faite par Frangioni [68] peut laisser à penser que l'autofluorescence n'est plus un problème lorsque l'acquisition se fait dans le rouge ou le proche infrarouge. Toutefois, certains constituants, notamment la chlorophylle, peuvent être excités par des longueurs d'onde rouges. La nourriture classiquement donnée aux souris est donc fortement fluorescente. Après ingestion, ces composés se retrouvent au niveau de l'intestin mais aussi dans l'ensemble de l'organisme [69]. Ainsi, pour réellement limiter le phénomène d'autofluorescence, il est nécessaire d'aller dans le rouge lointain et de changer le régime alimentaire des souris (régime pauvre en chlorophylle comme par exemple une nourriture Alfalfa-free).

Traitement de l'autofluorescence par analyse spectrale Il n'est pas toujours possible de changer de sondes optiques pour se placer dans le domaine spectral où l'autofluorescence est plus faible. Une solution consiste alors à traiter le signal par analyse spectrale afin de soustraire "mathématiquement" le bruit de fond lié à l'autofluorescence. Plusieurs solutions sont commercialement disponibles dont le système Maestro de la société CRI, le système IVIS Spectrum de la société Xenogen ou encore le système NightOWL de la société Berthold.

Le principe de cette manipulation du signal est relativement simple mais peut être complexe à mettre en oeuvre. L'idée est de considérer le signal comme une somme de signaux, l'autofluorescence étant un signal comme un autre. Par analyse du spectre d'émission du signal, il est alors possible de soustraire la composante du signal liée à l'autofluorescence. Toutefois, le spectre d'autofluorescence n'étant pas forcément identique sur l'ensemble de l'animal, cette technique peut engendrer des artefacts.

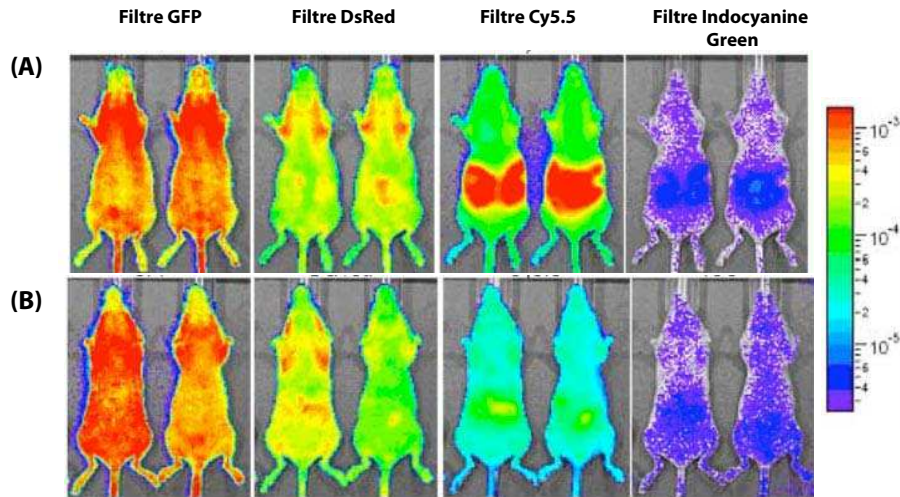


FIG. 1.30: Autofluorescence de souris selon différentes longueurs d'onde suivant le régime alimentaire de la souris. Les souris ont été nourries pendant une semaine avec (A) une alimentation normale (B) une alimentation Alfalfa-free (d'après une note technique de la société Xenogen)

Utilisation de l'autofluorescence pour le diagnostique La possibilité de voir des zones atypiques d'un organisme à l'aide de leur fluorescence intrinsèque a été étudiée dès la fin des années 70 [70]. L'analyse de l'autofluorescence des tissus a notamment été utilisée pour la visualisation de modifications de la cornée de l'oeil qui peuvent survenir avec certaines maladies comme le diabète. Les modifications du collagène par des AGEs engendrent l'augmentation de l'autofluorescence des tissus [71]. D'autres auteurs ont également mis en évidence des différences de fluorescence intrinsèques entre zones tumorales et zones saines.

Absorption et diffusion dans les tissus

Nous avons vu que l'environnement biologique pouvait altérer la luminescence des sondes optiques et engendrer des signaux parasites. Une fois le signal produit, deux phénomènes physiques vont poser problème pour sa détection : l'absorption et la diffusion de la lumière par les milieux biologiques. Ces deux contraintes vont limiter la propagation des ondes électromagnétiques dans le milieu d'étude et empêcher une localisation précise du signal.

Absorption Si un rayonnement d'intensité $I(\lambda)$ arrive normalement à une couche de matière d'épaisseur L (figure 1.31), une partie de ce rayonnement sera absorbée au cours de son trajet. La diminution de luminance est proportionnelle à $I(\lambda)$: $dI_\lambda(x) = -\mu_a(\lambda)I_\lambda(x)dx$, où $\mu_a(\lambda)$ est le coefficient d'absorption du matériau. Pour un mélange uniforme, on obtient, par intégration, la loi de Beer-Lambert :

$$\frac{I_\lambda(L)}{I_\lambda(0)} = e^{-\int_0^L \mu_a(\lambda)dx} \Rightarrow \ln\left(\frac{I_\lambda(L)}{I_\lambda(0)}\right) = -\mu_a(\lambda) \cdot L$$

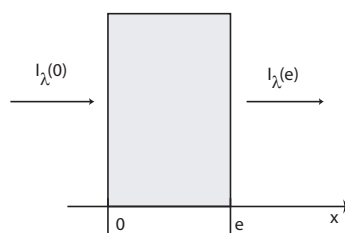


FIG. 1.31: Absorption de la lumière à travers un milieu homogène pour une incidence normale.

Lorsque le faisceau lumineux n'est pas orthogonal à la surface rencontrée (ce qui est généralement le cas dans les milieux biologiques), les phénomènes de réfraction et de réflexion sont à prendre en compte.

La lumière transmise à travers un milieu dépend de sa longueur d'onde. Ceci a été quantifié pour l'eau et de nombreux produits organiques et biologiques (voir Figure 1.32 pour l'hémoglobine et pour l'eau).

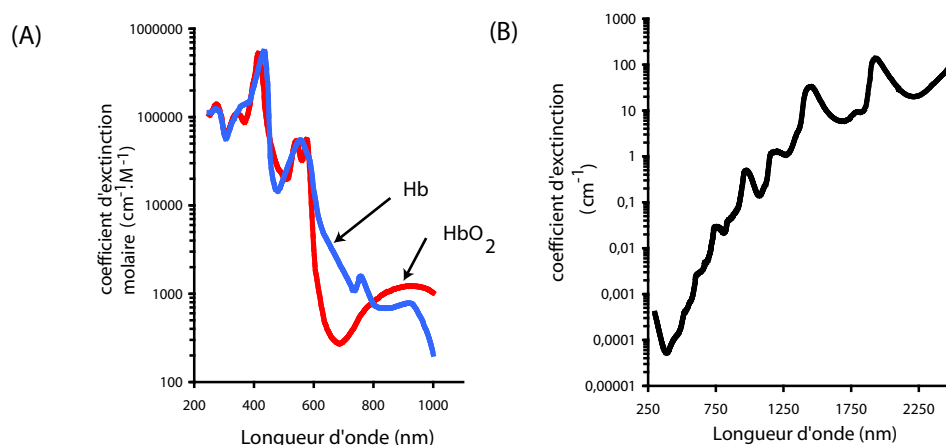


FIG. 1.32: (A) Coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine en fonction des longueurs d'onde (d'après une compilation de données réalisées par S. Prahl <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/index.html>) (B) Coefficient d'extinction de l'eau en fonction des longueurs d'onde (d'après [72])

Un Homme est constitué d'un ensemble de constituants chimiques dont 70% d'eau, 15% de lipides et 6 % de sang. Grâce à cette composition moyenne, il est possible de reconstruire le coefficient d'absorption moyen pour un tissu standard (voir Figure 1.33). Il s'agit toutefois d'une approximation et des grandes variations sont obtenues selon le tissu étudié.

Entre 400 nm et 600 nm, l'absorption de l'ensemble des constituants du milieu biologique est très importante. Au delà de 1300 nm, les ondes électromagnétiques sont absorbées sous forme d'énergie thermique par l'ensemble des molécules (surtout par les molécules d'eau).

Il apparaît ainsi clairement qu'il est préférable de travailler avec des longueurs d'onde comprises entre 600 nm et 1300 nm afin d'augmenter le nombre de photons

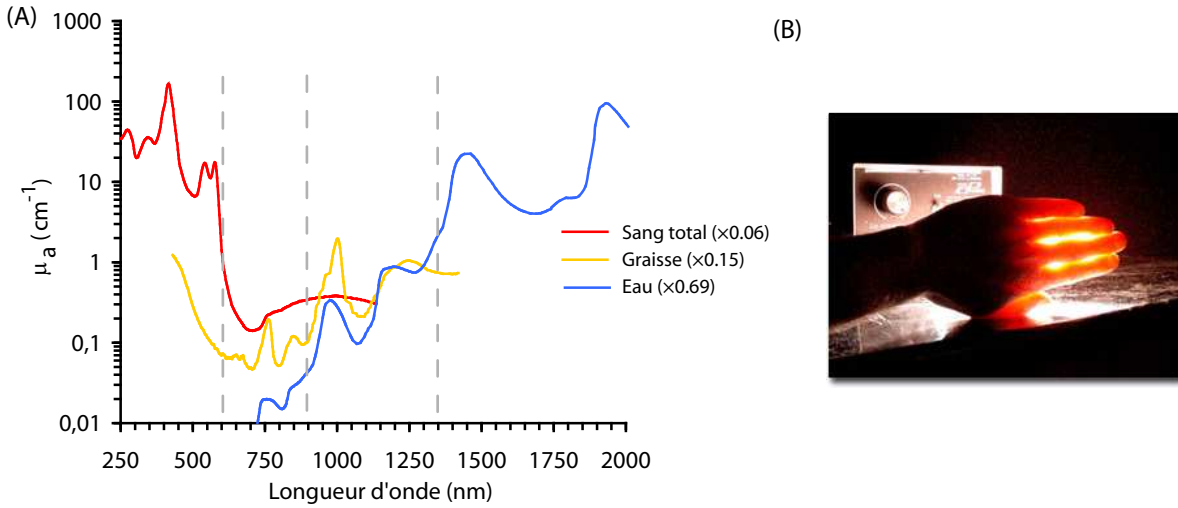


FIG. 1.33: Absorbance d'un tissu moyen contenant environ 70% d'eau, 15 % de graisse et 6 % de sang. Le reste étant constitué de protéines absorbant préférentiellement dans le bleu

susceptibles d'être détectés. Toutefois, il est souvent nécessaire de travailler sur des composés ayant des longueurs d'onde d'émission comprises entre 650 nm et 900 nm, afin de répondre aux limitations de l'appareil de détection. En effet, pour la plupart des caméras CCD, le rapport quantique - rapport entre le nombre total de photons reçus et les photons réellement détectés - décroît rapidement au delà de 900 nm.

Diffusion La diffusion de la lumière est un phénomène physique correspondant à des changements aléatoires de direction des rayons lumineux, dus aux inhomogénéités du milieu. La présence de particules en suspension ou d'interfaces perturbe l'homogénéité du milieu. La diffusion est le résultat de la réflexion, de la réfraction et de la diffraction par de telles particules.

En imagerie optique, si on travaille avec des longueurs d'onde où l'absorption est faible (rouge ou infrarouge), la diffusion de la lumière prend une part importante dans l'atténuation totale. Il est possible d'assimiler la diffusion de lumière à une absorption définie par une constante de diffusion noté μ_s . Ce coefficient traduit le fait que le photon rencontrera un événement de diffusion après avoir parcouru en moyenne une distance $l = \mu_s^{-1}$. Contrairement à la diffusion de Mie où le coefficient de diffusion varie en $1/\lambda^4$, le coefficient de diffusion pour un tissu complexe dépend moins de la longueur d'onde (variation en environ $1/\lambda$).

Pour les phénomènes de diffusion, un autre coefficient est important : il s'agit du coefficient d'anisotropie noté g . Lorsqu'un photon rencontre un élément diffusant, sa direction est modifiée. Classiquement utilisée en imagerie optique, la fonction de phase de Heneye-Greenstein [73] permet de relier g à l'angle entre le photon incident et le photon diffusé (voir Figure 1.34). Cette fonction s'écrit de la manière suivante :

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cdot \cos\theta)^{3/2}} \quad (1.2)$$

La valeur de g vaut 0 pour une diffusion isotrope et 1 lorsqu'il n'y a pas de diffusion. Plus la valeur de g est importante, moins les photons sont déviés à chaque événement de diffusion. Toutefois, même si ce coefficient est élevé, un photon perd l'information de sa direction d'origine sur une distance inversement proportionnelle au coefficient de diffusion réduit $\mu'_s = \mu_s \times (1 - g)$

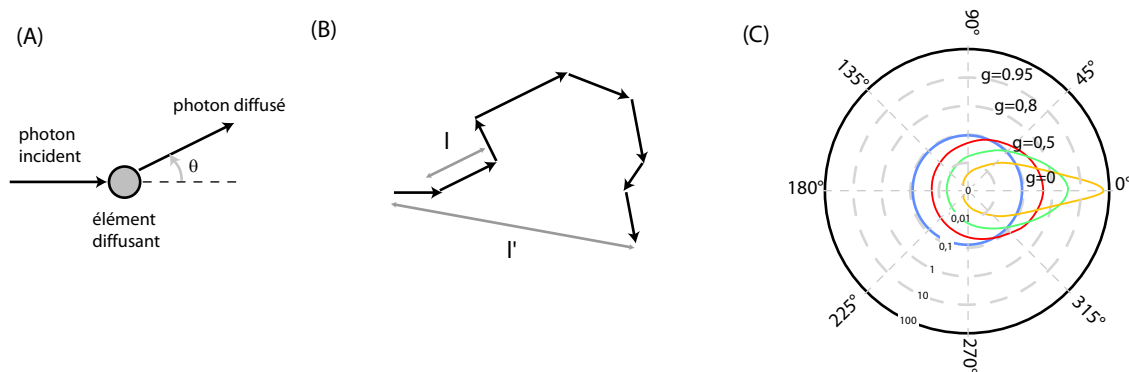


FIG. 1.34: (A) Changement de direction du photon après un événement de diffusion (B) Exemple de parcours d'un photon dans un milieu diffusant. l représente la distance moyenne parcourue entre deux événements de diffusion. La distance $l' = \mu'_s{}^{-1}$ correspond à la distance moyenne parcourue entre deux événements de diffusion considérés comme isotropes (C) Valeur de la fonction de phase de Henyey-Greenstein en fonction de l'angle θ

Pour un tissu standard et pour une émission dans le rouge, $\mu_s \approx 1 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s \approx 100 \text{ cm}^{-1}$ et $g \approx 0,95$ [74]. L'information de la direction de provenance des tissus est donc perdue en moins de 2 mm ! La diffusion est donc le paramètre le plus important expliquant la difficulté à déterminer avec précision la position d'une source lumineuse au sein d'un tissu biologique.

1.4 Récapitulatif sur les techniques d'imagerie

Techniques d'imagerie	Imagerie aux rayons X		Imagerie isotopique		IRM	Ultrason	Imagerie optique			
	Radio-graphie	Scanner CT	TEP	Scintigraphie/ SPECT			Fluorescence	Bio-luminescence	OCT	Transillumination
Energie/ fréquences/ longueur d'onde	10-70 keV	50-70 keV	0,5 à 2 MeV émetteur final: 511 keV	70-350 keV	20 MHz à 120 MHz (animal jusqu'à 400 MHz)	2 à 20 MHz (animal jusqu'à 100MHz)	400-1300 nm	400-800 nm	800-1300 nm	800-1300 nm
Origine du contraste	absorption différen- tielle des RX par les tissus		Concentration en isotopes injectés		densité et environ- nement des protons	Variations d'im- pédance acous- tique	Concentration en fluorophores (endogènes ou exogènes)	Concentration en sondes biolumines- centes	Variations des propriétés optiques des tissus	
Résolution spatiale	<100 µm	de 0,5x0,5x1 mm ³ à 100 ³ µm ³	2-5 mm	5-10 mm	50 µm à 1 mm selon le champ	0,1-1 mm	1-5 mm	20 µm - 5 mm	4 µm isotrope	qqz mm
Profondeur accessible	corps entier	corps entier	corps entier	corps entier	corps entier	>15 cm à 2MHz, 6 mm à 50MHz	0,2 - 1 cm	1-5 cm	<2 mm	5-6 cm
Applications à l'Homme	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non	oui	oui
Produits de contraste Nécessité?	Produits radio- opaques (com- posés iodés)		émetteur de positons	Isotopes émetteur	Complexes paramagnéti- ques ; ferro- fluides	Microbulles	fluorophores exo- gènes ou auto- fluorescence	Protéines biolumines- centes	en dévelop- pement	fluorophores exogènes
Quantité détectable	1-5 mmol/kg		0,01 à 0,1 pmol/L	0,1 à 1 pmol/L	0,01 à 1 mmol/kg	5 mg/kg	1 µmol/L à 1 fmol/L	~ 10 ³ cellules transfectés		
Sensibilité	Varie selon les tissus +++		++++	+++	Varie selon les tissus +++	Varie selon les tissus et la pro- fondeur ++	Varie fortement selon les tissus et la profondeur			
Inocuité	oui (sauf dose excessive)		oui		oui (sauf cas particulier)	oui	oui (si fluoro- phores endo- gènes) sinon faible	oui	oui	oui
type d'imagerie	anatomique	anatomique	fonctionnelle	fonctionnelle	anatomique/ fonctionnelle	anatomique/ fonctionnelle	fonctionnelle	fonctionnelle	anatomique	anatomique
Coût	++	+++	++++	+++	++++	++	+ à ++	++	++	++

TAB. 1-2: Récapitulatif des différentes propriétés de techniques d'imagerie (Nécessité : en noir l'agent de contraste est obligatoire, en gris, l'agent de contraste permet d'améliorer l'image mais n'est pas forcément nécessaire)

Chapitre 2

Luminescence persistante et nanoparticules

Sommaire

2.1	Matériaux à luminescence persistante	50
2.1.1	Matériaux à luminescence persistante et applications	50
2.1.2	Mécanismes de la luminescence persistante	54
2.2	Silicates et luminescence persistante	60
2.2.1	Exemple de silicate à luminescence persistante	60
2.2.2	Polymorphisme de l'enstatite (MgSiO_3)	61
2.3	Colloïdes et procédé sol-gel	64
2.3.1	Caractérisation de colloïdes	64
2.3.2	Procédé Sol-Gel	68

2.1 Matériaux à luminescence persistante

La luminescence persistante est la propriété que possèdent certains minéraux de continuer à émettre de la lumière pendant une longue période après la fin de l'excitation. Même si cette propriété est communément appelée phosphorescence, le mécanisme physique sous-jacent en est différent. Dans ce chapitre, après avoir présenté un bref historique des matériaux à luminescence persistante, nous citerons quelques exemples de leur utilisation industrielle. Nous détaillerons ensuite les mécanismes physiques proposés pour expliquer cette durée hors norme de luminescence.

2.1.1 Matériaux à luminescence persistante et applications

Historique

De la pierre de Bologne au phosphore La première matière luminescente artificielle connue est apparue en Italie au début du XVII^e siècle. Découverte par l'alchimiste amateur Casiorolo de Bologne en 1601, il s'agissait de sulfure de barium (baryte ou barytine) calciné. Ce matériau, qui avait la propriété de garder une luminescence dans le noir après exposition à la lumière du jour, fût largement diffusé dans la communauté scientifique de l'époque sous les dénominations de "pierre de Bologne" et d'"éponge à lumière". De nombreux scientifiques, dont Galilée¹(1564-1642), participèrent au débat sur l'origine de la luminescence.

Giulio Cesare La Galla (1576-1624) fût le premier à en donner une explication en 1612. Par comparaison avec l'absorption d'eau dans une éponge, il proposa que la luminescence provenait du piégeage d'une certaine quantité de feu et de lumière qui était doucement libérée. L'enthousiasme fût tel à l'époque que Fortunius Licetus (1577-1657) vit dans la lumière émise par la lune le signe que l'astre devait être composé de ce type de matériau. Cette explication déclencha une vive polémique entre scientifiques, Galilée rejetant notamment cette idée. Une autre explication fût donnée par Athanasius Kircher of Fulda (1601-1680). Il proposa que, sous l'effet de la chaleur, le matériau devenait poreux et ainsi pouvait attirer la lumière, comme un aimant le fer.

A la même époque, en 1669, le médecin et alchimiste Hennig Brand essaya de distiller l'"essence vitale" de l'urine. Ses distillations laissèrent un "Magmus Phosphorus" bien plus actif et lumineux que les matériaux luminescents de l'époque. Depuis, le terme *phosphorescence* est utilisé pour caractériser des matériaux émettant de la lumière dans le noir. Pourtant, la lumière émise par ce phosphore n'est pas due au même mécanisme puisqu'il s'agit en fait d'une chimiluminescence associée à la combustion du phosphore dans l'air.

De nombreux chercheurs se sont penchés sur le mécanisme de cette mystérieuse luminescence. On trouve parmi eux Goethe, collectionneur averti de pierres, qui réalisa

¹Galilée : "Nous devons expliquer comment la lumière est conçue dans cette pierre, et est rendue après quelque temps, comme dans un accouchement"

quelques expériences sur la pierre de Bologne ²

Début de l'utilisation industrielle Les applications de matières luminescentes sur le terrain industriel, et singulièrement en horlogerie, sont nettement plus récentes. Les premières montres et horloges à aiguilles et index luminescents sont apparues dans les deux hauts-lieux de l'industrie horlogère d'alors, la Suisse dès la fin du 19e siècle, et les États-Unis au début du 20e siècle.

Utilisation de sources radioactives A la fin du XIX^e siècle, la radioactivité était considérée comme un outil prometteur pour le traitement de nombreuses maladies. La toxicité du radium, mise en évidence très rapidement après sa découverte, fût négligée et les effets pseudo-bénéfiques de concoctions à base de sels radioactifs furent mis en avant.

Associés à un matériau approprié, les sels de radium permettaient d'obtenir des composés luminescents dans le noir, la radioactivité permettant une excitation permanente du matériau. Des applications industrielles et militaires en découlèrent rapidement, avec notamment la fabrication de montres possédant un cadran et des aiguilles luminescentes pour les officiers durant la 1^{ère} guerre mondiale.

Pour la production, les ouvrières peignant les cadrans de montres ne recevaient aucune consigne de sécurité et étaient même encouragées à mouiller la pointe de leur pinceau avec leur lèvres afin d'appliquer de façon plus précise la "colle", mélange de sulfure de zinc, de sels de radium et de vernis (voir Figure 2.1). A la fin des années 1920, certaines ouvrières sont décédées d'anémie, de dégénérescences osseuses ou de cancer de la mâchoire.

Connue sous le nom de scandale des "radium girls", la tempête médiatique qui découla de cette affaire a permis l'obtention d'une réglementation sur l'utilisation de radium dans la peinture luminescente. Le radium fût tout de même utilisé jusque dans les années 50. D'autres composés radioactifs, comme le prométhéum, le mésothorium et le tritium étaient également utilisés. La fin des années 1960 marqua l'arrêt définitif de l'utilisation du radium et du prométhéum. Avec une demi-vie de 12,3 années, le tritium est quant à lui toujours utilisé notamment sous forme gazeuse pour des cadrans de montre³. L'émission β du tritium est moins énergétique et peu pénétrante permettant son utilisation sans risques majeurs. Les rayonnements β sont directement capturés par un composé fluorescent ou phosphorescent, ce qui permet d'avoir une émission continue de photons même si la montre n'est pas réexcitée par voie lumineuse.

Matériaux non radioactifs Le développement de matériaux présentant des propriétés de luminescence persistante date également du début du XX^e siècle, avec notamment la synthèse de sulfure de zinc dopé Cu(I) [75]. Ce matériau qui avait une persistante de

²Goethe, *Les Souffrances du jeune Werther* "18 juillet. [...] On prétend que la pierre de Bologne, exposée au soleil, se pénètre de ses rayons, et éclaire quelque temps dans la nuit. Il en était ainsi pour moi de ce jeune homme. L'idée que les yeux de Charlotte s'étaient arrêtés sur ses traits, sur ses joues, sur les boutons et le collet de son habit, me rendait tout cela si cher, si sacré! Je n'aurais pas donné ce garçon pour mille écus! sa présence me faisait tant de bien! ... Dieu te préserve d'en rire, Wilhelm! Sont-ce là des fantômes? est-ce une illusion que d'être heureux?"

³montres de marques comme Smith & Wesson, Uzi, KHS, Traser,...

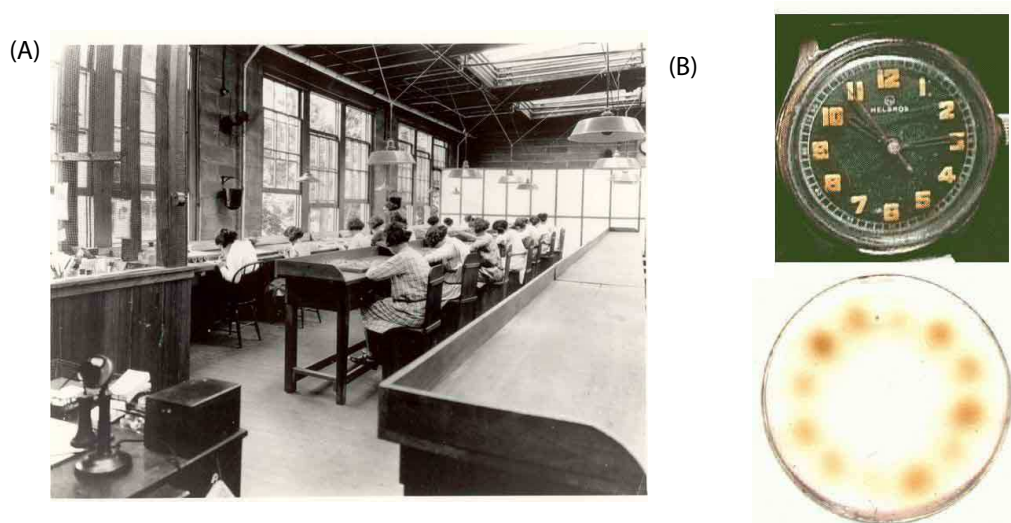


FIG. 2.1: (A) Atelier d'une usine fabriquant des cadrans de montres phosphorescent au radium au milieu des années 20 (<http://www.umdnj.edu/librweb/speccoll/USRadiumCorp.html>) (B) Montre ayant une radioactivité non négligeable (<http://alan-watch.homestead.com/page9.html>)

l'ordre de quarante minutes a été rapidement amélioré par codopage au cobalt. Puis Leonard développa, dans les années 30, des sulfures d'alcalino-terreux (CaS , SrS , ...) [76]. Cette famille de composés était malodorante (à cause des émanations de soufre) et sensible à l'humidité.

En 1996, Matsuzawa et al. [77] ont découvert pour le compte de la société Nemoto le composé $\text{SrAl}_2\text{O}_4 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$. Cette découverte relança la recherche scientifique dans ce domaine. Ce composé émettant dans le vert avait en effet la propriété de rester visible pendant plus de 12h, permettant l'obtention d'objets lumineux durant toute une nuit.

Même si la couleur verte a été la plus développée (pour des raisons de sensibilité maximum de l'oeil à cette longueur d'onde), l'ensemble des couleurs a été synthétisé (voir section 2.1.1). La taille moyenne de poudres commercialisées varie de 10 à 60 μm .

Des exemples de matériaux à luminescence persistante couvrent l'ensemble des grandes classes de matériaux. Selon les matrices et les dopants un ensemble de couleurs est accessible. Il est à noter le regain d'intérêt pour ce type de matériau depuis une quinzaine d'années (ce qui correspond à la synthèse de l'aluminate de strontium SrAl_2O_4) avec un nombre important de publications concernant à la fois la synthèse et la composition de nouveaux matériaux depuis les années 2000.

L'excitation se fait généralement par excitation lumineuse dans l'UV ou le visible mais peut se faire également par RX. Après excitation, on observe une décroissance régulière du signal.

Applications actuelles des matériaux à luminescence persistante

Les matériaux à luminescence persistante sont utilisés dans un grand nombre d'objets de la vie courante. Les applications principales sont les suivantes :

- signaux de sortie et d'avertissements

Composition chimique	Longueur d'onde d'émission	Ref
Composés commerciaux		
CaAl ₂ O ₄ :Eu ²⁺ , Nd ³⁺	440 nm	
Sr ₄ Al ₁₄ O ₂₅ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	490 nm	
SrAl ₂ O ₄ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	520 nm	
ZnS :Cu ⁺	530 nm	
Y ₂ O ₂ S :Ti ⁴⁺	565 nm	
CaS :Eu ²⁺ , Tm ³⁺	650 nm	
Aluminates		
CaYAl ₃ O ₇ :Ce ³⁺	410 nm	[78]
CaAl ₂ O ₄ :Mn ²⁺ , Ce ³⁺	525 nm	[79]
Ca ₁₂ Al ₁₄ O ₃₃ :Nd ³⁺ , Eu ²⁺	440 nm	[80]
CaAl ₂ O ₄ :Eu ²⁺ , R ³⁺	440 nm	[81]
SrAl ₂ O ₄ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	530 nm	[77]
Silicates		
MgSiO ₃ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺ , Mn ²⁺	660 nm	[79]
CaMgSi ₂ O ₆ :Eu ²⁺ , M ³⁺ (M = Dy ou Nd)	438 nm	[82]
M ₂ MgSi ₂ O ₇ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺ (M=Ca,Sr,Ba)	537,5, 475,6 et 500,3 nm	[83]
Aluminosilicates		
Ca ₂ Al ₂ SiO ₇ :Mn ²⁺ , Ce ³⁺	550 nm	[79]
Ca ₂ Al ₂ SiO ₇ :Ce ³⁺	410 nm	[78]
CaSrAl ₂ SiO ₇ : Eu ²⁺ , Dy ³⁺	520 nm	[84]
Sulfure		
Ca _{1-x} Sr _x S :Eu ²⁺	590-650 nm	[85]
ZnS :Mn ²⁺	em : 600 nm	[86]
Phosphate		
β-Zn ₃ (PO ₄) ₂ :Mn ²⁺ , M ³⁺ (M = Al ou Ga)	616 nm	[87]
Composés plus exotiques		
Ba ₂ Si ₅ N ₈ :Eu ²⁺	600-630 nm	[88]
MgGeO ₃ :Mn ²⁺	670 nm	[89]

TAB. 2.1: Exemple de composés à luminescence persistante commerciaux et décrits dans la littérature

- vêtements de sécurité
- jouets
- appâts pour la pêche
- peinture

Généralement, une quantité allant de 10 à 50 % est insérée dans la masse de l'objet pour donner les propriétés de luminescence persistante à l'ensemble de l'objet.

Il est à noter qu'il n'existait pas d'applications en biologie de ces matériaux avant ce travail. Ceci est dû à la taille trop importante des particules commerciales. D'autre part, ces matériaux étant destinés à être visibles par l'Homme, on comprend aisément que des matériaux émettant dans le proche infrarouge n'aient pas été développés commercialement.

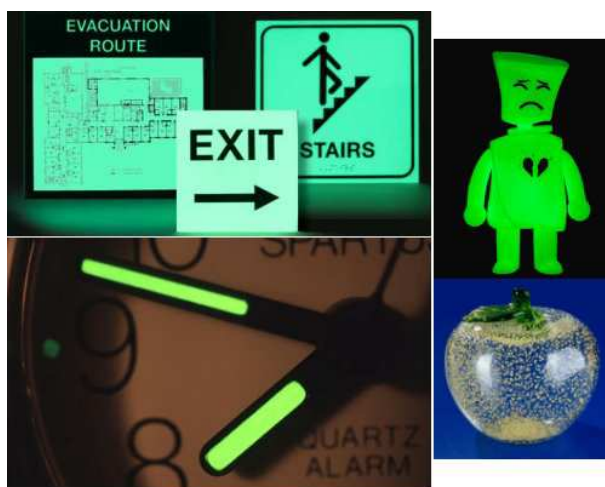


FIG. 2.2: Divers objets "phosphorescents"

2.1.2 Mécanismes de la luminescence persistante

Nous n'allons pas entrer dans le détail du mécanisme de luminescence persistante pour deux raisons. La première tient au fait qu'il s'agit encore d'un phénomène mal compris faisant encore débat dans la communauté scientifique. La deuxième vient du fait que l'objectif de cette thèse n'était pas l'étude physique de ces matériaux mais leur utilisation pour des études biologiques. Toutefois, il a été important d'en comprendre le principe général afin de faire évoluer les matériaux et les optimiser.

Le phénomène de luminescence persistante est issu d'un mécanisme différent de la fluorescence ou de la phosphorescence. La différence fondamentale réside à la fois dans la durée d'émission de lumière puisqu'elle peut aller jusqu'à plusieurs heures et dans le mécanisme physique de luminescence. Il est connu depuis longtemps que ce phénomène fait intervenir le piégeage et le dépiégeage d'électrons ou de "trous" (équivalent à une charge positive) qui se trouvent respectivement dans des pièges à électrons et des pièges à trous [90]. Un matériau à luminescence persistante peut être vu comme un condensateur qui va se charger sous l'effet d'une excitation et qui va progressivement se décharger en émettant des photons. Ce mécanisme est donc particulièrement différent de tous ceux énoncés préalablement.

Rappel sur la structure d'un matériau Un matériau est principalement caractérisé par sa composition chimique et sa structure cristalline, c'est à dire l'arrangement tridimensionnel des atomes le constituant. Cet arrangement a pour effet de produire dans le cas de matériau plusieurs bandes d'orbitales moléculaires possédant une énergie propre. La formation de ces bandes est due au phénomène suivant : le recouvrement d'orbitales atomiques de deux atomes conduit à la formation de deux orbitales moléculaires (OM) : une OM de basse énergie occupée et une OM de plus haute énergie vide. Si l'édifice moléculaire possède N orbitales atomiques conjuguées identiques, il y a création de deux continums de $N/2$ orbitales moléculaires (voir Figure 2.3). Le nombre d'atomes contenus dans un matériau étant très important, la structure électronique de l'édifice sera constituée de plusieurs continums d'orbitales moléculaires. Elle sera caractérisée dans le cas d'un isolant par l'occupation totale des OM de plus basse énergie (bande de valence, BV) et par toute une série de niveaux inoccupés qui vont créer une bande de conduction (BC). Dans le cas de silicate, la bande de valence est constituée principalement d'un recouvrement des orbitales 2p de l'oxygène tandis que la bande de conduction proviendra des cations. La zone comprise entre ces deux bandes porte le nom de bande interdite. Dans un cas classique de silicate, l'écart entre BV et BC est de l'ordre de 8 à 9 eV. Le passage d'un électron de la BV à la BC nécessite un apport d'énergie important. En effet 8 eV correspond à une excitation à 150 nm (excitation UV lointain).

Un semiconducteur possédera une bande interdite d'environ 1 eV, ce qui permet un remplissage partiel de la bande de conduction par activation thermique. Pour un métal, le niveau de Fermi se placera dans la bande de conduction, expliquant la conductivité électrique observée.

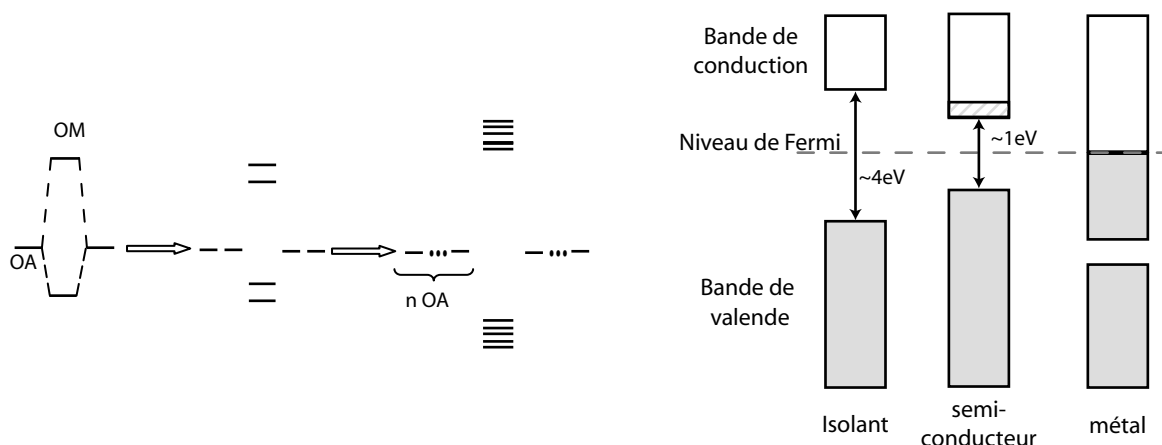


FIG. 2.3: Configuration du niveau de Fermi pour un isolant, un semiconducteur et un métal. Dans le cas d'un semi-conducteur l'agitation thermique est suffisante pour peupler une partie de la bande de conduction

Nature des pièges Le mécanisme de luminescence persistante nécessite d'avoir des défauts dans le matériau. En effet, ces défauts vont créer des niveaux électroniques permis dans la bande interdite. Ces défauts sont de deux ordres. Il s'agit soit d'imperfections du matériau en lui-même – on parle alors de défauts intrinsèques – ou des

impuretés ou des dopants ajoutés qui seront qualifiés de défauts extrinsèques. Selon la capacité de ces pièges à stocker une charge nette négative ou positive, on parlera respectivement de pièges à électrons et de pièges à trous.

Pièges à électrons Un électron peut être piégé dans une matrice isolante de plusieurs façons. La première passe par la polarisation de son environnement et une déformation locale de l'arrangement ionique. Un défaut ponctuel, comme une lacune d'oxygène, peut également être un piège efficace. Les pièges à électrons se trouvent proche de la bande de conduction.

Pièges à trous De façon analogue aux électrons, les "trous" peuvent être piégés dans un isolant. Ils peuvent se trouver à proximité d'une lacune anionique ($X^- + X^- + h \rightarrow X^0 + X^- \rightarrow X_2^-$ - appelé centre V_k), d'un cation ($X^{n+} + h \rightarrow X^{(n+1)+}$) ou d'une lacune cationique. Un piège à trous se trouvera à proximité de la bande de valence.

Mécanisme simplifié Le mécanisme présenté à la figure 2.4 est proche de celui proposé par Aitasalo et al. [91]. Nous n'avons pas désigné la nature des pièges ni la façon dont s'opèrent les transferts d'énergie, le débat scientifique portant sur cela.

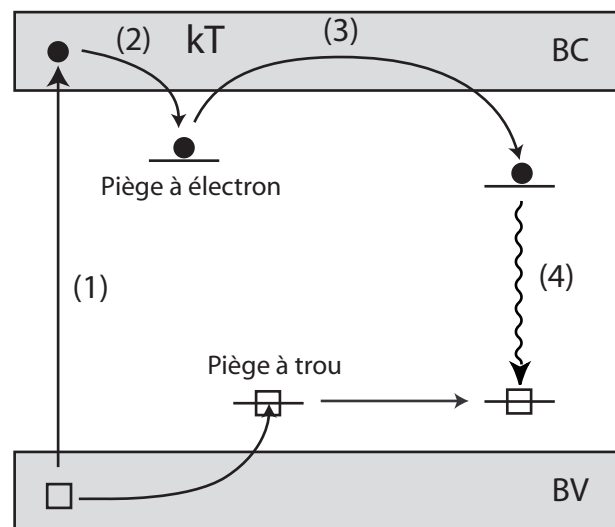


FIG. 2.4: Mécanisme simplifié de la luminescence persistante

L'énergie d'excitation va provoquer dans le matériau la création d'un exciton, à savoir une paire électron-trou. Classiquement, on observe une recombinaison très rapide de cet exciton et émission d'un photon. Dans un matériau à luminescence persistante, un certain nombre de défauts vont être capables de provoquer la séparation de cet exciton piégeant ainsi une partie de l'énergie captée. Les électrons et les "trous" électroniques créés par l'excitation sont piégés sur des défauts ponctuels généralement différents pour que la recombinaison n'intervienne pas immédiatement.

Cette énergie n'est que temporairement piégée. Ces électrons et "trous" électroniques peuvent être dépiégés soit thermiquement, si la profondeur du piège dans la bande interdite est faible (inférieure à $3 kT$), soit optiquement si les pièges sont plus profonds. La recombinaison "électron-trou" au niveau d'un centre émetteur permet de porter un

ion luminescent dans l'état excité. Celui-ci se désexcite généralement par un mécanisme classique de fluorescence.

La durée particulièrement longue de l'émission provient d'une absorption d'énergie plus ou moins transitoire au niveau de défauts ponctuels présents dans le matériau. La dernière étape de ce processus est en règle générale basée sur un phénomène de fluorescence mais étant donné l'énergie accumulée dans les défauts qui se dissipe progressivement, la durée d'émission devient particulièrement longue (plusieurs heures).

Le nombre d'électrons et de trous piégés diminuant à chaque émission de photon, on observe une diminution progressive de l'intensité lumineuse émise au cours du temps. Il est toutefois important de mentionner que la décroissance ne se fait pas de façon exponentielle (comme par exemple en radioactivité). On observe aux temps longs une décroissance de type hyperbolique ($I \approx I_0 \times t^{-n}$, $n \in \mathbb{R}$) comme le montre la Figure 2.5.

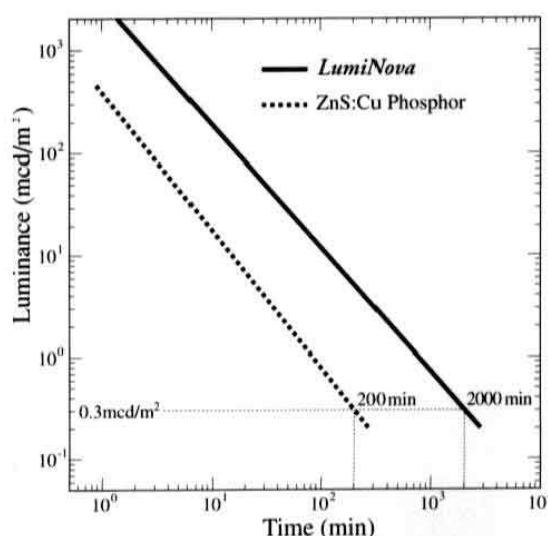


FIG. 2.5: Décroissance typique des matériaux à luminescence persistante. En échelle log-log, le déclin de luminescence s'assimile à une droite, ce qui montre le caractère hyperbolique de la décroissance. Généralement, $n \approx 1$

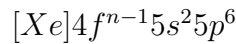
Obtention de défauts dans les matériaux On observe ce phénomène chez certains matériaux dopés généralement avec des ions de terres rares. "Terres rares" est le nom général donné dans un premier temps aux minerais contenant les oxydes de ces éléments puis aux éléments eux-mêmes. On y trouve quinze éléments, ($Z = 57$ à $Z = 71$) caractérisés par la présence d'électrons dans les orbitales 4f. Leur configuration électronique fondamentale s'écrit⁴ :

$$[Xe]4f^n 5s^2 5p^6 6s^2$$

L'ionisation des atomes de terres rares produit généralement des ions trivalents. Cependant certains ions existent au degré d'oxydation $+II$ comme l'euprimum, ou $+IV$ comme le cérium. Ce sont les électrons de la couche 6s et ceux de la couche 5d ou 4f

⁴il existe une exception pour le gadolinium et le lutetium où un électron se place dans l'orbitale 5d afin de minimiser les énergies d'appariement (Ga : $[Xe] 4f^7 5s^2 5p^6 5d^1 6s^2$, Lu : $[Xe] 4f^{14} 5s^2 5p^6 5d^1 6s^2$)

qui sont arrachés lors de l'ionisation. La configuration électronique des ions trivalents est donc :



Les orbitales électroniques externes $5s$ et $5p$ restent pleines et servent d'écran à la couche $4f$. D'après la méthode de calcul de Hartree-Fock, on peut obtenir la distribution radiale de probabilité des orbitales $4f$, $5s$, $5p$, comme par exemple pour l'ion Pr^{3+} (voir figure 2.6). On remarquera que les électrons $4f$ sont plus proches du noyau que les électrons $5s$ et $5p$. La faible extension spatiale des fonctions d'onde associées aux électrons $4f$ permet d'expliquer de nombreuses propriétés optiques des ions de terres rares. Cet écrantage fait que les niveaux électroniques vont être très peu dépendant de leur environnement.

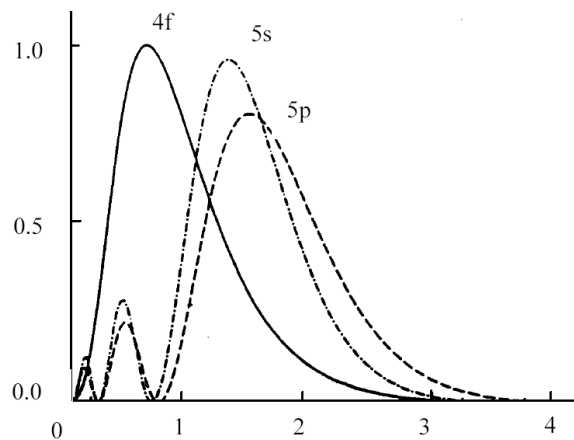


FIG. 2.6: Distributions radiales de probabilité des orbitales $4f$, $5s$ et $5p$ pour l'ion libre Pr^{3+} [92]

Les ions de terres rares ont été désignés comme pièges à électrons efficaces ou tout du moins modifiant les trous existant.

P. Dorenbois a proposé un mécanisme de luminescence faisant intervenir le positionnement des terres rares dans la bande interdite [93]. Si on considère un dopage Eu^{2+} - Dy^{3+} dans un matériau, le mécanisme proposé passe par la création du couple Eu^{3+} - Dy^{2+} où l'euporium joue le rôle de piège à trou efficace et le dysprosium (ou une autre terre rare) joue le rôle de piège à électron. Par une étude approfondie, il est possible de connaître la position d'une terre rare (par exemple l'euporium) et ainsi d'en déduire le positionnement de toutes les terres rares [94,95]. Selon la position de la terre rare par rapport à la bande de conduction, il est possible de prédire l'efficacité de la luminescence persistante. Si le piège est trop profond, il n'y aura pas de luminescence. Si le piège est trop peu profond ou se trouve dans la bande de conduction, il n'y aura pas de piégeage et donc pas de luminescence retardée.

Profondeur du piège Pour mettre en évidence le rôle de la profondeur des pièges, des expériences de thermoluminescence sont généralement conduites [97]. En analysant l'évolution de la luminescence d'un matériau en fonction de la température, il est possible de déterminer la quantité et la profondeur (de quelques centièmes d'eV à 1 eV) des

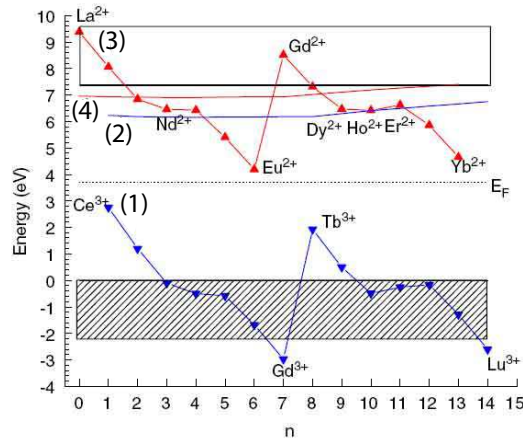


FIG. 2.7: Positionnement des terres rares dans la bande interdite de SrAl_2O_4 . Les courbes 1) et 2) en bleu correspondent au niveau de plus basse énergie de la configuration $4f^{n+1}$ et $4f^n 5d$ respectivement pour les ions divalents. Les courbes 3) et 4) en rouge correspondent respectivement au niveau de plus faible énergie de la configuration $4f^n$ et de la configuration $4f^{n-1} 5d$ pour les ions trivalents. [96]

pièges présents. Il est également possible de suivre la luminescence associée à chaque piège.

Si le mécanisme général est correct, l'excitation et le peuplement des pièges ne sont pas ou peu affectés par la température⁵. En revanche, le phénomène de dépiégeage étant dépendant de la température, la luminescence devrait être grandement affectée par une hausse ou une baisse de la température. Une température basse limitera le dépiégeage des électrons et ainsi devrait diminuer l'intensité de la luminescence. Le dépiégeage se faisant plus lentement, la luminescence devrait en revanche durer plus longtemps. À l'inverse une température plus haute conduit à une luminescence plus intense mais moins longue.

Pour montrer l'influence de la température et de la profondeur des pièges, nous avons réalisé l'expérience suivante sur un matériau synthétisé ($\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ dopé Eu^{2+} , Dy^{3+} , Mn^{2+} , voir chapitre 3.2). Nous l'avons irradié à l'aide d'une lampe UV, le matériau étant refroidi à -78°C grâce à un mélange acétone-carboglance. L'échantillon est ensuite placé à température ambiante sous un détecteur (PhotonImager de Biospace). Le résultat de cette expérience est présentée à la figure 2.8. On observe tout d'abord une luminescence non nulle, ce qui permet de dire que l'irradiation et le piègeage de l'énergie fonctionnent à froid. On note d'autre part une augmentation de l'intensité au cours du temps. Il s'agit d'un comportement inhabituel qui s'explique par l'augmentation de la température qui augmente la fréquence de dépiégeage et donc la luminescence. Si l'échantillon est placé à -78°C et que le flux lumineux est quantifié, on observe une chute brutale de la luminescence d'un facteur 1000. Toutefois, l'énergie stockée lors de l'excitation du matériau n'est pas perdue, une remontée en température permettant de retrouver le niveau de luminescence.

⁵On attend toutefois que le peuplement des pièges soit favorisé. En effet, comme le phénomène de dépiégeage est plus difficile, le remplissage des pièges est plus efficace. Cela ne se caractérise donc pas une fluorescence supérieure au moment de la fin de l'excitation. Ceci a pu être mise en évidence sur le composé $\text{SrAl}_2\text{O}_4 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ [98]

Cette expérience explique simplement pourquoi certains matériaux auront une luminescence persistante. S'il n'existe pas de pièges pour stocker l'énergie, il n'y aura pas de persistance. Si les pièges ne sont pas à la bonne distance de la bande de valence, il n'y aura pas de luminescence persistante.

La synthèse de matériaux à luminescence persistante est donc relativement complexe car elle dépend de nombreux paramètres. C'est pourquoi, même s'il existe quelques règles, la recherche de nouveaux matériaux se fait de façon empirique.

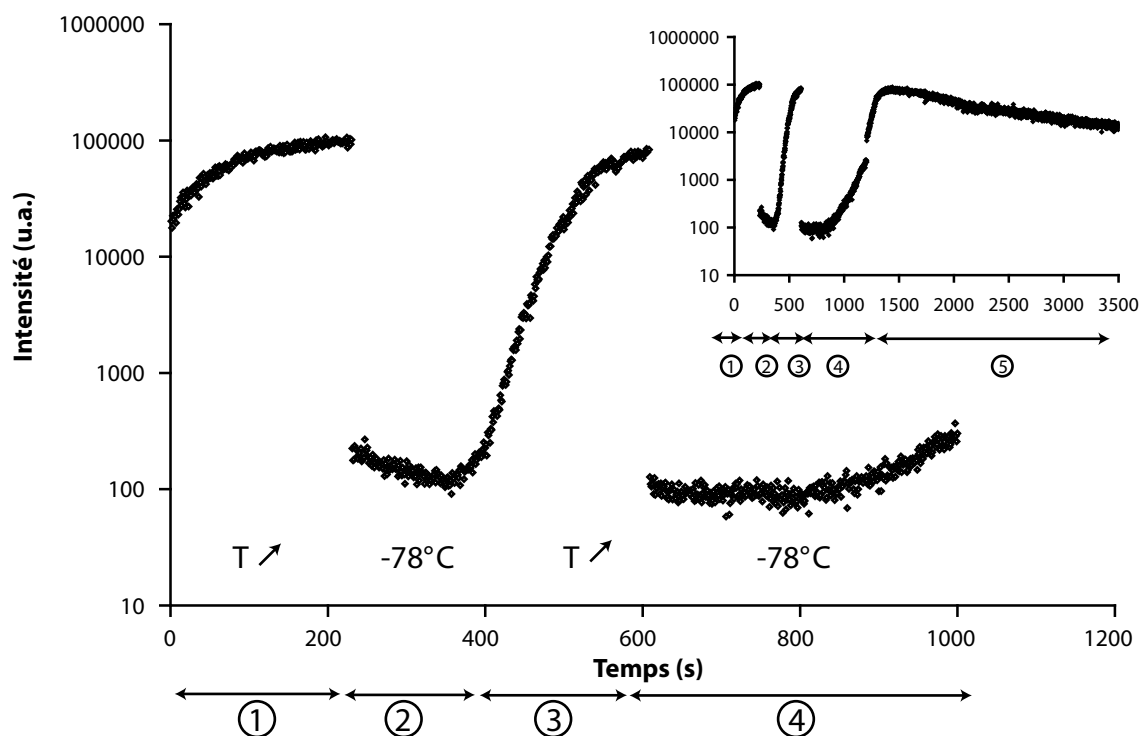


FIG. 2.8: effet de température. 1) remontée en température 2) acquisition à froid (-78°C) 3) remontée en température 4) acquisition à froid et remontée lente en température 5) remontée en température et déclin de luminescence à température ambiante.

2.2 Silicates et luminescence persistante

L'étude qui est présentée dans cette thèse a porté sur un type particulier de matériau, à savoir les silicates. Le composé MgSiO_3 dopé $\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$ décrit par Wang et al. [79] a particulièrement retenu notre attention au début de ce travail. Il s'agissait en effet d'un exemple simple de silicate possédant une luminescence rouge persistante et efficace.

2.2.1 Exemple de silicate à luminescence persistante

Les silicates sont des minéraux dont le squelette est formé de tétraèdres de silicium et d'oxygène. Comme nous avons pu le voir, il existe de nombreux exemples de silicates

possédant la propriété de luminescence persistante plus ou moins longue. Ils ont été toutefois moins développés que les aluminates ou les sulfures.

Composition générale	Composé	Emission	Ref.
MSiO ₃	MgSiO ₃ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺ , Mn ²⁺	660 nm	[79]
M1M2Si ₂ O ₆	CaMgSi ₂ O ₆ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺ ou Nd ³⁺	438 nm	[82]
	Sr ₂ MgSi ₂ O ₇ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	404nm 459nm	[99]
		466 nm	[100]
M1M2M3Si ₂ O ₇	Ca ₂ MgSi ₂ O ₇ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	447 nm 516 nm	[99]
	(Sr,Ca)MgSi ₂ O ₇ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	490 nm	[100]
	Sr ₂ ZnSi ₂ O ₇ :Eu ²⁺ , Dy ³⁺	385 nm 457 nm	[101]

TAB. 2.2: Exemple de silicates à luminescence persistante

Dans l'article de Wang et al., le matériau a été synthétisé par voie solide, c'est à dire par frittage de poudres d'oxydes. Ce type de synthèse n'était bien sûr pas envisageable pour l'application biologique recherchée. Nous avons donc durant ce travail tenté de synthétiser ce matériau sous forme nanoparticulaire.

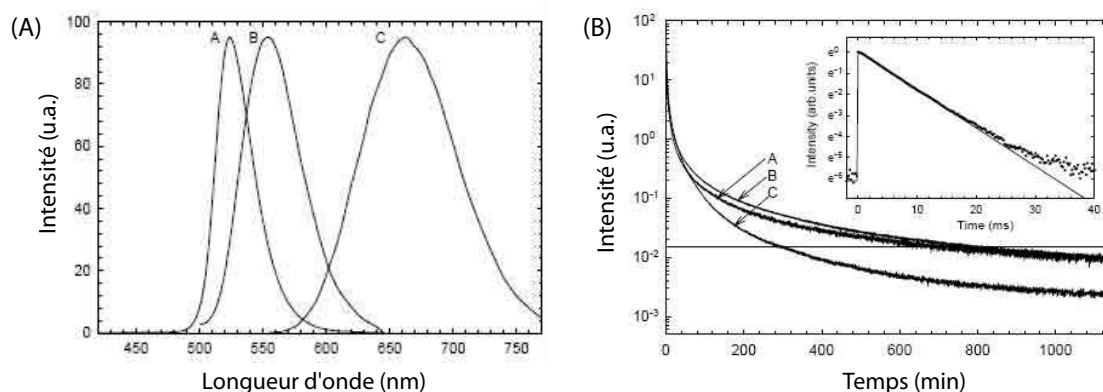


FIG. 2.9: Spectre d'émission (à gauche) et déclin de luminescence (à droite) de composés décrits dans la littérature par Wang et al. (A) CaAl₂O₄ :Mn²⁺, Ce³⁺ (B) Ca₂Al₂SiO₇ :Mn²⁺, Ce³⁺ (C) MgSiO₃ :Eu²⁺, Dy³⁺, Mn²⁺

Avant de présenter la stratégie de synthèse, il est important de décrire la structure cristalline de ce matériau. Comme nous le verrons, la structure cristalline a joué un rôle important dans le développement des matériaux.

2.2.2 Polymorphisme de l'enstatite (MgSiO₃)

L'enstatite, de formule chimique MgSiO₃ a été décrite pour la première fois par G.A. Kenngott en 1855. Ce matériau fait partie de la famille de pyroxènes. Les pyroxènes, composants majoritaires de l'écorce et du manteau de la croûte terrestre, sont des silicates contenant une chaîne de (SiO₃)_n formée de tétraèdres de SiO₄ liés entre eux. Une partie du silicium peut être remplacée par d'autres ions comme de l'aluminium. La formule chimique générale pour tous les pyroxènes est M2M1T₂O₆ où M2 est un cation se trouvant dans une coordination octaédrique déformé, M1 un cation dans

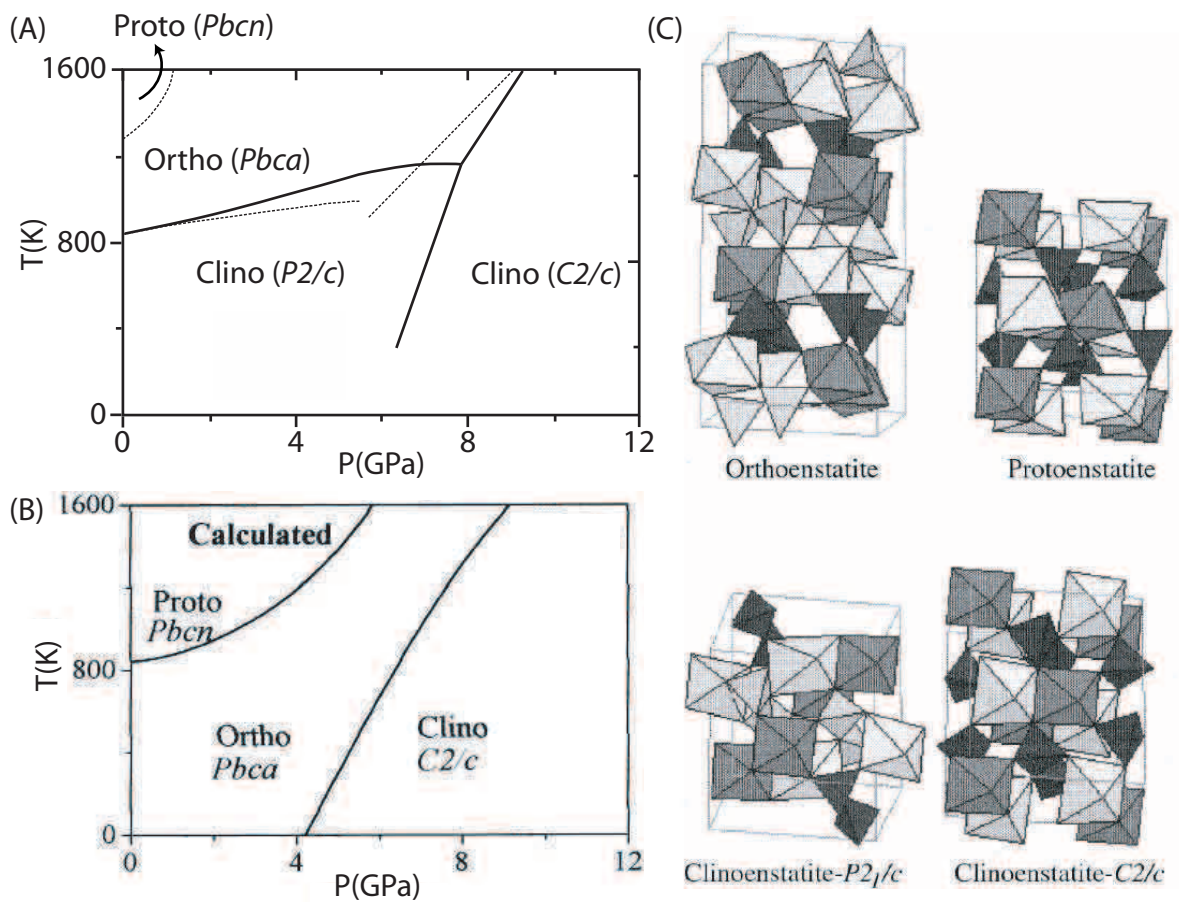


FIG. 2.11: (A) Diagramme de phase expérimental de l'enstatite (B) Diagramme de phase calculé de l'enstatite. On remarquera l'absence de phase Clino $P2_1c$ (C) Arrangement tridimensionnel des atomes selon la phase cristalline. Les octaèdres correspondent à l'environnement du magnésium tandis que les tétraèdres correspondent au silicium (d'après [108])

grammes de diffraction X^6 . Dans un mélange de phase, cette identification n'est pas évidente. En effet, orthoenstatite et clinoenstatite ont leur pic de diffraction le plus intense à 31° (2θ) avec un autre pic prédominant à $28,1^\circ$ (2θ). Ce dernier pic coïncide avec le pic le plus intense de la protoenstatite.

L'enstatite dopée décrit par Wang et al. a été le matériau de référence durant ce travail. Toutefois, il n'est pas fait mention dans cet article de la structure cristalline du composé obtenu.

2.3 Colloïdes et procédé sol-gel

2.3.1 Caractérisation de colloïdes

Un des objectifs de ce travail était la synthèse de composés à luminescence persistante avec une taille nanométrique. Dans les méthodes classiques de préparation des matériaux à base d'oxydes, les matières premières sont des poudres cristallines (taille de quelques μm). Les céramiques (matériaux non métalliques et non organiques) sont élaborées par réaction à l'état solide entre les poudres et par frittage à haute température d'un agglomérat particulière.

Les colloïdes sont des objets, suffisamment petits pour être soumis au mouvement brownien causé par le choc des molécules qui les entourent, mais néanmoins suffisamment gros pour être nettement distinguables de ces molécules. Si on empêche, par un moyen ou un autre, les objets colloïdaux de s'agréger en entités plus grosses, le mouvement brownien les maintient en suspension. On obtient alors une dispersion colloïdale stable.

Pour obtenir une suspension stable, il est important que les particules ne dépassent pas une certaine taille (généralement $1\mu\text{m}$) pour éviter une sédimentation rapide due à la gravité. Toutefois cette limite n'est pas stricte. En fait, le domaine colloïdal se caractérise mieux en considérant la grandeur relative des forces auxquelles les colloïdes sont soumis. Des particules en suspension sont en interaction principalement grâce à un certain nombre de forces parmi lesquelles :

- la force attractive de Van der Waals,
- la force électrostatique, la surface des particules peut être chargée et présenter un potentiel électrique non nul,
- la force répulsive d'interaction stérique,
- la force de gravitation, si la masse volumique du milieu de dispersion est différente de celle des particules,

En jouant sur les paramètres physico-chimiques du milieu de dispersion (acidité, force ionique), il est possible d'ajuster ces forces pour obtenir une suspension colloïdale stable. La force de Van der Waals est attractive et aura tendance à faire agréger les particules (potentiel négatif). Pour stabiliser ces particules, il faut contrebalancer cette force. Pour cela, il existe deux stratégies : la première consiste à avoir une stabilisation électrostatique ou de charge (des particules chargées de même signe auront tendance à se repousser), la deuxième méthode est de jouer sur la répulsion stérique. Pour cela, il est nécessaire de modifier la surface des particules en y greffant des polymères (polyéthylène

⁶Les données RX sont exprimées dans ce manuscrit en fonction de la raie K_α du cuivre ($1,5418\text{\AA}$)

glycol par exemple). Les particules seront alors éloignées et la force de Van der Waals ne sera pas assez forte pour provoquer l'agglomération des particules. Si les forces de répulsion ne sont pas assez grandes, on aura une déstabilisation du système.

Cette déstabilisation peut prendre plusieurs formes. Lorsque la répulsion est trop faible, on parle de floculation (agrégation de particules). Un phénomène de coagulation peut alors intervenir si les particules peuvent fusionner. Les particules que nous avons synthétisées pouvant être considérées comme des sphères rigides, ce phénomène ne sera pas rencontré. Après floculation, les agrégats commencent à sédimenter. La sédimentation peut également intervenir malgré des forces de répulsion importantes. On est alors à la limite du système colloïdal où le mouvement brownien ne maintient plus les particules en suspension. Par un effet de concentration, les particules floculent.

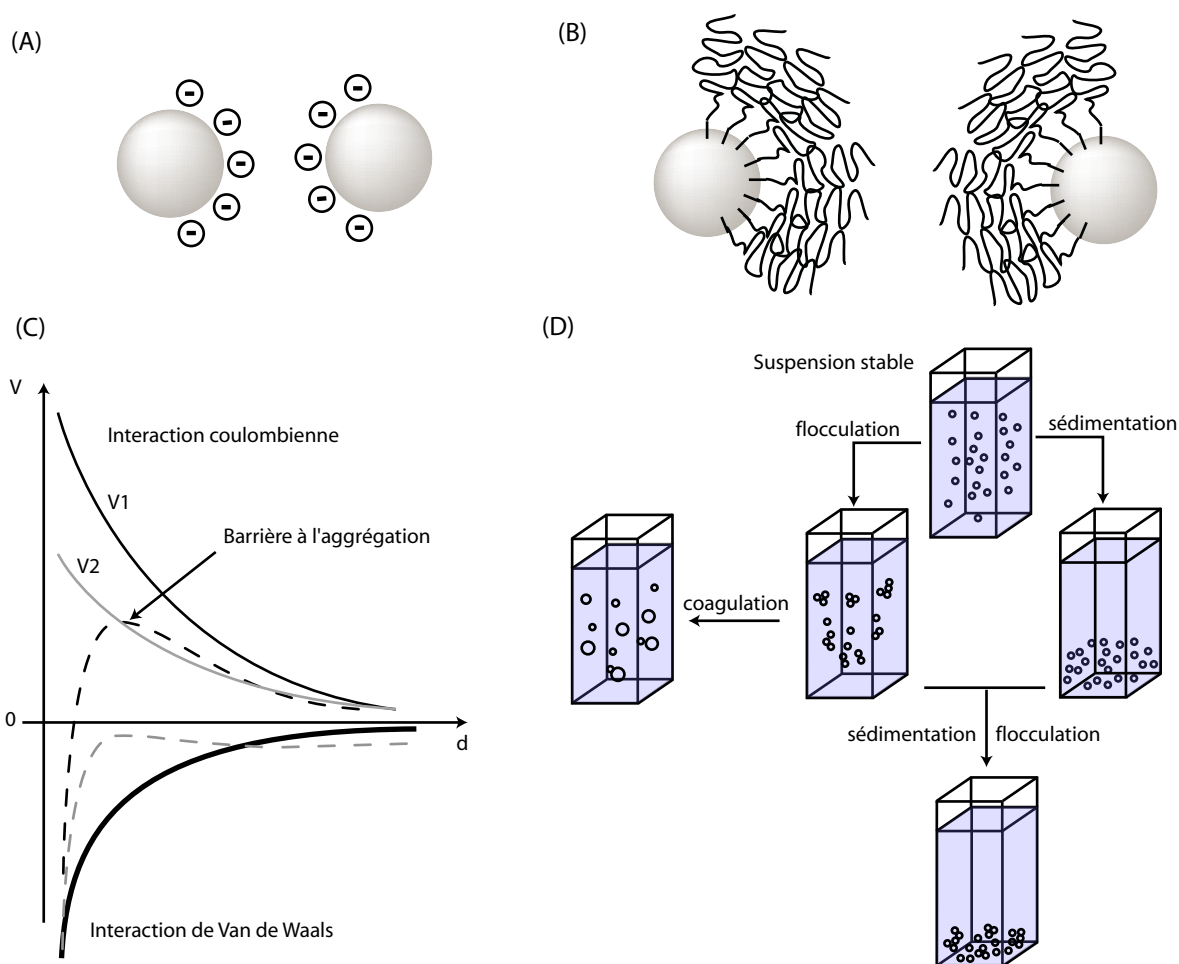


FIG. 2.12: Stabilité colloïdale

Mesure de la taille de particules

Une technique pour mesurer la taille de particules en suspension (nanoparticules ou agrégats, micelles, liposomes) est la diffusion quasi-élastique de la lumière (DQLS). Lorsque les particules sont éclairées par une source lumineuse, telle qu'un laser, elles

diffusent la lumière dans toutes les directions. Les particules étant en mouvement perpétuel à cause du mouvement brownien, l'intensité de la lumière diffusée en un point varie au cours du temps.

De la fluctuation de l'intensité lumineuse, on peut prévoir le diamètre des particules selon une loi reliant la taille des particules et leur vitesse de diffusion ; il s'agit de l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k.T}{6\pi R\eta}$$

où D est le coefficient de diffusion de la particule, R son rayon, k la constante de Boltzmann et η la viscosité du milieu.

Les mesures présentées dans ce travail ont été réalisées au laboratoire à l'aide du *Zetasizer NanoZS90* (Malvern Instruments).

Point isoélectrique et charges de surface

Après chauffage à haute température, les oxydes ne présentent pas intrinsèquement de charges en surface. La surface est composée d'un réseau de liaison $M-O-M'$. Toutefois, il est possible d'hydroxyler relativement facilement ces liaisons en surface. Le simple contact avec un milieu aqueux permet de créer des liaisons $M-OH$, où M peut être un ion métallique ou un silicium. La chimie de surface d'un oxyde en contact avec une solution aqueuse est ensuite grandement déterminée par la dissociation des groupements hydroxyles. Cet équilibre est décrit dans la figure 2.13.

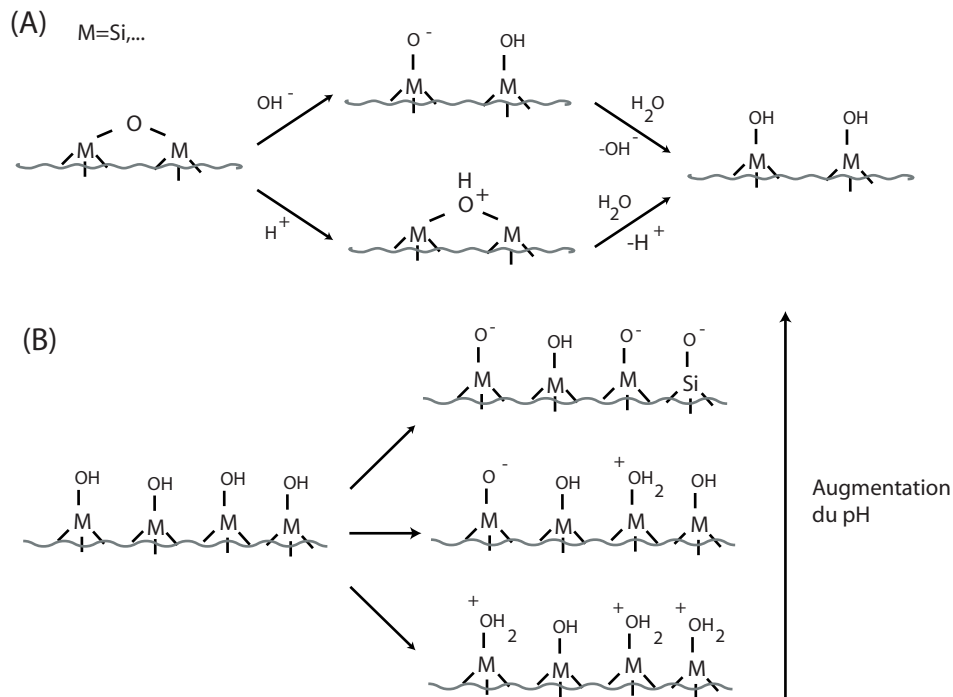


FIG. 2.13: (A) Hydroxylation de la surface de silicates. Cette réaction se produit de façon identique sur la plupart des oxydes. (B) Effet du pH sur les charges de surface.

Ainsi, selon la valeur du pH de la solution et selon le matériau, la surface peut acquérir une charge globale soit positive soit négative. On définit le point isoélectrique (ou point de charge nulle⁷) par le pH auquel il y a globalement autant de charges négatives que de positives. Quelques exemples de PIE de matériaux sont présentés au tableau 2.3.

Si le pH de la solution est supérieur au PIE, la particule sera chargée négativement à cause de la déprotonation des groupements hydroxyles. Si le pH est inférieur, elle sera chargée positivement.

Composition chimique	Point de charge nulle
Silice (SiO_2)	1-3
Zircone (ZrO_2)	4-6
Apatite ($10 CaO.6PO_2.2H_2O$)	4-6
Titane (TiO_2)	5,8
Haematite (Fe_2O_3)	6,5
Mullite ($3Al_2O_3.2SiO_2$)	6-8
Alumine (Al_2O_3)	9,1
Magnésie (MgO)	12

TAB. 2.3: Exemple de point isoélectrique de quelques oxydes

Les particules en suspension dans l'eau présentent une accumulation plus ou moins importante de charges à leur surface. Cet état de charge, caractérisé par le potentiel ζ , va modifier la distribution ionique à l'interface entre le solide et la solution.

Mesure du potentiel de surface

Les particules chargées placées dans un champ électrique vont se déplacer avec une certaine vitesse vers l'électrode de signe opposé. La mobilité électrophorétique des particules, c'est à dire leur vitesse de diffusion en présence d'un champ est mesurée par diffusion de lumière. Cette mesure est reliée au potentiel ζ par la loi de Henry :

$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot \zeta \cdot f(K_a)}{3\eta}$$

où U_E est la mobilité électrophorétique, ϵ la constante diélectrique du milieu, η la viscosité du milieu, $f(K_a)$ la fonction de Henry (égale à 1,5 pour des solutions aqueuses de faible concentration saline).

La mobilité électrophorétique est mesurée comme dans le cas précédent par diffusion de la lumière, les fluctuations de l'intensité lumineuse diffusée étant directement reliées à la vitesse des particules. La mesure du potentiel ζ est réalisée à la limite de la double

⁷Il existe en fait une différence entre ses deux notions. Les termes "point isoelectrique" (PIE) et "point de charge nulle" (PCN ou PZC pour point of zero charge) sont souvent utilisés de façon interchangeable. La différence entre ces deux termes est liée à la façon dont un colloïde acquiert une charge nulle. Dans le cas d'un point isoélectrique, la somme des charges positives et négatives présentes à la surface s'annulent. Dans le cas du PCN, il y a absence totale de charges (positives ou négatives). Ainsi on parlera généralement de PCN pour des oxydes et de PIE pour une protéine ou un virus.

couche électrique, qui correspond à la zone où les contre-ions se déplacent avec la particule.

Le potentiel ζ est gouverné par le pH de la solution. Il est négatif à pH bas et positif à pH élevé. Le point isoélectrique correspond à un potentiel ζ nul. Il s'agit donc du pH où le système est le moins stable.

2.3.2 Procédé Sol-Gel

Il existe de nombreuses façons d'obtenir des nanoparticules (précipitation, synthèse en microémulsion, pyrolyse en spray ...). Le procédé Sol-Gel est une méthode de synthèse de matériau de plus en plus utilisée, pour la synthèse de nanoparticules ou de matériau massif. Pour la synthèse de matériau massif, l'avantage de ce procédé réside dans le contrôle de l'homogénéité des particules initiales avant frittage, permettant d'obtenir des matériaux homogènes.

Le procédé Sol-Gel utilise un mélange homogène de précurseurs moléculaires en solution permettant de construire le solide par des réactions de polymérisation inorganique à basse température. Pour la synthèse de nanoparticules, ce procédé présente l'avantage de pouvoir contrôler les différentes étapes de formation du solide (nucléation, croissance, vieillissement) en ajustant les paramètres opératoires tels que le pH , la force ionique, la nature des ions, la présence de ligands complexants, la température ... Il est alors possible d'obtenir des particules calibrées en taille, de morphologie et de structure cristalline variées (voir Figure 2.14).

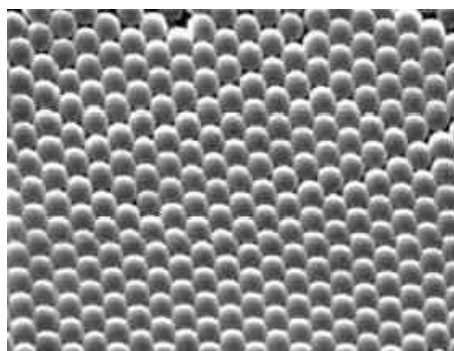


FIG. 2.14: Image obtenue par microscopie électronique à balayage d'opale synthétique formé par la technique Langmuir-Blodgett

Lorsque le solide obtenu est amorphe, sa cristallisation peut être initiée par chauffage. Cette dernière étape nécessite en général des températures bien plus basses que celles utilisées dans les méthodes classiques.

Synthèse d'une suspension colloïdale de silice

La synthèse par voie sol-gel s'effectue généralement à partir d'alcoxydes de formule $M(OR)_m$ où M est un atome, souvent métallique, et R est un groupement organique alkyl C_nH_{2n+1} .

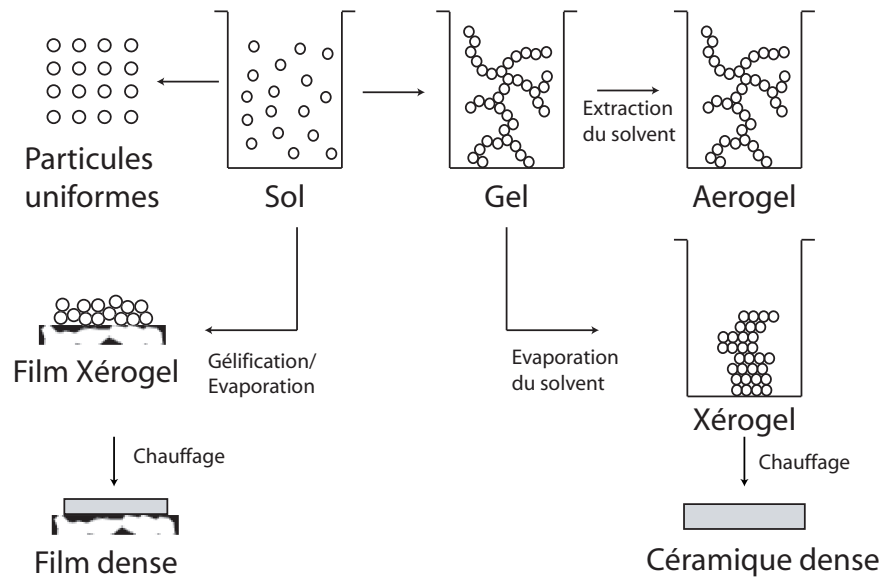


FIG. 2.15: Vue d'ensemble du procédé Sol-Gel avec la nomenclature des différentes étapes (d'après [112])

Les précurseurs de silice les plus fréquemment utilisés sont le tétraéthoxy-silane (TEOS) et le tétraméthoxysilane (TMOS). Des suspensions de particules sphériques colloïdales de silice peuvent être obtenues pour des tailles variant de 2 nm à 500 nm par la méthode développée par Stöber [113].

En solution alcoolique et en présence d'eau, les précurseurs alcoxydes subissent des réactions d'hydrolyse et de condensation. L'hydrolyse génère un groupement $Si-OH$ et libère une molécule d'alcool selon la réaction de la figure 2.16.

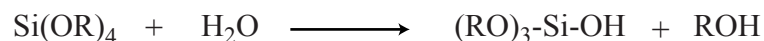


FIG. 2.16: Hydrolyse d'alkoxyde de silicium

Pour le TEOS, en milieu neutre, cette hydrolyse a une cinétique très lente. Il est donc nécessaire de modifier les conditions de pH pour accélérer la réaction. La catalyse se fait soit en milieu acide ($pH < 3$) soit en milieu basique ($pH > 9$). En catalyse acide (resp. basique), l'hydrolyse se fait par attaque électrophile de H_3O^+ (resp. OH^-) sur un groupe alkoxyde (voir figure 2.17).

Il s'en suit une condensation des alkoxydes de silicium activés selon un processus décrit dans la figure 2.18.

Un pH acide accélère l'hydrolyse et ralentit la condensation contrairement au pH basique. En effet, la condensation est défavorisée en milieu acide car les ligands OH abaissent leur activité nucléophile du fait de la protonation. En revanche en milieu alcalin, l'hydrolyse est défavorisée mais la condensation est facilitée par la déprotonation des groupes OH .

L'acidité du milieu est donc un paramètre important qui joue directement sur la fonctionnalité du précurseur, ceci influence par conséquent la structure et/ou la mor-

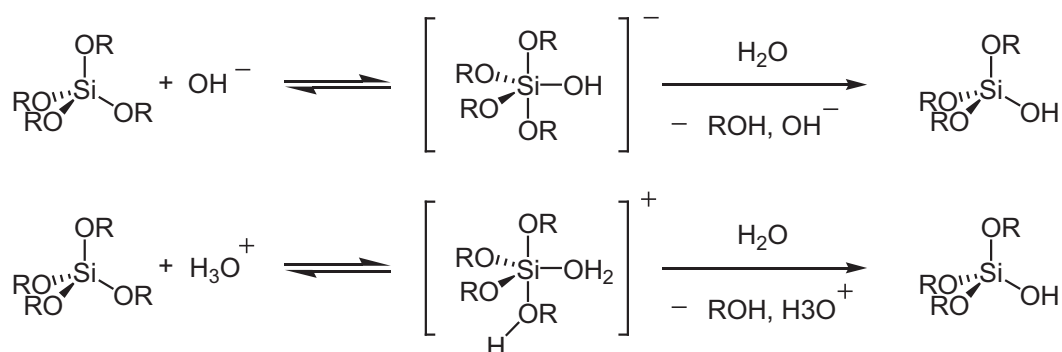


FIG. 2.17: Catalyse acide ou basique de l'hydrolyse

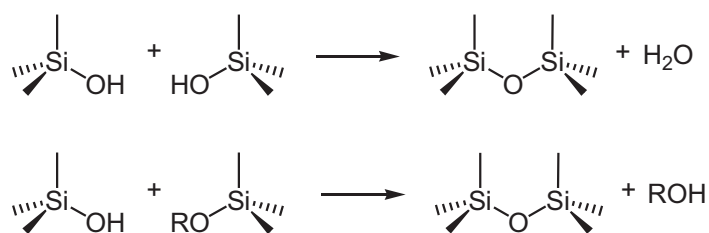


FIG. 2.18: Condensation d'alcoxyde de silicium

phologie des solides obtenus. Ainsi on observe généralement en milieu acide la croissance de chaînes polymériques faiblement réticulées, alors que la formation de polymères fortement ramifiés est favorisée en milieu basique. Dans ce dernier cas, on obtient des particules en pelotes compactes.

La synthèse de matériau silicate consiste donc à faire polymériser la silice en présence de cation. Après chauffage, les constituants peuvent alors former une matrice dense de composition désirée. Toutefois, le mariage entre ces deux composantes (silicium et cations) n'est pas évidente et a donc fait l'objet d'une partie de ce travail.

Deuxième partie

Synthèse et détection *in vivo* de nanoparticules à luminescence persistante

Chapitre 3

Composés à luminescence persistante synthétisés

Sommaire

3.1 Synthèse des matériaux et caractérisations	73
3.1.1 Synthèses des matériaux	73
3.1.2 Caractérisations de la luminescence	76
3.2 Composés à luminescence persistante rouge/infrarouge .	78
3.2.1 MgSiO_3	78
3.2.2 $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$	86
3.2.3 $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$	88

3.1 Synthèse des matériaux et caractérisations

3.1.1 Synthèses des matériaux

Pour évaluer le potentiel de la luminescence persistante dans des études biologiques, notre étude a principalement porté sur la synthèse de nanoparticules de silicates, la synthèse se faisant par voie sol-gel. Pour obtenir ces composés, plusieurs méthodes de synthèse, dont notamment celle développée par Douy [114] pour l'enstatite ont été testées. La synthèse développée par Douy se fait par précipitation à l'aide d'une base (triéthylamine) d'un mélange constitué de sels et de TEOS hydrolysé puis réprécipitation dans de l'ammoniaque. Cette méthode qui a été testée au début de ce travail n'a finalement pas été retenue à cause des problèmes de reproductibilité de synthèse avec l'obtention après chauffage de composés complètement noirs. Deux raisons peuvent être évoquées pour expliquer cet échec dans la synthèse du matériau que nous souhaitons synthétiser. La première raison viendrait d'un problème d'évacuation des déchets organiques lors du chauffage, ce qui engendrerait un matériau de type Si-O-N (les composés ont une couleur du jaune au gris). La première raison pourrait venir de l'utilisation d'un milieu réducteur trop important (gaz réducteur en présence d'ammoniac) qui permettrait la ségrégation du manganèse et sa réduction en métal. Ceci nous a conduit à préférer la voie "gélification" qui nous a donné rapidement des résultats. Il serait toutefois

intéressant de chercher à analyser plus profondément les causes de cet échec.

L'avantage de cette voie, par rapport à la précipitation, est la certitude que l'ensemble des constituants introduits se retrouvera dans le matériau final. Par précipitation, il est en effet difficile de s'assurer que tous les ions métalliques vont être piégés dans la matrice ou être répartis de façon homogène.

Protocole expérimental

Nous allons décrire ici la méthode de synthèse développée durant ce travail permettant l'obtention de nanomatériaux à luminescence persistante. Les quantités des différents composés chimiques utilisées pour la synthèse des matériaux seront détaillées dans la partie expérimentale (voir Annexe A).

La synthèse comporte quatre grandes étapes : la dissolution et l'hydrolyse des constituants du matériau (en l'occurrence les sels minéraux et du tétraéthoxysilane), la gélification, le séchage et le chauffage à haute température.

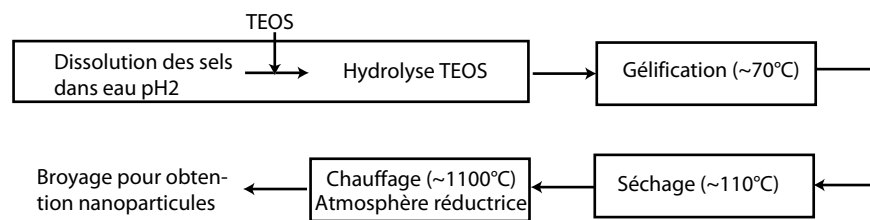


FIG. 3.1: Schéma des différentes étapes de la synthèse des particules

Comme précurseur de silice nous avons utilisé le tétraéthoxysilane (ou TEOS) qui se présente sous forme liquide non miscible à l'eau. Les ions métalliques utilisés sont, selon la composition du matériau désiré, du magnésium, du calcium, du strontium et du zinc sous forme de nitrate ou de chlorure. Certains essais ont également incorporés des ions aluminium (afin de former des aluminosilicates) et du barium. Ces essais n'ayant pas engendré d'études ne seront pas décrits ici.

Le choix du pH de réaction fixe la voie choisie. A pH basique, on se trouve dans des conditions de Sol. À pH basique, le TEOS s'hydrolyse lentement et se condense rapidement menant à la formation de petites particules. De plus, certains ions précipitent sous forme d'hydroxyde. À pH acide, le TEOS s'hydrolyse rapidement et se condense lentement, les ions restant sous forme de cations hydratés.

La première étape de la synthèse Sol-Gel est donc l'hydrolyse du tétraéthoxysilane. Pour réaliser cette hydrolyse, l'ensemble des sels est dissous dans de l'eau à pH 2 (acidifiée par addition d'acide nitrique concentré). A cette solution est ajoutée le TEOS. On obtient alors un mélange biphasique eau-TEOS. Pour accélérer l'hydrolyse, il est nécessaire d'avoir une forte agitation (pour augmenter la surface de contact entre la phase hydrophobe et l'eau). En outre, un vortex est utilisé régulièrement pendant l'hydrolyse pour homogénéiser le mélange. L'hydrolyse dure environ une heure à température ambiante. La fin de l'hydrolyse se caractérise par l'obtention d'un mélange homogène monophasique, contenant des silanols, des ions et de l'éthanol (issu de l'hydrolyse du TEOS).

Dès la formation de groupes silanols par hydrolyse, le phénomène de condensation de silanols intervient. Celle-ci correspond à la formation de ponts siloxane (Si-O-Si). Ces ponts sont soit formés à partir de la condensation de deux groupements silanols ce qui libère une molécule d'eau ou par condensation entre un groupement éthoxy et un groupement silanol, libérant ainsi une molécule d'éthanol. Cette condensation progressive provoque à terme le phénomène de gélification (qui correspond à un point de percolation du système).

La gélification est relativement lente à température ambiante (environ 2-3 jours). Pour accélérer cette réaction, on place notre échantillon dans une étuve à 70°C, en évitant toutefois le séchage du gel. Pour cela, le récipient est gardé bouché. Au début de cette étape, le récipient est régulièrement ouvert pour relâcher la pression engendrée par la hausse de température. Le liquide se solidifie au bout d'une heure pour donner un gel translucide. Ce gel contient donc un réseau de silice, des cations, des anions (chlorure ou nitrate) de l'eau et de l'éthanol (provenant de l'hydrolyse du TEOS).

Des expériences préliminaires nous ont permis de montrer qu'il était nécessaire de sécher l'échantillon avant le chauffage haute température. Une partie de l'eau présente dans le gel est ainsi évaporée par chauffage à l'étuve à 110°C. Cette étape améliore la cristallisation du matériau après chauffage haute température. Le flacon y est laissé pendant une nuit. Après 12 h, le produit ressemble à des morceaux de gélatine dont l'opacité dépend de la composition du gel.

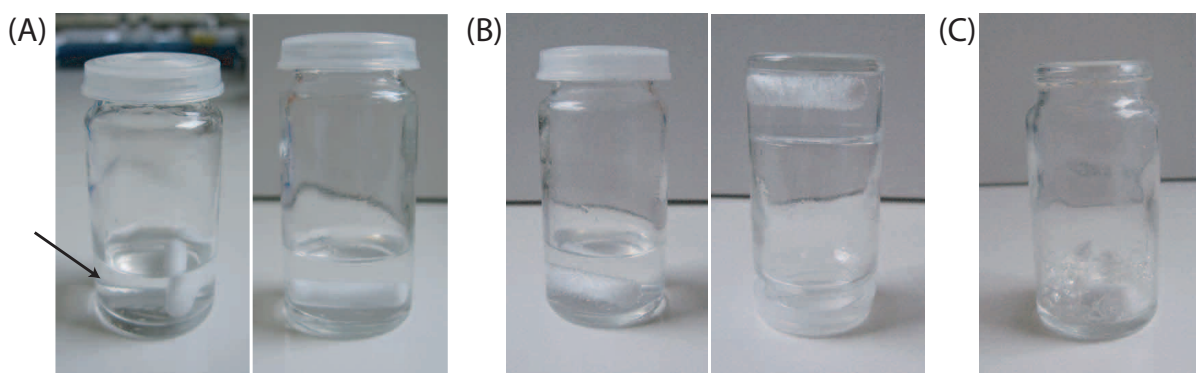


FIG. 3.2: Différentes étapes pendant le procédé Sol-Gel (A) Hydrolyse du TEOS. La flèche noire indique la séparation entre la phase aqueuse et le TEOS (B) Gélification de la solution (C) Séchage du gel. Le gel se fracture lors du séchage en formant des petits morceaux relativement souples.

Avant chauffage, le gel est constitué d'un réseau amorphe (voir Figure 3.4 p. 78 dans le chapitre suivant) dans lequel sont piégés les sels. Aucun pic de diffraction n'est observable par analyse aux rayons X. Le gel ne possède pas encore de propriétés de luminescence persistante. Seul le chauffage et la cristallisation du matériau peuvent engendrer une structure cristalline capable d'accueillir les défauts donnant les propriétés de luminescence persistante.

La cristallisation du matériau nécessite un chauffage à haute température. Cette étape est réalisée dans un four, les échantillons étant déposés dans des petits creusets en alumine (résistant aux hautes températures). Le chauffage est contrôlé par la température à laquelle le matériau est porté et le temps de maintien dans le four. Dans notre

cas, le four est programmé pour chauffer rapidement (+20°C/min) jusqu'à la température choisie (de 1000°C à 1200°C) pendant 10 heures sous une atmosphère réductrice formée de 90% d'argon et 10% d'hydrogène, ce qui permet la réduction de l'Eu³⁺ en Eu²⁺, nécessaire à la luminescence¹. Ensuite, la redescende à température ambiante se fait plus doucement (-10°C/min).

On obtient des cristaux blancs friables comme de la craie. Il est alors facile de les broyer à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate. On peut ensuite analyser leur luminescence et étudier leurs spectres d'émission.

La synthèse de ces matériaux est donc facile et peu coûteuse. La composition des matériaux choisis (silicates) offre également la possibilité de travailler sur l'état de surface des particules afin d'y associer différentes molécules.

3.1.2 Caractérisations de la luminescence

Spectres d'excitation et d'émission

Les spectres d'émission sont caractéristiques des transitions énergétiques qui se produisent après excitation. Dans ce mode, la longueur d'onde du faisceau incident est fixée (λ_{ex}). Elle est sélectionnée par un monochromateur dont l'élément dispersif est un réseau, dans le large spectre d'une lampe xénon, qui est continu et stable dans l'UV-visible et proche IR. Le rayonnement monochromatique est alors envoyé sur l'échantillon. Dans le cas où l'énergie reçue est capable de faire passer des électrons de l'échantillon dans un état excité, il y aura désactivation selon les phénomènes décrits précédemment et donc émissions de photons de longueur d'onde λ_{em} qui seront traduits sous forme de signal électrique par le détecteur. L'intensité de ces photons est faible et est donc amplifiée à l'aide d'un photomultiplicateur. Avant le détecteur, est positionné un autre monochromateur à réseau qui va permettre de balayer l'ensemble des longueurs d'onde d'émission choisies, en fonction de la position du réseau.

Les spectres d'émission nous permettent de savoir à quelles longueurs d'onde émettent les échantillons. Dans le mode "spectre d'excitation", c'est cette fois-ci la longueur d'onde d'émission qui est fixée et le monochromateur situé juste après la source balaie l'ensemble des longueurs d'onde d'excitation d'un intervalle choisi. L'intensité détectée sera plus ou moins importante selon la longueur d'onde d'excitation.

Pour réaliser les spectres d'émission et d'excitation des matériaux synthétisés, nous avons travaillé en mode "phosphorescence". Le principe d'acquisition des données reste identique, à l'exception du fait que l'acquisition ne démarre que quelques μ s à quelques ms après la fin de l'excitation (voir Figure 3.3). Ce mode d'acquisition se caractérise par plusieurs temps caractéristiques de l'expérience à savoir :

- le "delay time" (DLT) qui correspond à la durée entre le pulse de lumière excitatrice et le début de l'acquisition.
- le "gate time" (GT) correspondant à la durée d'intégration du signal,
- le "decay time" (DCT) qui correspond au temps laissé entre deux pulses d'excitation.

¹De plus, la formation de lacune d'oxygène (qui vont jouer le rôle de défauts et donc de pièges) favorisera la luminescence persistante.

L'acquisition des spectres d'émission et d'excitation a été effectuée à l'aide du spectromètre Cary Eclipse de Varian.

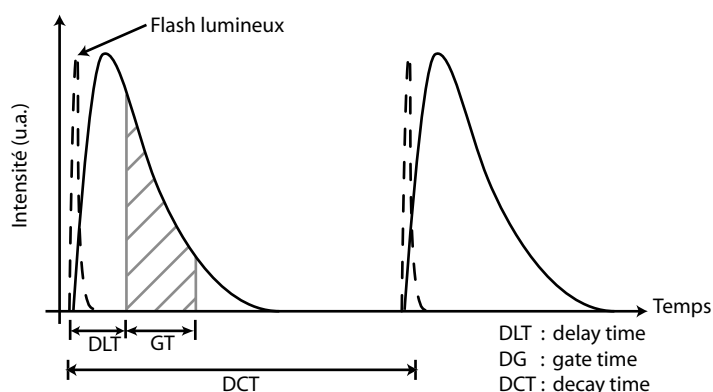


FIG. 3.3: Schéma du principe d'acquisition d'un spectre de phosphorescence.

Déclin de luminescence

Pour quantifier la luminescence persistante, nous avons utilisé la caméra Photon Imager de Biospace. Il est alors possible de suivre le déclin de luminescence pendant le temps désiré. Le mode de fonctionnement de la caméra (caméra CCD intensifiée) permet de suivre avec une bonne précision l'évolution du signal puisque l'intensité est relevée toutes les vingt-cinquièmes de seconde. Il est ainsi aisé d'obtenir le profil de décroissance aux temps longs des nanoparticules à l'aide de cet appareil. L'acquisition du signal dure en général de 30 min à 1h mais peut être suivie dans le cas des matériaux les plus performants pendant plus d'une semaine.

Pour évaluer la décroissance du signal au cours du temps pour les temps longs, 10 mg de matériau sont pesés et mis dans une plaque 96 puits (pour offrir la même surface d'exposition dans l'ensemble des expériences). L'échantillon est alors excité sous UV à l'aide d'une lampe aux vapeurs de mercure de laboratoire (6W). Les filtres sont enlevés pour permettre une excitation plus large (excitation sur l'ensemble des bandes du mercure soit 250, 310, 350, 400 nm).

3.2 Composés à luminescence persistante rouge/infrarouge

Dans ce chapitre, nous allons décrire trois matériaux de composition différentes (MgSiO_3 , $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ et $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$) marquant l'évolution des composés synthétisés au cours de ce travail. Chaque matériau présenté peut être utilisé pour des applications biologiques. Le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ ayant des propriétés optiques supérieures et une taille inférieure a toutefois été plus largement utilisé dans ce travail. Le détail de la synthèse est présenté en Annexe A.

3.2.1 MgSiO_3

Pour obtenir le matériau à luminescence persistante, il est nécessaire de le doper avec des ions luminescents. Nous avons utilisé le même triplet de dopants que celui utilisé par Wang et al. [79], à savoir le triplet Eu^{2+} Dy^{3+} , Mn^{2+} . Dans cet article, la luminescence persistante observée à 660 nm est attribuée à un transfert d'énergie vers le manganèse. Il est à noter que le maximum d'émission du manganèse peut varier selon son environnement. En effet, le champ cristallin influence directement l'émission du manganèse par action sur les orbitales 3d de cet ion.

Structure cristallographique

Pour l'acquisition des diagrammes de diffraction aux rayons X servant à analyser la structure cristalline des matériaux, nous avons utilisé un goniomètre Philips en configuration θ - 2θ avec comme source, un tube Rayons-X Cu 60 kV ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

La cristallisation du matériau est obtenue par chauffage à haute température. L'analyse préalable aux rayons X du gel avant cristallisation (voir Figure 3.4) ne révèle aucun pic de diffraction. Ce diagramme caractérise en effet une silice amorphe.

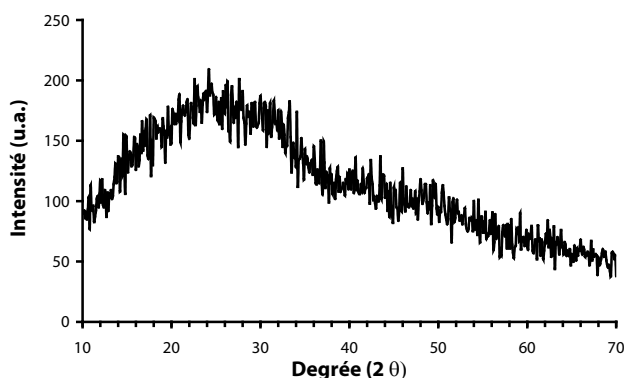


FIG. 3.4: Diagramme RX du gel MgSiO_3 . Aucune structure cristalline particulière n'est observée, hormis une bande large autour de 25° attribuée à un réseau de silice amorphe

Après chauffage à haute température, la structure cristalline du matériau MgSiO_3 synthétisé est complexe (voir Figure 3.5). L'analyse de ce diagramme montre qu'il s'agit d'un mélange entre plusieurs phases cristallines et plusieurs compositions. Il apparaît

en effet clairement qu'il s'agit d'un mélange de phase orthoenstatite et de clinoenstatite avec une quantité non négligeable de forstérite (Mg_2SiO_4).

Une augmentation de la température de synthèse n'a pas conduit à une amélioration de la structure cristalline qui comportait toujours un mélange phase, comme cela a déjà été observé par d'autres auteurs [115].

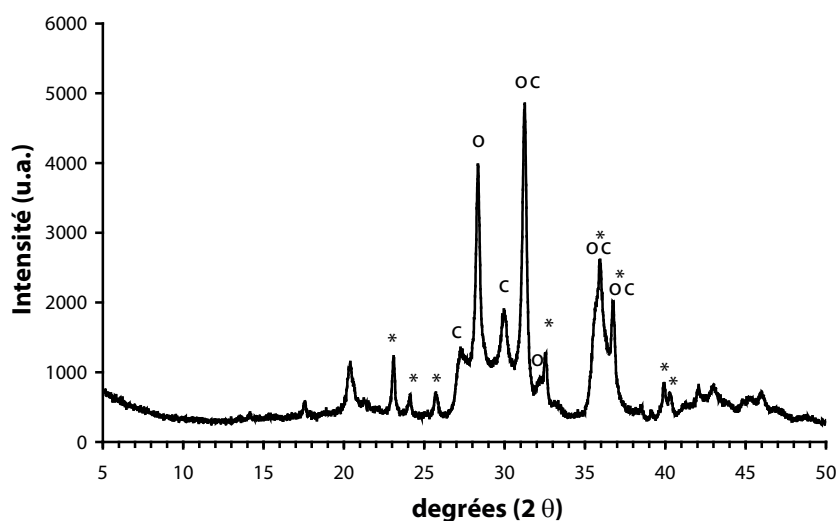


FIG. 3.5: Diagramme de diffraction aux rayons X du composé $MgSiO_3$. Plusieurs compositions sont présentes (Mg_2SiO_4 marqué par un astérisque). Plusieurs phases cristallines sont également présentes. clinoenstatite : c orthoenstatite : o

Spectres d'émission et d'excitation

La synthèse de ce composé par voie Sol-Gel nous a rapidement permis d'obtenir des résultats en terme de luminescence. Comme il est montré dans la Figure 3.6, la luminescence de ce composé est plus complexe que celui décrit dans la littérature avec aux temps courts la présence de trois bandes d'émission. En se plaçant à différents temps après la fin de l'excitation, le spectre d'émission varie. Peu de temps après la fin de l'excitation ($100\mu s$), il existe 3 bandes d'émission. La première possède un maximum autour de 480 nm, la deuxième à 580 nm et la troisième à 650 nm. Après quelques ms, la bande à 480 nm disparaît. À des temps plus longs (temps supérieur à 20 ms dans ce cas), seule la bande d'émission à 650 nm persiste. Ce phénomène de décroissance plus ou moins rapide des bandes situées à 480 nm et 580 nm a pu être observé dans un ensemble de matériaux comportant le triplet de dopants Eu^{2+} , Dy^{3+} et Mn^{2+} . Durant ce travail, nous n'avons pas étudié de façon précise les raisons de cette variabilité, mais il est probable qu'elle résulte de différences dans les transferts d'énergie.

Le fait que seule cette bande persiste au delà de 20 ms, montre que la luminescence persistante qui se produira pendant des temps beaucoup plus longs se fera à cette longueur d'onde. Ceci a pu être vérifié à l'aide de filtres en étudiant le déclin de luminescence. La luminescence persistante du composé se produira dans le rouge avec un maximum à 650 nm et correspond à la luminescence observée pour le matériau macro-

scopique décrit par Wang et al. même si la longueur d'onde d'émission est légèrement inférieure (650 nm contre 660 nm pour Wang et al.)

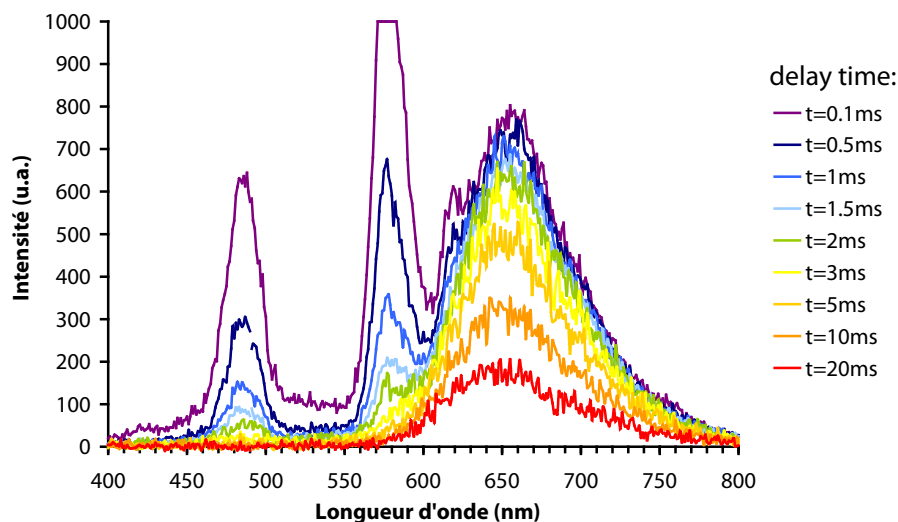


FIG. 3.6: Spectres d'émission MgSiO_3 dopé Eu^{2+} :0,5%, Dy^{3+} :1,5%, Mn^{2+} :1,0% (chauffage : 1100°C) à différents temps après la fin de l'excitation. Le "gate time", qui correspond au temps d'intégration du signal, est égale pour chaque spectre au "delay time".

Le spectre d'excitation du composé est donné dans la figure 3.7. On observe que les spectres d'excitation des bandes à 480 nm et 580 nm sont quasiment semblables tandis que le spectre d'excitation de la bande à 680 nm présente un épaulement autour de 400 nm et une autre bande d'excitation à 550 nm. Ces bandes sont caractéristiques du manganèse dans un environnement octaédrique.

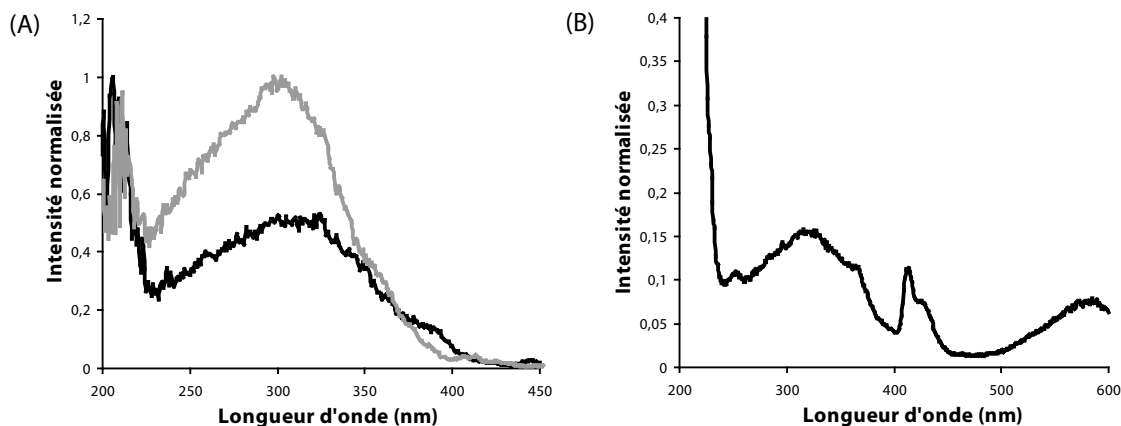


FIG. 3.7: Spectres d'excitation de MgSiO_3 dopé Eu^{2+} , Dy^{3+} , Mn^{2+} . (A) Spectre d'excitation de la bande 480 nm (en gris) et 580 nm (en noir) (B) Spectre d'excitation de la bande à 680nm.

Attribution des bandes d'émission et d'excitation

Même si ce n'est pas un point crucial pour l'application recherchée, il est important d'attribuer les autres bandes de luminescence observables aux temps courts.

Cette étude a été réalisée sur le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ décrit par la suite, mais les conclusions obtenues peuvent être extrapolées à MgSiO_3 , les mécanismes de luminescence étant identiques.

Le spectre d'émission du composé dopé simplement au Mn^{2+} possède une bande d'émission comme attendu autour de 650 nm. Ainsi la bande d'émission qui caractérisera la luminescence persistante à 650 nm est bien due au manganèse. Le spectre d'excitation est quant à lui caractéristique de la présence de manganèse avec l'ensemble des transitions de cet ion facilement distinguable. On notera la présence d'une forte bande d'excitation autour de 220 nm correspondant à un transfert de charge avec l'oxygène.

Il est assez clair que l'émission large observée à 480 nm était due à l'euprium sous sa forme divalente². En effet, dans de nombreux matériaux, cet ion possède une fluorescence importante dans cette région entre 400 et 550 nm. L'émission de l'euprium divalent est due à une transition entre le niveau 5d et son état fondamental. À l'inverse des niveaux électroniques observés dans les terres rares trivalentes, le niveau 5d de l' Eu^{2+} est très sensible au champ cristallin, expliquant ainsi les variations d'émission observées. La bande à 580 nm était plus inhabituelle et a tout d'abord été attribuée au dysprosium qui possède un bande d'émission dans cette zone.

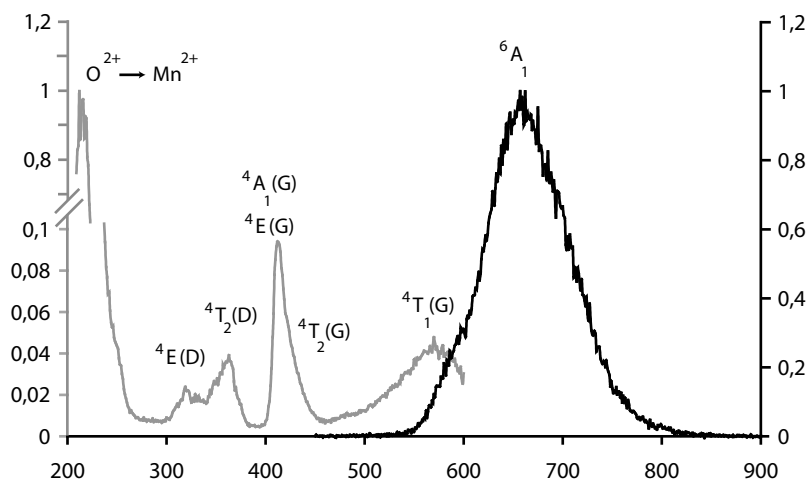


FIG. 3.8: Spectres d'excitation et d'émission de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Mn}^{2+}$.

Pour nous assurer de cela, nous avons synthétisé les composés ne comportant que de l'euprium ou que du dysprosium. Comme décrit dans la figure 3.9 et 3.10, le spectre de ces deux composés présente deux bandes d'émission autour de 480 nm et 580 nm. En comparant ces deux spectres d'émission, on observe toutefois que celui associé à

²Pour rappel, les ions euprium sont introduits dans la matrice sous leur forme trivalente. Le chauffage sous atmosphère réductrice permet de réduire l'euprium sous sa forme divalente. On peut s'assurer de cela, par la disparition des bandes d'émission de Eu^{3+} (notamment des bandes fines à 610 nm).

l'euporium possède des bandes plus larges alors que celui associé au dysprosium présente des bandes relativement fines. Les bandes d'émission observées sur le composé tridopé étant également large nous amène à penser que la bande à 580 nm est due à l'euporium.

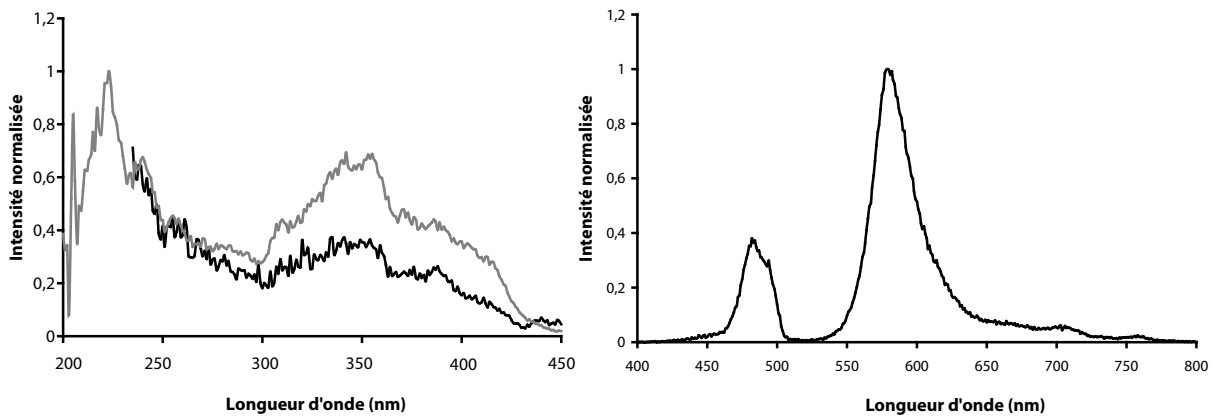


FIG. 3.9: Spectres d'excitation (en gris : spectre d'excitation de la bande à 480 nm, en noir : spectre d'excitation de la bande à 580 nm) et d'émission de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu}^{2+}$

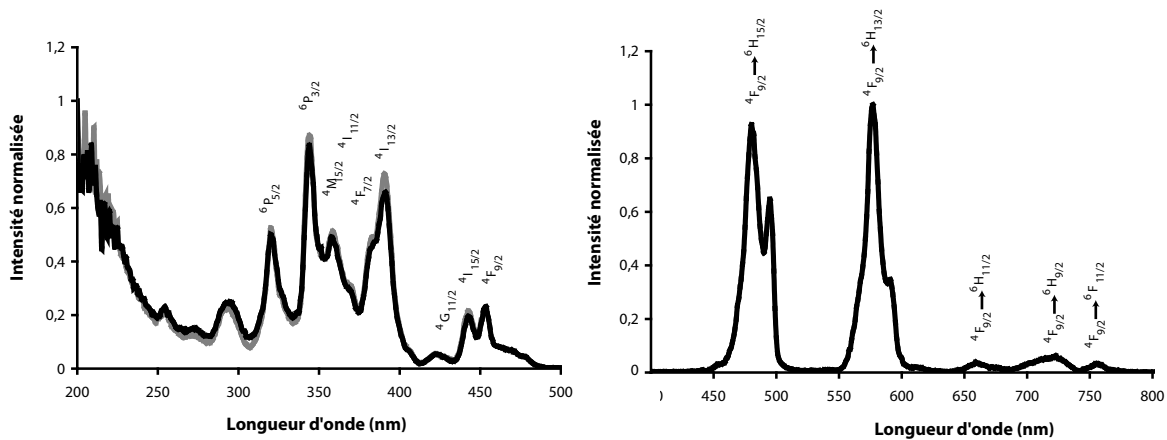


FIG. 3.10: Spectres d'excitation (en gris : spectre d'excitation de la bande à 480 nm, en noir : spectre d'excitation de la bande à 580 nm) et d'émission de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Dy}^{3+}$

Le spectre d'excitation nous a permis de trancher dans l'attribution des spectres. Dans le composé dopé uniquement Eu^{2+} , on voit que le spectre d'excitation est très large en UV. Il est identique à celui observé pour le composé tridopé. Le spectre du composé dopé Dy^{3+} , comporte quant à lui des bandes très fines d'excitation caractéristiques des terres rares trivalentes. L'attribution des bandes d'émission et d'excitation du dysprosium est simple car l'émission de cet ion est très peu dépendante du champ cristallin. Ces bandes très fines observées sur le spectre d'excitation ne se retrouvant pas dans le composé tridopé, les bandes d'émission à 480 nm et à 580 nm peuvent être attribuées à une émission de l'euporium.

Ces deux bandes d'émission pourraient donc caractériser deux environnements chimiques différents de l'euporium (comme par exemple les sites M1 et M2 décrits dans la présentation des pyroxènes, voir p.61). Il est également possible que la bande se situant à 580 nm soit associée à un défaut lié à l'euporium et non à l'euporium lui-même. Une étude plus approfondie, notamment par analyse RPE (Electron Paramagnetic Resonance), permettrait certainement de répondre à cette question.

Évolution du spectre d'excitation en fonction du temps

Cette étude a également été réalisée sur le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$. Comme nous l'avons vu, le spectre d'excitation du composé tridopé possède un épaulement autour de 400 nm et une bande à 575 nm pour une émission à 650 nm. Ces bandes correspondent à l'excitation du Mn^{2+} . Lorsqu'on augmente le délai pour le spectre d'excitation, on observe une diminution de ces bandes ainsi que celle à 220 nm.

Au temps cours, il est possible d'exciter directement les bandes du manganèse. Provenant de transitions interdites (transitions d-d), la fluorescence de cet ion est relativement longue. À des temps supérieurs, le phénomène de luminescence persistante devient prédominant et ces bandes d'excitation disparaissent.

Ainsi l'origine de la luminescence persistante provient bien d'un peuplement de défauts par l'intermédiaire de l'euporium. Seule une excitation UV et proche UV permet d'obtenir une luminescence de longue durée.

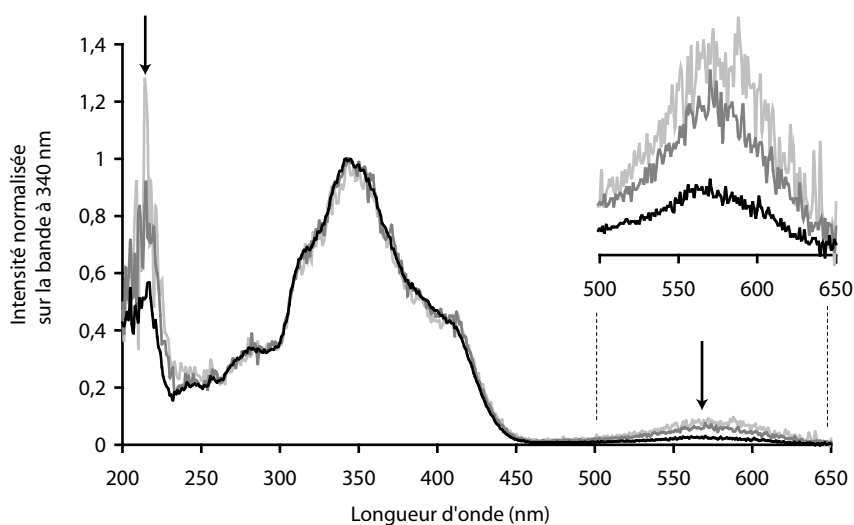


FIG. 3.11: Evolution du spectre d'excitation de la bande du manganèse dans le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$ au cours du temps (en gris clair : delay = 1 ms, en gris foncé : delay = 10 ms, en noir : delay = 100 ms. On note la disparition progressive des bandes d'excitation directes du manganèse.

Taille des particules

Pour déterminer la taille moyenne des particules synthétisées, nous avons réalisé une analyse par diffusion quasi-élastique de la lumière sur une suspension de particules. Lors des premières synthèses, les particules étaient extrêmement polydisperses empêchant

toute mesure réaliste. Les suspensions n'étaient pas stables avec une sédimentation rapide de la majorité des particules.

Pour effectuer les premières mesures de taille et savoir si l'échantillon contenait des nanoparticules, nous avons filtré la suspension sur un filtre ayant des pores de quelques dixièmes de microns (filtre $0,45 \mu\text{m}$ Whatmann).

Après filtration, la suspension est relativement stable. Comme on peut le voir sur la figure 3.12, la suspension testée comportait des particules ayant une taille de l'ordre de 200-300 nm mais en très faible quantité. Cette taille, bien qu'importante, nous a permis de montrer que la synthèse de nanoparticules était envisageable tout en gardant le phénomène de luminescence persistante.

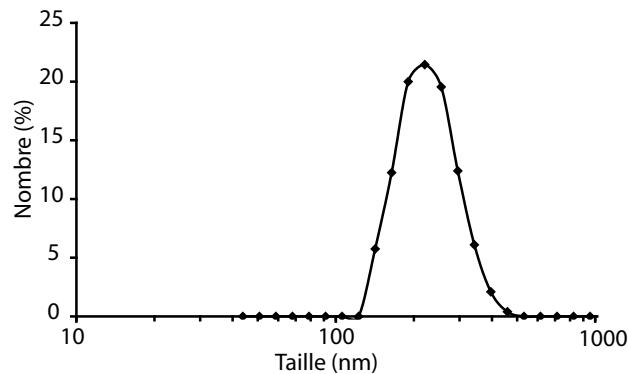


FIG. 3.12: Taille des particules mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière après filtration sur filtre $0,45 \mu\text{m}$

Déclin de luminescence et optimisation

Lors de l'acquisition du signal, un filtre coupant les longueurs d'onde inférieures à 590 nm est utilisé pour éviter tout signal parasite. La décroissance du signal est typique de ce genre de matériau avec une décroissance rapide au départ (dans les premières minutes) puis une décroissance qui s'atténue. Les mesures présentées sont des intégrations du signal sur 5s. Si on se place en échelle log-log, le déclin de luminescence s'apparente au temps long à une droite, montrant le caractère hyperbolique ($I \approx I_0 \times t^{-n}$, $n \in \mathbb{R}$) du déclin au temps long. Pour le composé MgSiO_3 , comme pour les autres matériaux, on trouve que n varie de 0,9 à 1,2. Pour ce composé, n vaut environ 1,1 (voir Figure 3.13).

Les déclins de luminescence ont également été réalisés sur les composés dopés partiellement (non dopé, Eu seul, Mn seul...). Les luminescences obtenues sont non nulles mais environ 20 fois plus faible que le composé tridopé (le chauffage sous atmosphère réductrice crée des défauts qui sont capables de stocker de l'énergie). Ceci montre l'importance des trois dopants pour contrôler le spectre d'émission et augmenter la durée de luminescence.

L'optimisation de la luminescence a porté sur l'évolution de la luminescence observée à 10 min selon la concentration d'euporium et de manganèse à concentration en Dysprosium constante. Les proportions initiales étaient de : Eu^{2+} :0,5 %, Dy^{3+} :1,5 %, Mn^{2+} :1,0 %. Pour Eu^{2+} et Mn^{2+} , 4 pourcentages ont été choisis a priori. Le résultat de cette optimisation est présenté à la figure 3.14.

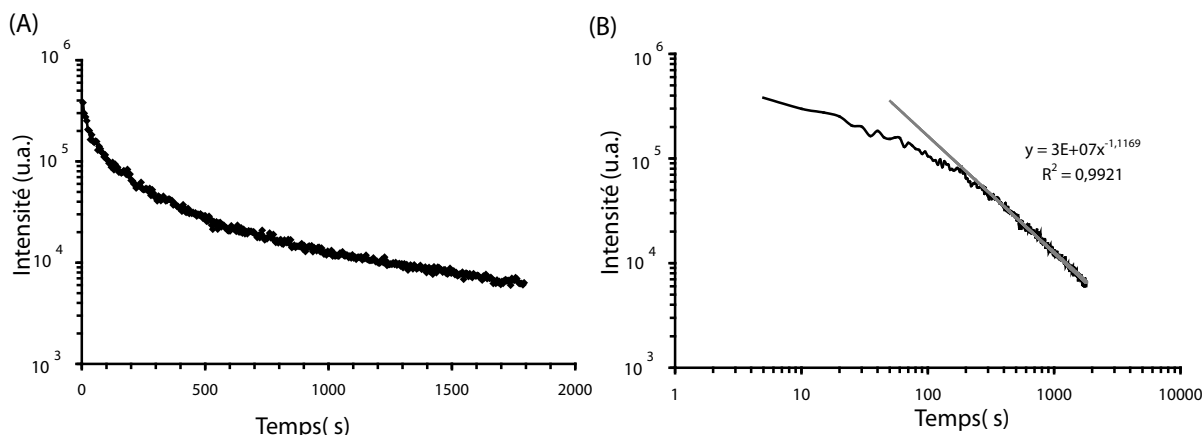


FIG. 3.13: Intensité lumineuse obtenue en fonction du temps pour le composé MgSiO_3 dopé Eu^{2+} , Dy^{2+} , Mn^{2+} .

On observe qu'il existe des différences importantes de luminescence puisqu'il y a un facteur supérieur à 5 entre le plus luminescent et le moins luminescent. Il est toutefois difficile de conclure sur une tendance. De nombreuses raisons peuvent expliquer la variabilité des résultats, notamment la variation de phase cristalline qui n'était pas contrôlée et le manque de reproductibilité des synthèses lors de cette optimisation (notamment à cause d'un mauvais contrôle du flux de gaz lors du chauffage).

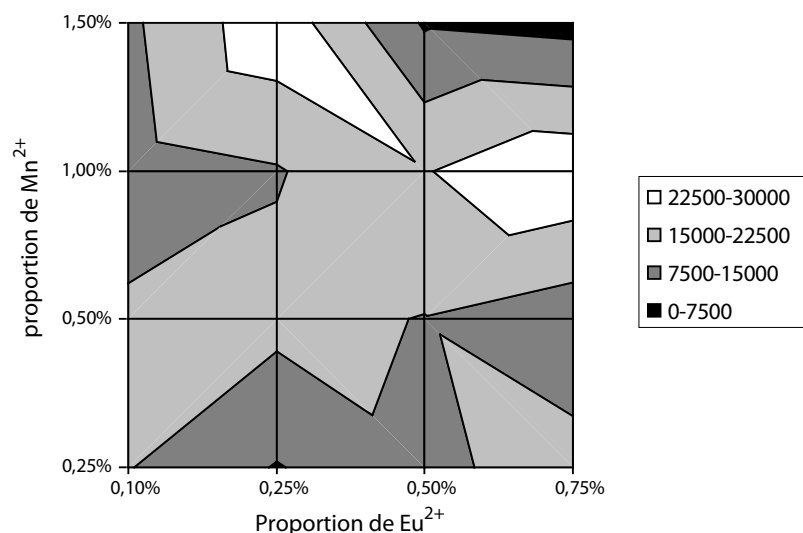


FIG. 3.14: Niveau de luminescence à 10 min de MgSiO_3 en fonction de la proportion d'euprium et de manganèse (Dy^{3+} :1,5%).

Conclusion sur le composé MgSiO_3

La synthèse de MgSiO_3 donnait des résultats prometteurs en terme de luminescence avec une luminescence prolongée dans le rouge et une taille de particules qui devenait acceptable pour des applications biologiques (taille $<1 \mu\text{m}$). Deux points restaient toutefois problématiques. Le premier était lié à la structure cristallographique

du composé. En effet, le matériau était constitué d'un mélange de deux compositions, la forstérite Mg_2SiO_4 et l'enstatite MgSiO_3 sous deux formes cristallines protoenstatite et orthoenstatite. Le deuxième point était la taille des particules formées, qui se trouvaient entre 100 et 300 nm. La volonté d'obtenir des composées ayant d'autres longueurs d'onde d'émission et de mieux comprendre les mécanismes de transfert d'énergie nous a poussé vers d'autres compositions.

3.2.2 $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$

Le zinc est très proche du magnésium au niveau atomistique. Son rayon ionique est légèrement plus petit que celui du manganèse en ayant une électronégativité supérieure. Le zinc ne possède pas de propriété intrinsèque de fluorescence, sa couche 3d étant complètement remplie. Le zinc peut donc être retenu pour remplacer le magnésium. Nous espérons que l'ajout de zinc permettrait de modifier la luminescence du manganèse. En effet, étant plus petit et plus électronégatif, les atomes d'oxygène auraient tendance à se rapprocher, affaiblissant ainsi le champ cristallin d'un ion Mn^{2+} voisin. Le champ cristallin étant plus faible, l'éclatement des orbitales du manganèse serait plus faible et le spectre d'émission devrait être déplacé vers l'infrarouge. D'autre part, il a été montré que le zinc se place préférentiellement dans le site M2 des pyroxènes [116]. Un déplacement préférentiel du Mn^{2+} dans le site M1 plus lâche (Distance M-O en moyenne de 2,195 Å pour M2 et 2,091 Å pour M1) devrait également influencer le spectre d'émission.

Structure cristalline

La structure cristalline de ce composé est également un mélange de deux phases cristallines clinopyroxène et orthopyroxène (voir Figure 3.15 (A)).

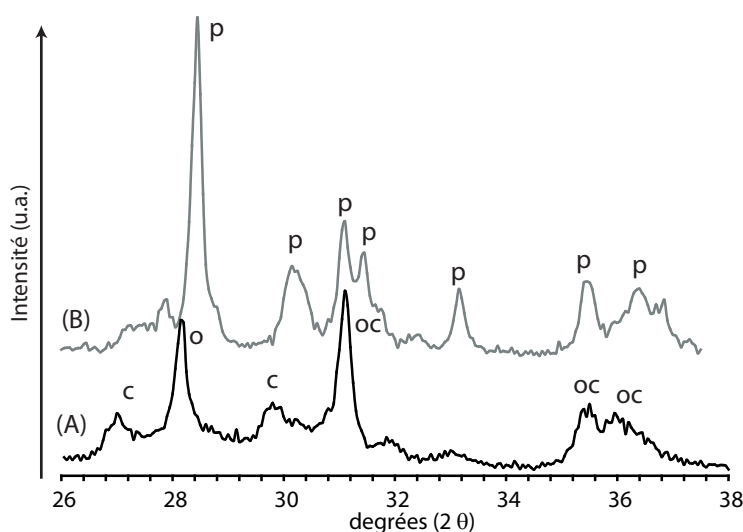


FIG. 3.15: Effet de la température de traitement thermique sur la structure cristallographique de $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ (A) 1100°C (B) 1150°C (o : orthopyroxène, c : clinopyroxène, p : protopyroxène)

Nous n'avons pas noté la présence de composés de type M_2SiO_4 ($M=Mg$ ou Zn) pour cette composition. Après chauffage à $1150^\circ C$, le composé se trouve principalement sous sa forme protoenstatite. Nous avons toutefois préféré travailler à plus basse température pour éviter l'augmentation de la taille des particules.

Spectre d'excitation et d'émission

Les spectres d'émission et d'excitation de ce composé sont donnés Figure 3.16. La bande d'émission du manganèse est comme attendu déplacée vers le rouge profond même si la différence n'est pas très importante, le maximum se situant à 670 nm au lieu de 650 nm pour $MgSiO_3$.

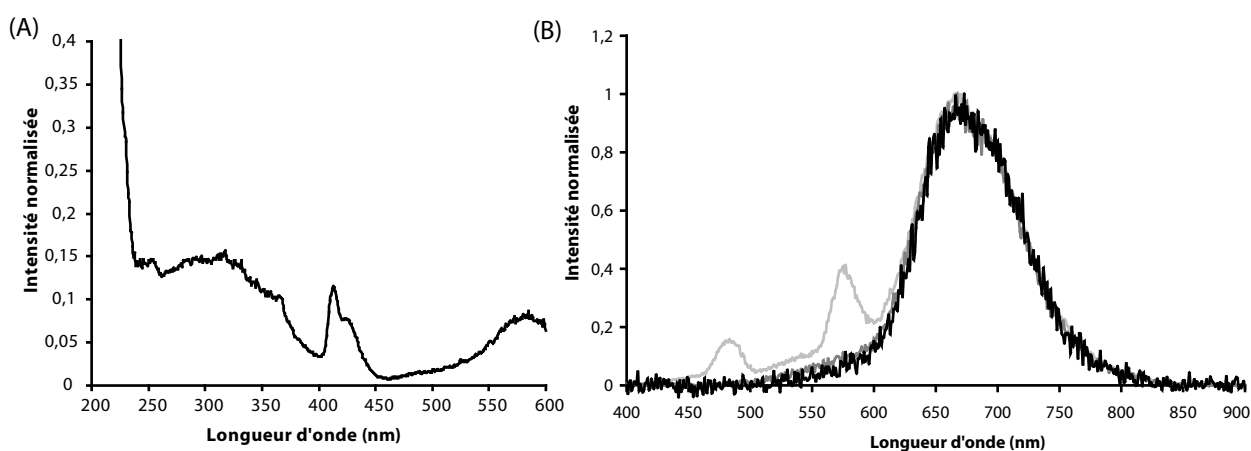


FIG. 3.16: (A) Spectre d'excitation de la bande du manganèse dans le composé $ZnMgSi_2O_6$ tridopé. (B) évolution du spectre d'émission en fonction du temps (en gris clair, delay=1 ms, en gris foncé, delay=10ms, en noir delay=100 ms)

Taille

En comparaison des particules de composition $MgSiO_3$ synthétisées, la taille des particules $ZnMgSi_2O_6$ est plus petite avec la présence de particules de taille inférieure à 100 nm lorsque la température de synthèse est de $1100^\circ C$ (voir Figure 3.17). Les particules issues d'une synthèse à $1150^\circ C$ sont notablement plus grosses.

Lors de la synthèse de $ZnMgSi_2O_6$ à partir d'ions chlorure pour le zinc et d'ion nitrate pour le magnésium, nous avons observé que la texture du gel était différente et que le matériau après chauffage haute température était plus friable. Or le composé $MgSiO_3$ avait toujours été synthétisé avec du nitrate de magnésium. Ceci nous a conduit à étudier l'effet des contre-ions notamment sur la texture du gel obtenu. Cette étude présentée en Annexe C montre des différences physico-chimiques au niveau du gel pouvant expliquer la différence de taille des particules.

Optimisation de la luminescence

Les propriétés de luminescence de ce composé sont plus élevées. L'optimisation de ce composé (voir figure 3.18) nous a permis de voir que dans la gamme choisie, la concentration d'euprium n'avait que peu d'influence sur la luminescence. En revanche, une

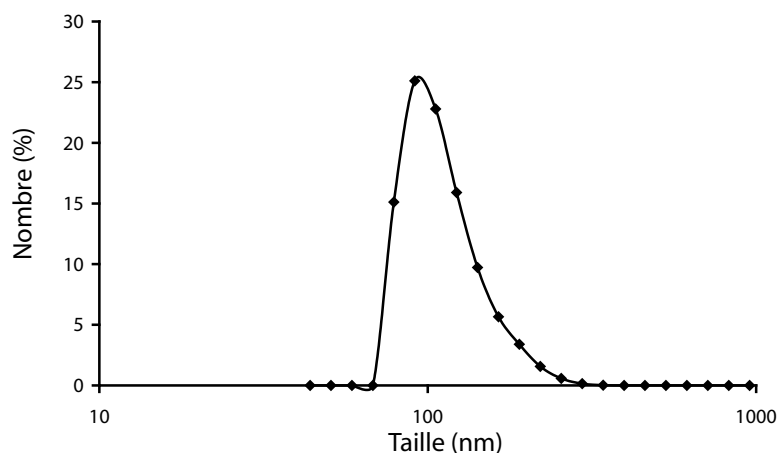


FIG. 3.17: Taille des particules de $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière après filtration sur filtre $0,45 \mu\text{m}$.

augmentation de la concentration en manganèse permet d'augmenter significativement la luminescence de ce composé. Nous nous sommes limités à 1,5 % en concentration maximum pour le manganèse. Il apparaît que ce choix n'était pas judicieux au vu des résultats. Une amélioration de la luminescence est donc encore envisageable pour ce composé par augmentation du taux de dopage au Mn^{2+} .

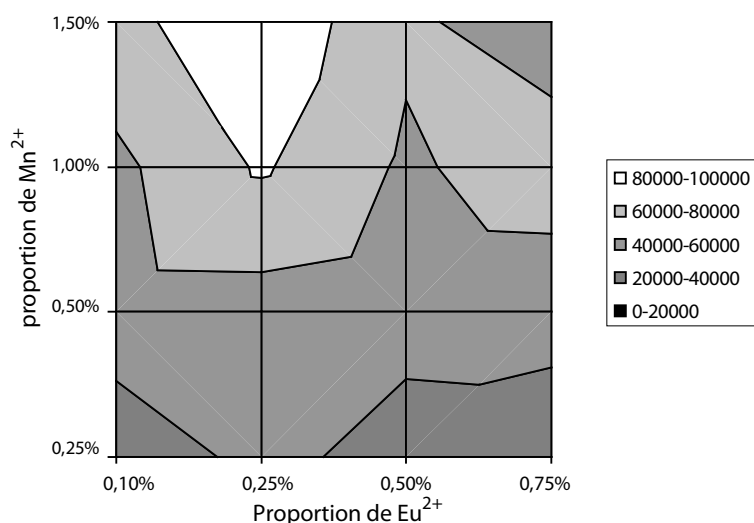


FIG. 3.18: Optimisation de la luminescence à 10 min de $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ en fonction de la proportion d'europium et de manganèse.

3.2.3 $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$

Nous avons vu qu'il était possible d'obtenir une phase protoenstatite avec le composé $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ en chauffant le matériau à $1150 \text{ }^\circ\text{C}$, un mélange ortho-clino étant obtenu dans les autres cas. Nous voulions obtenir une phase unique de type clinopyroxène.

Nous avons vu dans la partie introductive sur les silicates (voir chapitre 2.2.2) que l'addition de 25% de calcium permettait d'obtenir un mélange diopside-enstatite

cristallisant dans une forme clinopyroxène. Nous avons décidé de poursuivre l'évolution du matériau $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$ en incorporant une quantité croissante de calcium.

La recherche de cette phase avait deux intérêts. La première était de pouvoir comparer les différentes phases cristallines selon leur capacité à avoir une luminescence prolongée. La deuxième concernait la taille des particules. Nous avons pu observer sur les différents composés qu'une diminution de la température de synthèse allait de pair avec une diminution de la taille des particules. Malheureusement, nous observions également une diminution de la luminescence due certainement à une moins bonne cristallisation. En choisissant une phase cristalline thermodynamiquement stable à basse température, nous envisageons donc de pouvoir baisser la température de synthèse tout en gardant des propriétés fortes de luminescence.

Structure cristalline

Pour les composés $\text{Ca}_{2x}\text{Mg}_{1-x}\text{Zn}_{1-x}\text{Si}_2\text{O}_6$, l'évolution des diagrammes de diffraction des rayons X est particulièrement intéressante (voir Figure 3.19). L'addition de 2,5% de calcium suffit à transformer un mélange de phases ortho-clinoenstatite en une phase clinopyroxène C2/c, une augmentation de la concentration en calcium améliorant encore ce phénomène. Une quantité de 2,5% peut être considérée comme un dopage. On voit ainsi que de très faible modification de la composition des matériaux peuvent avoir une influence importante sur la structure cristalline.

Il est à noter que cette phase cristalline est conservée à plus basse température. Nous avons donc choisi de réaliser les synthèses à 1050 °C. Il pourrait être intéressant de déterminer la température minimum à laquelle cette phase est obtenue. Nous n'avons pas eu le temps d'effectuer ce travail.

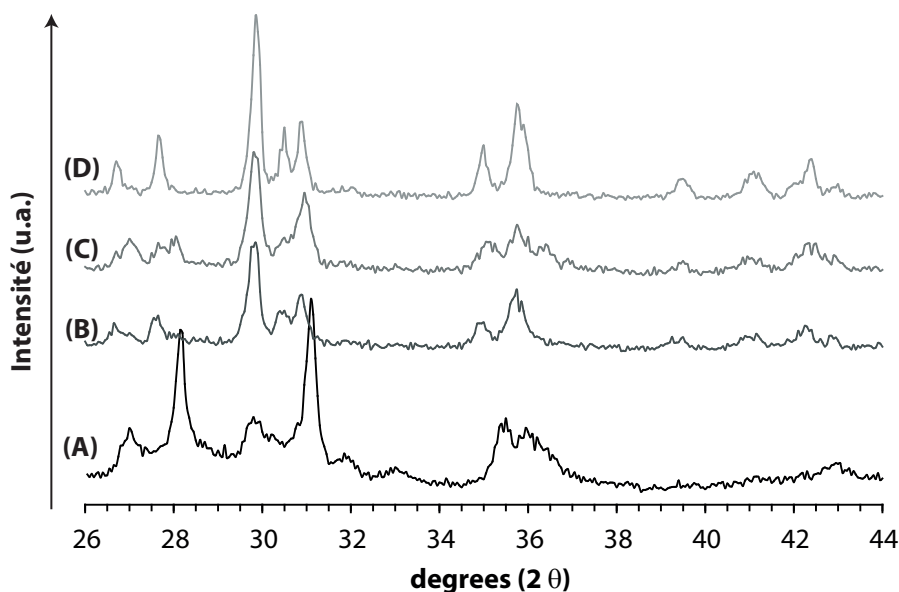


FIG. 3.19: Effet de la proportion de calcium sur la structure cristalline de $\text{Ca}_{2x}\text{Mg}_{1-x}\text{Zn}_{1-x}\text{Si}_2\text{O}_6$ chauffé à 1050 °C (A) $x=0$ (B) $x=0,025$ (C) $x=0,05$ (D) $x=0,1$

Spectre de luminescence

Les spectres d'excitation et d'émission décrits à la Figure 3.20 sont semblables à ceux obtenus avec les autres composés, le maximum de l'émission se situant cette fois-ci autour de 690 nm. Il est également à noter que la disparition de la bande à 580 nm est beaucoup plus lente. Il faut en effet attendre environ 200 ms après la fin de l'excitation pour obtenir un spectre d'émission ne présentant que la bande du manganèse.

Le spectre d'excitation, même s'il conserve les mêmes caractéristiques que pour les deux autres composés, se caractérise proportionnellement par une diminution de la bande de transfert de charge O-Mn²⁺ et des bandes d'excitation directes du Mn²⁺, au profit de la bande se situant autour de 350 nm. Ceci est un indice d'un meilleur transfert d'énergie vers le manganèse.

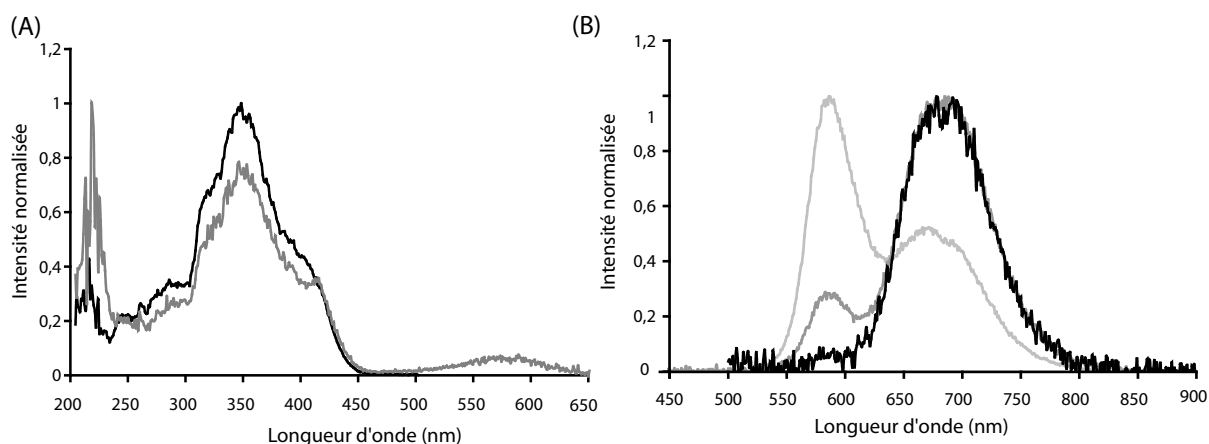


FIG. 3.20: Spectre d'émission du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ tridopé en fonction du temps (en gris clair : delay=1ms, en gris foncé : delay=10ms, en noir : delay=100ms).

D'autre part, on observe une forte fluorescence du composé tri-dopé (voir Figure 3.21). Cette fluorescence est bien plus importante que celle observée pour les autres compositions où une très faible fluorescence (jaune ou rouge) était obtenue.

Taille

Grâce à la diminution de la température de chauffage, la taille des particules a pu être notablement diminuée. Par analyse de diffusion de lumière, les particules possèdent une taille comprise entre 50 et 100 nm (voir Figure 3.22 (A)). Par microscopie électronique, on observe que les particules ont une forme d'altères avec des coeurs denses enrobés d'un réseau qui semble plus lâche (voir Figure 3.22 (B)).

Optimisation de la luminescence

Déclin de luminescence Nous avons recherché à optimiser la luminescence de ce composé en jouant sur les proportions des différents dopants. Ces variations de quelques % des dopants va en effet avoir un effet notable sur le déclin de luminescence, une proportion inadéquate de dopants pouvant faire perdre 90 % de la luminescence. Pour

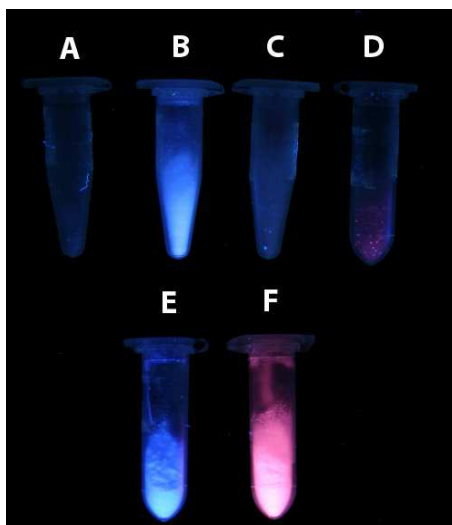


FIG. 3.21: Fluorescence du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ avec différents dopants (A) non dopé (B) Eu^{2+} :0,5% (C) Dy^{3+} :1,5% (D) Mn^{2+} :2,5% (E) Eu^{2+} :0,5% ; Dy^{3+} :1,5% (F) Eu^{2+} :0,5% ; Dy^{3+} :1,5% ; Mn^{2+} :2,5% - excitation : 312 nm

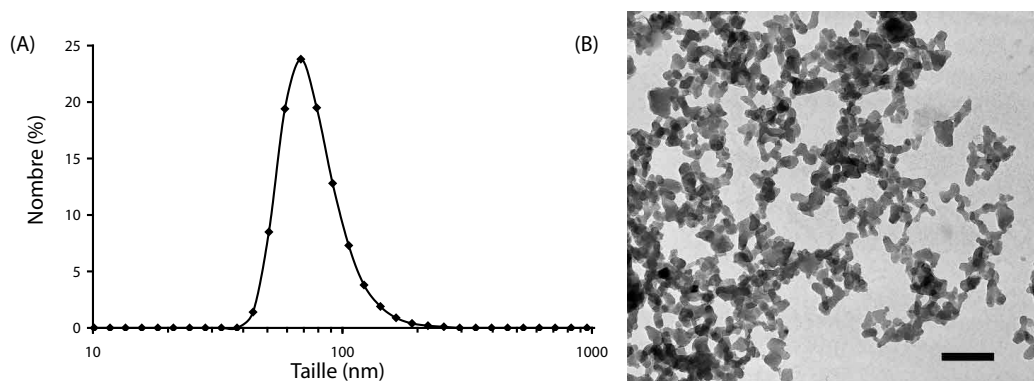


FIG. 3.22: (A) Taille des particules $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ obtenue par diffusion quasi-élastique de la lumière après sédimentation ($3400 \times g$, 15 min). (B) Image de microscopie électronique des particules, montrant une assez bonne homogénéité des particules - échelle : 200nm. Les agrégats qui sont visibles sur cette image sont dûs à la technique de dépôt des particules qui entraîne leur floculation.

cette série de composé, $I \approx I_0 \times t^{0,95}$ au temps longs. La décroissance étant moins rapide, la luminescence persistante peut être observée sur un temps supérieur.

La figure 3.23 montre quelques évolutions que nous avons pu noter. Il apparaît alors que pour maximiser la luminescence, une quantité limitée d'euporium et de dysprosium sont nécessaires. Il existe de plus un optimum pour le manganèse avec un pourcentage autour de 2,5-3 %.

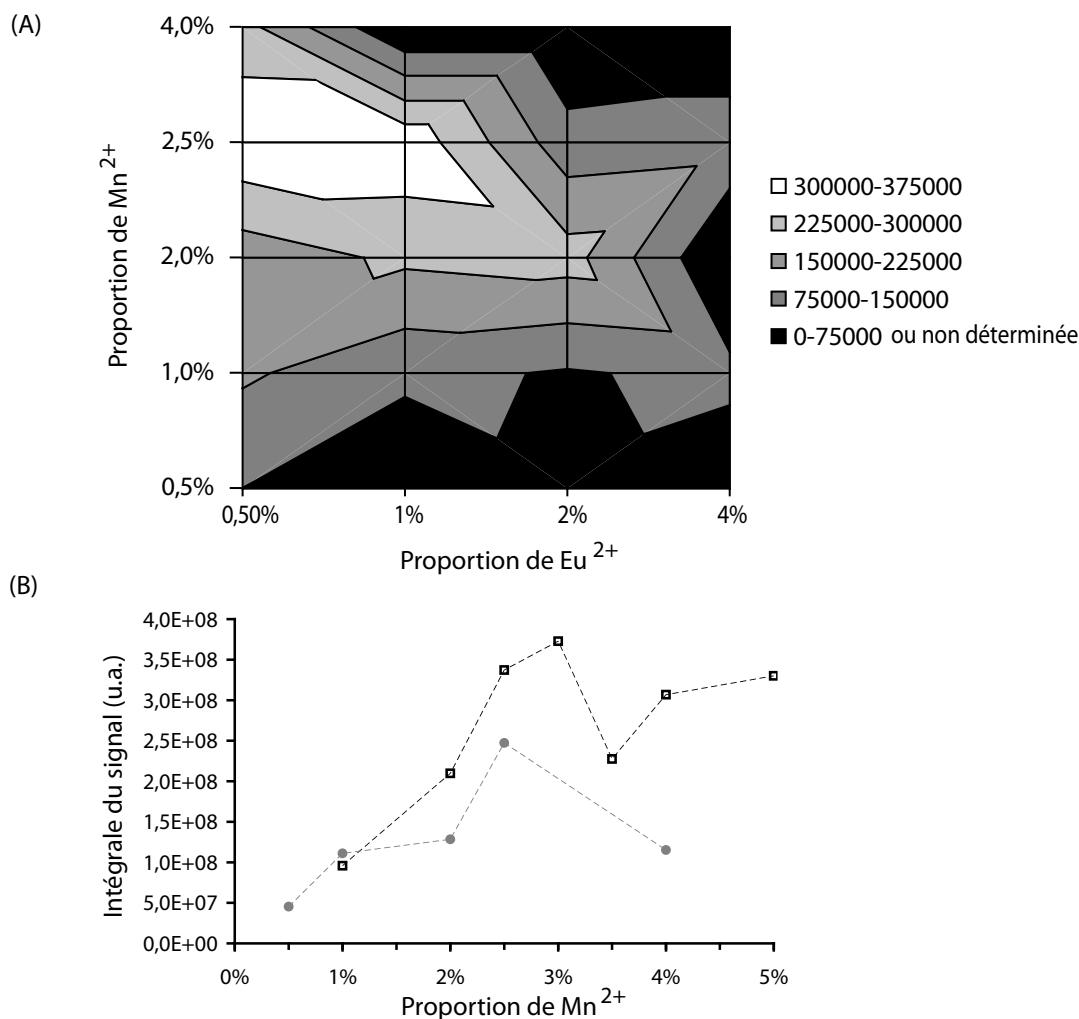


FIG. 3.23: Optimisation de la luminescence du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ tridopé (A) évolution de l'intensité lumineuse à 10 min en fonction de la proportion de manganèse et d'euporium ($\text{Dy}^{3+}=1,5\%$) (B) évolution de l'intensité lumineuse à 10 min en fonction de la proportion de manganèse et de dysprosium pour 0,5% Eu^{2+} . En gris, $\text{Dy}^{3+}=1,5\%$, en pointillé, $\text{Dy}^{3+}=1,0\%$

Fluorescence des composées En faisant varier les proportions de dopants, nous avons pu mettre en évidence des transferts d'énergie dans la matrice (voir Figure 3.24). En effet en augmentant progressivement la proportion de manganèse, on voit que la bande à 690 nm (celle du manganèse) est de plus en plus importante en comparaison

des deux autres bandes. On notera également un transfert entre la bande à 480 vers la bande à 580 nm.

En fluorescence (excitation à 312 nm), on note le passage d'une matrice de couleur violette, à une couleur rose ou orange. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que l'ensemble de ces composés vont émettre au final à la même longueur d'onde : celle du manganèse à 690 nm.

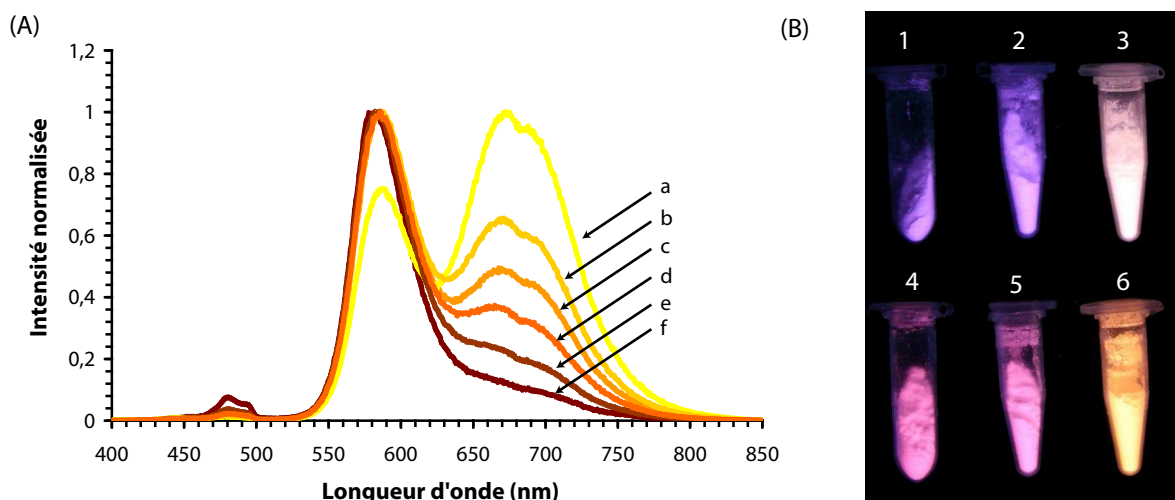


FIG. 3.24: (A) Effet de la proportion de manganèse sur le spectre de luminescence du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ dopé Eu^{2+} (0,5%) ; Dy^{3+} (1,0%) Mn^{2+} à 0,1 ms. Proportion de Mn^{2+} (a) 1,0% (b) 2,0% (c) 2,5% (d) 3,0% (d) 3,5% (e) 4,0% (f) 5,0% (B) Couleur de fluorescence du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Mg}_{0,9}\text{Zn}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ dopé Eu^{2+} , Dy^{3+} , Mn^{2+} selon la concentration des dopants Dy^{3+} : 1,5% et (Eu;Mn)(1) 0,5% ; 0,5%(2) 2,0% ; 0,5%(3) 4% ; 0,5% (4) 0,5% ; 2,5%(5) 2,0% ; 2,5%(6) 4% ; 2,5% - excitation : 312 nm

Vers des particules plus petites : rognage des particules

Une expérience a été menée pour réduire la taille des particules et connaître leur résistance chimique. Comme on peut le voir sur les images en microscopie électronique, les particules ont des formes variées. Toutefois, on note la présence importante de particules sous forme d'altères comme si deux particules étaient liées par un matériau moins dense (le contraste étant moins élevé à ces endroits là) que nous attribuons à un enrobage de silice.

Une quantité de nanoparticules a donc été mise en suspension dans des milieux très basiques (NaOH 6M) ou très acides (HCl 6M) pendant plusieurs jours. Au pH basique, la silice se dissout en silicates. En milieu acide, ce phénomène n'est pas observé.

En microscopie électronique, on observe clairement une différence entre le traitement basique et le traitement acide. Lors de l'attaque acide, aucun changement morphologique des particules n'a été observé. En milieu fortement basique, on note la disparition de la coque de silice et l'individualisation de particules plus sphériques ayant une taille allant de 25 à 40 nm (voir Figure 3.25).

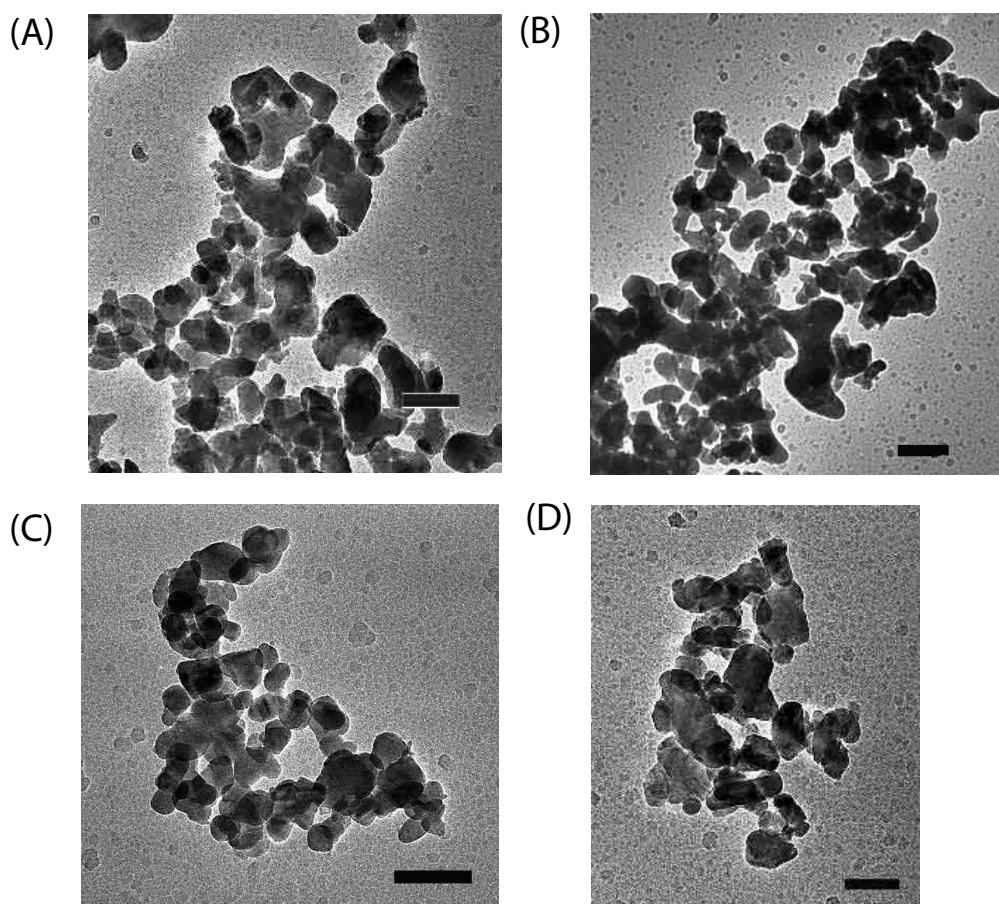


FIG. 3.25: Images en microscopie électronique de nanoparticules après traitement chimique (A) aucun traitement (B) traitement acide (HCL 6M pendant 1j) (C-D) traitement basique (NaOH 6M pendant 1j) - échelle : 100nm

Malgré ces traitements, la luminescence est conservée. En effet, la mesure de l'intensité de luminescence persistante entre particules n'ayant subi aucun traitement, particules soumises à un milieu acide ou particules soumises à un milieu basique a donné des résultats identiques comme le montre la figure 3.26. Ces traitements chimiques sont donc un moyen de réduire la taille des particules et d'homogénéiser la forme des particules. Cette stratégie prometteuse reste donc à explorer plus précisément.

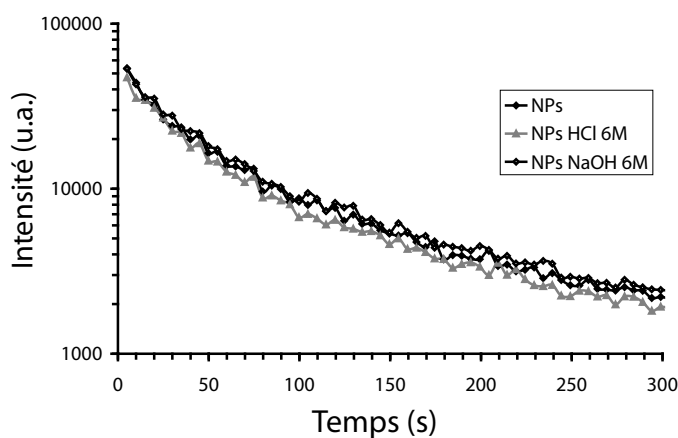


FIG. 3.26: Comparaison de la luminescence des nanoparticules ayant subi un traitement chimique acido-basique.

Conclusion sur la synthèse de nanoparticules

Évolution des spectres d'émission

De nombreux composés ont été synthétisés durant ce travail. L'évolution de la composition des matériaux nous a permis de déplacer progressivement le spectre d'émission des particules vers l'infrarouge (voir Figure 3.27). Ceci a pour effet de permettre une meilleure adéquation entre spectre d'émission et fenêtre de transparence des tissus. Les propriétés d'émission pourraient certainement encore être améliorées. Cela nécessiterait sans doute de changer de composition pour les matériaux. Comme nous l'avons vu, ce travail a porté uniquement sur des matériaux de type silicates. De nombreux autres matériaux peuvent être envisagés (section 2.1.1 p.53).

Une évolution plus importante pourrait porter sur le spectre d'excitation des matériaux. Pour les matériaux développés, le spectre d'excitation se trouve dans l'ultraviolet. Un matériau idéal aurait un spectre d'excitation dans le rouge tout en gardant un spectre d'émission dans l'infrarouge. Cela permettrait en effet de pouvoir réexciter les nanoparticules *in vivo*, permettant leur suivi sur une période bien plus importante.

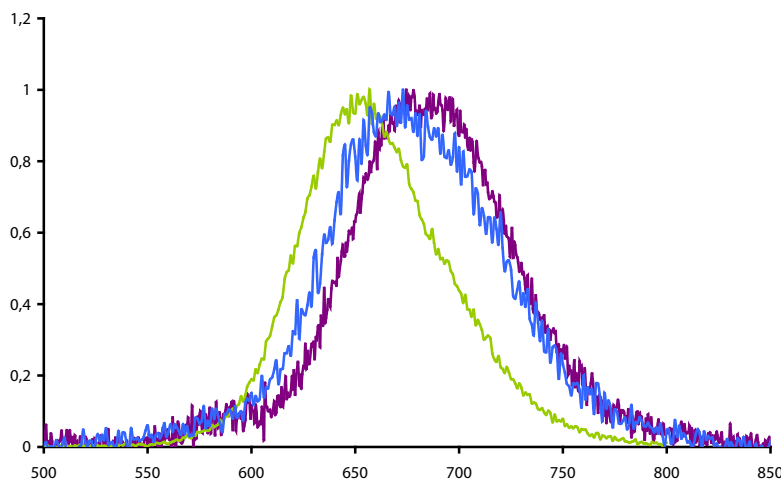


FIG. 3.27: Comparaison des spectres d'émission des différents composés synthétisés. En vert : MgSiO_3 , en bleu : $\text{ZnMgSi}_2\text{O}_6$, en violet : $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$

Évolution de la taille des particules

L'évolution des matériaux et du type de synthèse nous a permis de diminuer progressivement la taille des particules (voir Figure 3.28). La taille des particules au début de ce travail était largement supérieure à la centaine de nm pour atteindre avec le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Mg}_{0,9}\text{Zn}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ une taille comprise entre 50 et 100 nm. L'idéal serait d'obtenir des particules encore plus petites, un objectif raisonnable se situant entre 20 et 30 nm. La diminution de la taille des particules sera toutefois limitée par la capacité du matériau à stocker de l'énergie. Lorsque la taille de particules atteindra une taille critique, la surface deviendra trop importante par rapport au volume du matériau. Il est possible alors que les propriétés de luminescence persistante soient perdues.

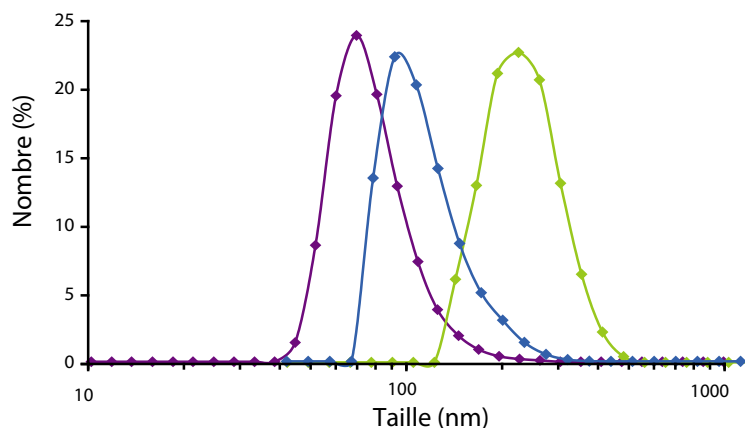


FIG. 3.28: Comparaison de la taille des particules pour les différents composés synthétisés mesurée par diffusion quasi-élastique de la lumière. En vert : MgSiO₃, en bleu : ZnMgSi₂O₆, en violet : Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si₂O₆

Évolution de l'intensité de luminescence persistante

Là encore, nous avons graduellement augmenté la luminescence persistante (voir Figure 3.29), et ce malgré la diminution de la taille moyenne des nanoparticules. L'optimisation des propriétés de luminescence persistante est relativement longue et difficile. Il est toutefois raisonnable de penser que, par optimisation systématique, un gain d'un facteur 10 en terme de luminescence soit encore envisageable.

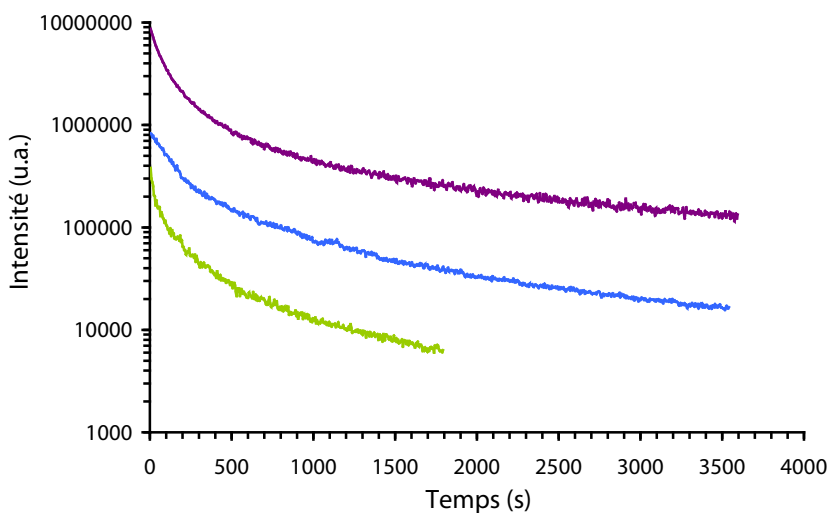


FIG. 3.29: Comparaison de la luminescence des différents composés synthétisés. En vert : MgSiO₃, en bleu : ZnMgSi₂O₆, en violet : Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si₂O₆

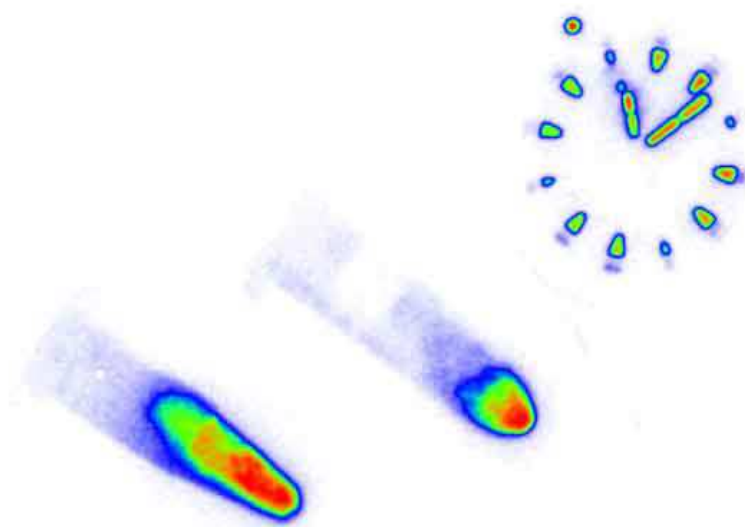


FIG. 3.30: Détection d'une montre (à droite), de nanoparticules à luminescence rouge (au milieu) et bleu (en bas). Malgré des niveaux comparables en terme de luminescence, les nanoparticules de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ ne sont pas détectables à l'oeil. Ceci est due à faible capacité de l'oeil à détecter des longueurs d'onde du proche infrarouge.

Chapitre 4

Détection *in vivo* de particules non modifiées

Sommaire

4.1 Injections locales	100
4.1.1 Injection sous-cutanée	100
4.1.2 Injection intramusculaire	102
4.2 Injection par voie intraveineuse	103
4.2.1 Biodistribution des particules non modifiées	105
4.2.2 Effet de la taille sur la biodistribution des particules	106
4.3 Expériences sur des animaux de taille plus importante . .	107

Les milieux biologiques sont des milieux fortement absorbants et diffusants. La luminescence produite par les nanoparticules sera donc fortement atténuée par les tissus lors d'une injection dans les tissus d'un animal. Nous avons donc recherché à savoir si la luminescence émise par les nanoparticules était toujours détectable dans un animal en testant tout d'abord des injections locales (injection sous-cutanée et intramusculaire). Dans ces expériences, l'injection est réalisée à quelques mm de profondeur. Nous avons également testé la possibilité de suivre par imagerie optique et *in vivo* la biodistribution des particules après injection intraveineuse. Les expériences, conduites chez la souris, ont également été reproduites chez le rat et le lapin.

Il est important de rappeler ici le principe de la détection des nanoparticules développées. Les particules sont mises en suspension (dans de l'eau ou du sérum physiologique). La suspension est excitée en utilisant une lampe UV. Dès la fin de l'excitation, la suspension est injectée à l'animal. La détection de lumière se fait dans une enceinte entièrement opaque et sans utilisation de sources lumineuses pour irradier la souris. L'acquisition se déroule donc comme s'il s'agissait d'une expérience en bioluminescence, mais sans injection de substrat.

Trois paramètres vont intervenir pour la détection des particules *in vivo* :

- le premier est bien entendu la quantité de lumière émise par les particules. À quantité égale de particules, une augmentation de luminescence par particule favorisera la détection. Une augmentation de la quantité de nanoparticules favorisera également la détection. Il est à noter que, à la différence d'autres types de sondes optiques, la luminescence des nanoparticules développées décroît au cours

- du temps. Ainsi, pour faciliter la détection, il est préférable de réaliser l'acquisition le plus rapidement possible après la fin de l'excitation. La durée séparant la fin de l'excitation et le début de l'acquisition optique est de l'ordre de la minute.
- le deuxième correspond aux différents milieux biologiques que doit traverser la lumière avant d'être détectée. Ceci est dépendant de la localisation de la source lumineuse dans les tissus (profondeur) mais aussi des coefficients d'absorption et de diffusion des milieux traversés.
 - le dernier paramètre est la qualité du détecteur associée à une durée d'acquisition des données. La qualité du détecteur optique est, bien entendu, primordiale dans la détection de la lumière. Celui-ci fixe la limite de détection au niveau de la lumière transmise à la surface de l'animal. Pour les expériences *in vivo*, nous avons utilisé la caméra PhotonImager de Biospace. La durée d'acquisition joue également un rôle important dans la qualité des résultats obtenus. Grâce au mode de fonctionnement "temps-réel" de la caméra PhotonImager, la durée de l'expérience n'a pas besoin d'être fixée a priori par l'utilisateur, celui-ci pouvant arrêter ou continuer l'acquisition selon ses besoins.

4.1 Injections locales

Dans les expériences présentées par la suite (sauf mention contraire), il s'agit de nanoparticules de composition $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,2}\text{Si}_2\text{O}_6$ ayant subi une hydroxylation de surface (voir 5).

4.1.1 Injection sous-cutanée

Limite de détection

Nous avons conduit des expériences visant à déterminer la quantité minimale de particules détectables en injections sous-cutanées. Ces expériences sont naturellement dépendantes de la quantité de lumière émise par les nanoparticules mais aussi de l'animal à imager.

Une suspension de nanoparticules a ainsi été injectée en sous-cutané dans le dos d'une souris Swiss non rasée. Pour l'excitation avant injection, les nanoparticules en suspension ont été exposées directement à une lampe UV de 6 Watt pendant 5 min à une distance de 2 cm. Afin de tester la plus faible dose détectable, 20 μL de suspensions à différentes concentrations de nanoparticules (100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été injectées à trois endroits différents du dos de la souris (voir Figure 4.1). L'acquisition est faite juste après injection pendant 2 min.

Les deux doses les plus importantes (correspondant respectivement à 2 μg et 200 ng de nanoparticules) sont facilement détectables. La dose administrée la plus faible (20 ng) a également donné un signal détectable avec un rapport signal sur bruit satisfaisant car supérieur à 5. L'analyse du signal est donné en Figure 4.2. Le rapport signal sur bruit se calcule comme le rapport entre le signal et la variance du bruit¹. Un traitement

¹ $SNR = \frac{S - \mu(B)}{\sigma(B)}$, où S est le signal détecté, $\mu(B)$ la moyenne du bruit et $\sigma(B)$ la variance du bruit

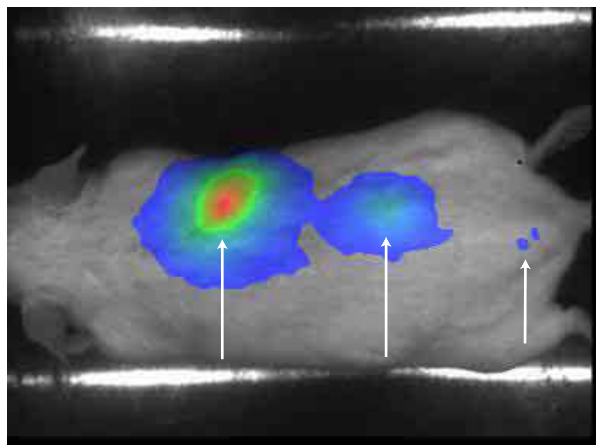


FIG. 4.1: Image de l'injection de nanoparticules à luminescence persistante en sous-cutané. Les différents points d'injections sont marqués par une flèche blanche. Les quantités injectées sont de $2 \mu\text{g}$, 200 ng et 20 ng en allant de gauche à droite.

de l'image en utilisant un filtre médian² permet d'identifier clairement la position de l'injection.

On note l'importante diffusion de la lumière autour du point d'injection. Ceci n'est pas dû à une diffusion des particules sous la peau, celles-ci étant injectées localement, mais bien à la diffusion de la lumière à travers les tissus. On voit ainsi l'importance de ce phénomène, même à des très faibles profondeurs.

Comparaison avec d'autres fluorophores

La difficulté à comparer les différentes méthodes en optique vient du fait que dans certains cas on parle de molécules, de protéines ou encore de nanoparticules. Généralement, l'unité qui prévaut est la mole.

Cette unité, qui a été développée pour les molécules, est mal adaptée lorsqu'il s'agit de particules. Si on prend l'exemple des quantum dots, un QD composé de CdSe/ZnS de taille $1,9 \text{ nm}$ émettant à 490 nm a une masse molaire de $3 \mu\text{g}/\text{nmol}$ tandis que pour une taille de $5,2 \text{ nm}$, correspondant à une émission à 620 nm , la masse molaire est de $200 \mu\text{g}/\text{nmol}$ (données techniques disponibles sur le site <http://www.evidenttech.com/>). Cela correspond donc respectivement à $3 \cdot 10^3$ et $200 \cdot 10^3 \text{ g/mol}$ en comparaison de 332 g/mol pour la fluorescéine.

Pour pousser la comparaison jusqu'au bout, la masse molaire des particules que nous avons synthétisées est d'environ 6000 kDa ³. Ainsi pour l'injection de 20 ng de particules correspond à $3,2 \cdot 10^{-16} \text{ mol}$ (2×10^8 particules) soit $0,32 \text{ pmol}$!

La comparaison entre différentes expériences faites dans les laboratoires est donc

²Le filtre médian est un filtre spatial qui calcule en chaque pixel la médiane des niveaux de gris des pixels de son entourage. En utilisant ce type de filtre, il est possible d'enlever le bruit dit "impulsif" correspondant au bruit lié au détecteur de la caméra et ainsi de faire ressortir les petits signaux.

³Les nanoparticules ayant une phase cristalline proche de la clinoenstatite, nous avons calculé la masse d'une particule en prenant ce paramètre de maille. On obtient alors qu'une particule sphérique de 50 nm de diamètre contient $\approx 7,8 \times 10^4$ mailles. Le calcul donne alors une masse de $1,05 \times 10^{-16} \text{ g}$ par particules soit un poids moléculaire de $6,3 \times 10^7 \text{ g/mol}$

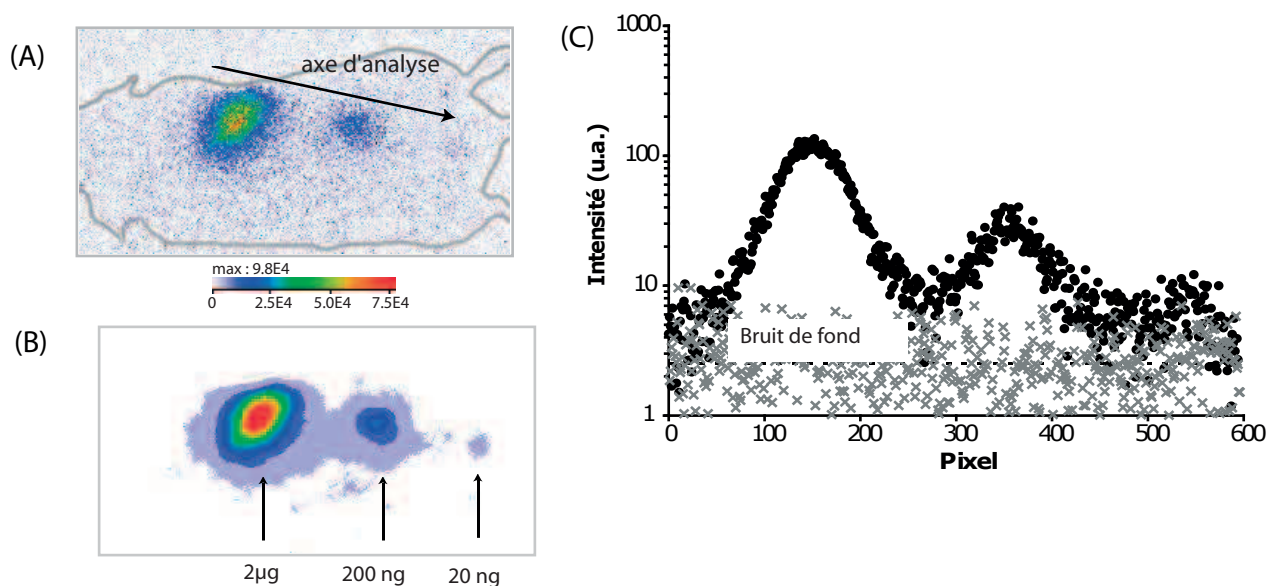


FIG. 4.2: Limite de détection en injection sous-cutanée (A) Image en fausse couleur du signal obtenu (B) Application d'un filtre médian 7 pixel sur l'image du signal. La zone d'injection de la plus faible dose est alors clairement identifiable. Le traitement d'image a été réalisé avec le logiciel ImageJ du NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (C) Analyse du signal selon l'axe décrit sur l'image (A). Par cette analyse, il est possible d'obtenir le rapport signal sur bruit pour chaque dose. (unité :ph/s/sr/cm²)

difficile. De plus, le matériel de détection, les rampes lumineuses d'excitation ou encore le type de souris n'est pas le même. Pour donner tout de même un ordre de grandeur, en injection sous-cutanée, de 1 à 4 ng de QDs (5-10 pmol) sont utilisés pour obtenir un fort signal [22, 117]. En bioluminescence, il est possible de détecter environ 10^4 cellules exprimant la luciférase.

Souris utilisées en imagerie optique Comme il a été dit, les expériences ont été réalisées sur des souris Swiss *non rasées*. En imagerie optique, l'espèce de souris la plus fréquemment utilisée est la souris nude pour plusieurs raisons. Immunodéficente, il est possible de travailler sur des modèles humains de tumeur. Du point de vue de l'imagerie optique, elle présente l'avantage d'avoir une peau fine pauvre en mélanine, facilitant ainsi la pénétration de la lumière (nous verrons dans le chapitre consacré à la détection de tumeur, l'effet de la mélanine sur le signal). Elle ne possède également pas de poils. Les poils (quand ils sont blancs) présentent une forte réflexion, rendant les expériences en fluorescence difficiles. La technique développée permet de s'affranchir de la réflexion de lumière par les poils en travaillant comme s'il s'agissait de bioluminescence.

4.1.2 Injection intramusculaire

Afin de confirmer la faisabilité d'une imagerie de tissus profonds, une injection dans le muscle tibial cranial (correspondant au mollet pour un Homme) d'une souris Swiss a été effectuée avec une quantité supérieure de nanoparticules ($20 \mu\text{L}$ à une concentration

de 10 mg/mL de nanoparticules ie 200 μg). Le signal est clairement détectable (voir Figure 4.3).

Comme observé en sous-cutanée, le signal lumineux est diffus dans l'ensemble du muscle, alors que l'injection réalisée est ponctuelle. Il est ainsi aisé de définir à l'aide de l'acquisition optique le contour du muscle de la souris. En supprimant le besoin d'illumination in situ, l'utilisation de nanoparticules à luminescence persistante permet d'observer de façon simple la diffusion de la lumière dans les tissus.

Un signal provenant de la patte de l'animal a également pu être observé, alors qu'aucune nanoparticule n'y avait été injectée. Ceci a été attribué à la réflexion sur la patte de la souris du signal provenant du muscle.

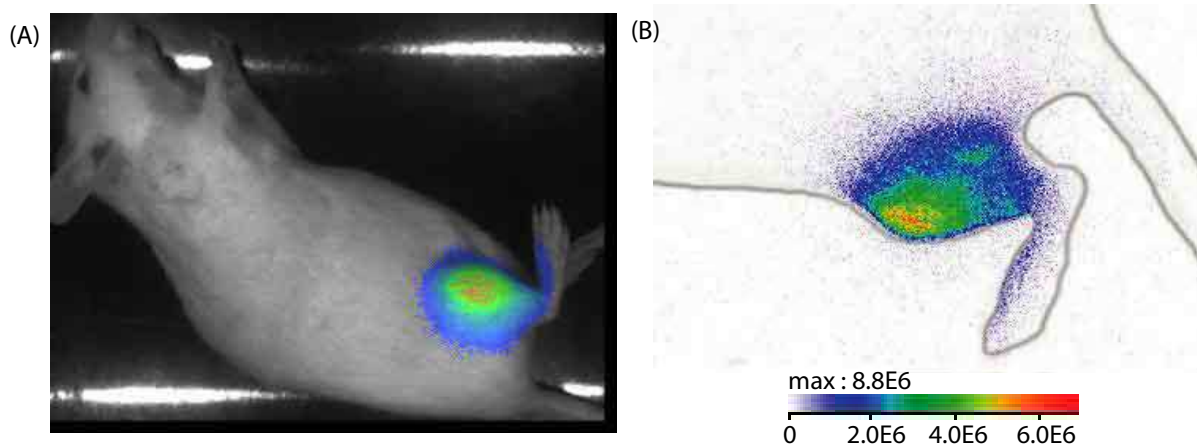


FIG. 4.3: Signaux obtenus en imagerie optique après injection intramusculaire d'une suspension de nanoparticules. (unité : ph/s/sr/cm^2)

Diffusion de la lumière Nous avons vu que les milieux biologiques étaient à la fois absorbants et diffusants, avec une absorption et une diffusion plus forte dans le bleu. De cela, on pourrait conclure qu'il est plus facile de localiser précisément un signal lorsqu'on travaille dans le rouge (longueur d'onde moins diffusée). Toutefois, expérimentalement (voir Figure 4.4, on observe que le signal observé est moins étendu lorsque l'émission de la sonde est bleu ($\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$, voir Annexe D) que lorsque l'émission est rouge ($\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,2}\text{Si}_2\text{O}_6$). Ceci est dû au fait que l'absorption est beaucoup plus forte dans le bleu : seuls les rayons lumineux rectilignes (ayant traversé une faible épaisseur de tissu) seront détectables, les autres étant absorbés et donc non détectables ; La "diffusion" du signal sera donc plus faible. Pour une observation dans le rouge, les rayons seront légèrement moins diffusés mais même les rayons lumineux ayant traversé une épaisseur importante de tissu seront détectables. Il en résulte que le signal sera plus diffus.

4.2 Injection par voie intraveineuse

Après avoir effectué les expériences d'injections locales, nous avons suivi la biodistribution des particules non modifiées par injection intraveineuse et ce de façon dynamique.

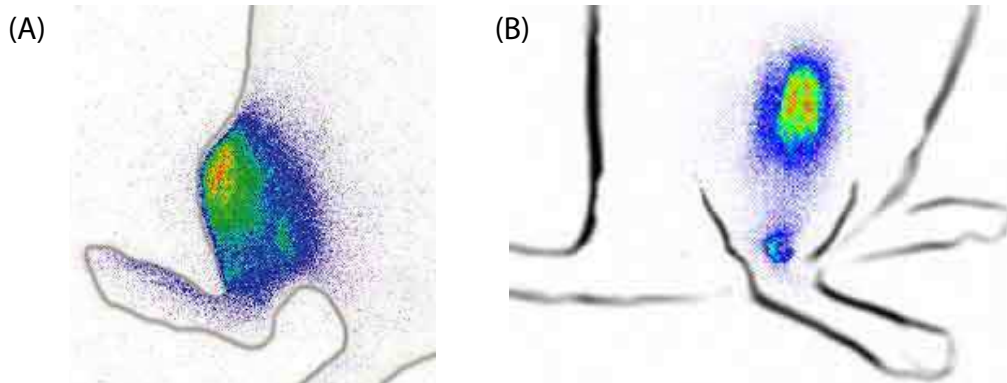


FIG. 4.4: Signaux obtenus en imagerie optique après injection intramusculaire d'une suspension de nanoparticules (A) émettant dans le proche infrarouge (B) émettant dans le bleu.

Afin de faciliter la compréhension des images de biodistribution présentées par la suite, nous allons succinctement donner la position des principaux organes de la souris (voir Figure 4.5). Classiquement, une souris adulte pèse entre 20 et 30g. Le coeur ainsi que les poumons ($\approx 0,2$ g) se trouvent bien entendu dans la cage thoracique. Situé juste en dessous, le foie est composé de 5 lobes différenciés. Il s'agit d'un organe volumineux ($\approx 1,5$ g) qui occupe une place centrale chez la souris. La rate ($\approx 0,15$ g) est accolée au foie à gauche. Les deux reins ($\approx 0,35$ g) situés en dessous respectivement du foie et de la rate.

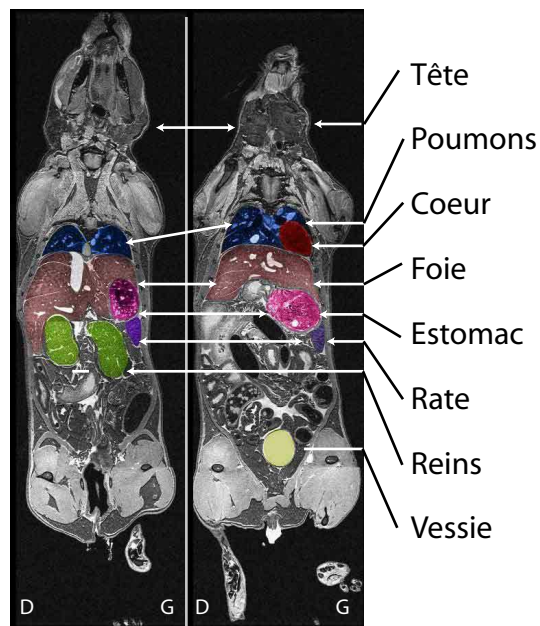


FIG. 4.5: Anatomie générale d'une souris (d'après <http://www.mrpath.com/previousvisiblemouse.html>)

4.2.1 Biodistribution des particules non modifiées

Nous avons préparé une suspension de particules à 10 mg/mL. Une injection intraveineuse de 100 μL soit 1 mg de particules par souris a été effectuée. Les résultats de cette expérience sont donnés en Figure 4.6. Les images correspondent à l'intégration du signal détecté sur 15 min.

Le signal détecté est majoritairement issu du centre de l'animal, ce qui correspond à une captation hépatique importante et rapide. On note également un signal sur le flanc gauche, signal attribué à une captation des particules par la rate. En mettant la souris sur le ventre, aucun signal n'est observable au niveau des reins (il est en effet plus facile de visualiser les reins dans cette position). Les analyses ex-vivo qui permettent d'attribuer de façon non équivoque l'origine tissulaire des signaux lumineux seront présentées dans le chapitre 6.1.4.

Il est également possible de définir le contour de la souris en utilisant les données optiques. Il n'est pas possible d'expliquer une telle distribution du signal par diffusion de lumière à partir de la zone la plus intense correspondant au foie, des signaux sont en effet détectables dans les pattes. On peut donc en conclure que les particules ont la capacité de circuler dans l'ensemble de l'animal, celles-ci étant toutefois rapidement captées par le foie.

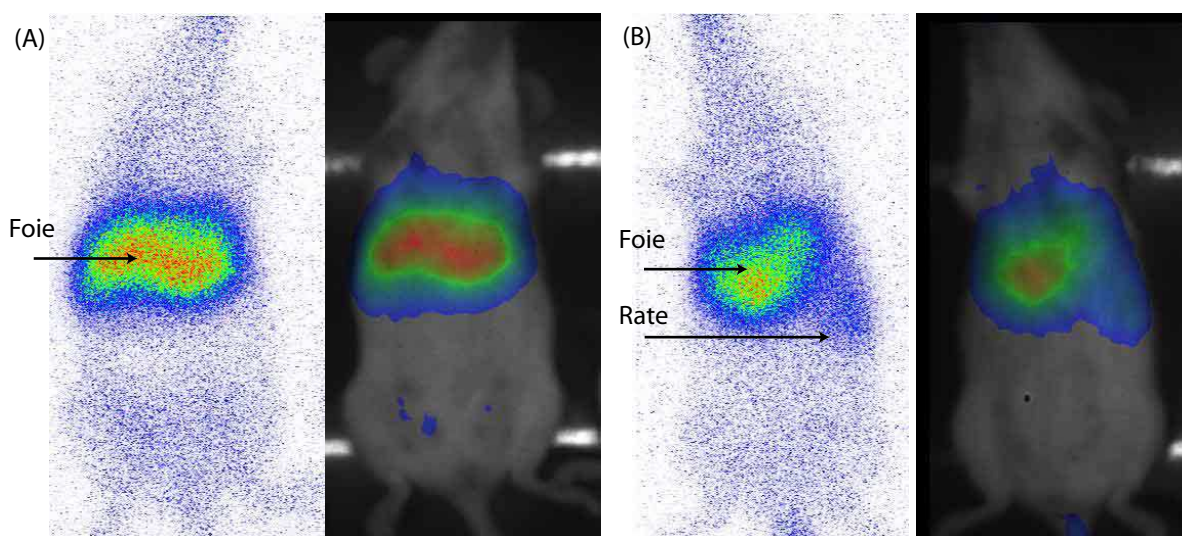


FIG. 4.6: Biodistribution de particules à luminescence persistante non modifiées. Le positionnement et l'anatomie propre de chaque souris influencent les organes détectables. (A) Le foie est clairement détectable. (B) Le foie et la rate sont détectables.

Analyse du signal. Comme on peut le voir sur la Figure 4.7, le signal détecté dans l'ensemble de la souris décroît au cours du temps. Ceci est dû au déclin de luminescence propre aux particules. On retrouve par ailleurs une décroissance aux temps longs identique à celle observée pour les particules seules.

Il est également possible de réaliser une analyse par zone d'intérêt (ROI - Region Of Interest). En étudiant la décroissance du signal, issu du foie et en faisant le rapport avec la luminescence totale issue de l'animal, on s'aperçoit que ce rapport augmente

au cours du temps. Ainsi, le signal se concentre au cours du temps dans cette région. Cette accumulation est dû à une captation hépatique rapide. On voit ici l'avantage de la technique développée. Il est possible de suivre en temps réelle la biodistribution des particules sans avoir besoin de sacrifier l'animal.

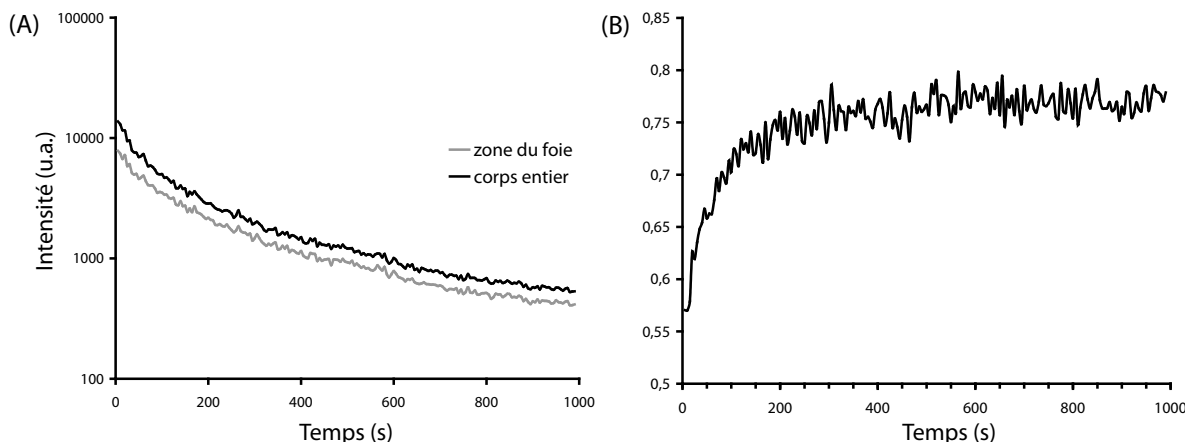


FIG. 4.7: (A) Analyse du signal obtenu après injection intraveineuse de nanoparticules sur deux régions d'intérêt : le foie et l'ensemble de l'animal (B) Courbe correspond au rapport entre le signal issu de la zone couvrant le foie de l'animal sur l'ensemble du signal détecté. On note ainsi une augmentation progressive du signal relatif de la zone couvrant le foie de l'animal.

Explications de la biodistribution observée. Lors d'une injection systémique de composants exogènes, il existe plusieurs mécanismes d'évacuation des corps étrangers. La première passe par la voie rénale. Si le corps étranger est suffisamment petit pour passer à travers les filtres des reins (le produit doit avoir une taille inférieure à une dizaine de nm), il est évacué au niveau de la vessie. Ce mécanisme d'évacuation s'observe généralement lorsqu'il s'agit de molécules ou de très petites particules. Une autre voie d'élimination possible est la captation par les macrophages. Les macrophages sont présents massivement dans le foie et la rate. Si les composés sont dégradables ou petits, ils sont évacués par la bile et rejetés par les fèces. On peut également observer une captation par les noeuds lymphatiques, qui eux aussi contiennent des macrophages.

La biodistribution observée avec l'absence de signaux au niveau des reins et de la vessie (particules trop grosses) correspond donc à une captation par les macrophages du foie et de la rate.

4.2.2 Effet de la taille sur la biodistribution des particules

Les premières expériences réalisées ont été faites avec les particules MgSiO_3 par injection de $200\mu\text{L}$ d'une suspension à 25 mg/mL soit 5 mg de nanoparticules par souris. Les particules sont de part la synthèse plus grosses. D'autres part, nous n'avons pas encore mis en place la sélection des plus petites particules par sédimentation sélective (voir chapitre 5). Les particules injectées étaient donc un mélange et comportaient une proportion importante de particules de taille supérieure au micron.

La biodistribution de ces particules était alors grandement affectée avec une rétention pulmonaire importante après l'injection (voir Figure 4.8). De plus, le signal total détecté est 5 à 6 fois plus élevé avec le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ pour 5 fois plus de particules !

Il est à noter qu'en raison de la taille trop importante des particules de MgSiO_3 , les premiers essais ont abouti dans certains cas à la mort de la souris par embolie pulmonaire. Nous n'avons jamais observé un tel phénomène avec des particules de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ (dont la taille est inférieure à 100 nm).

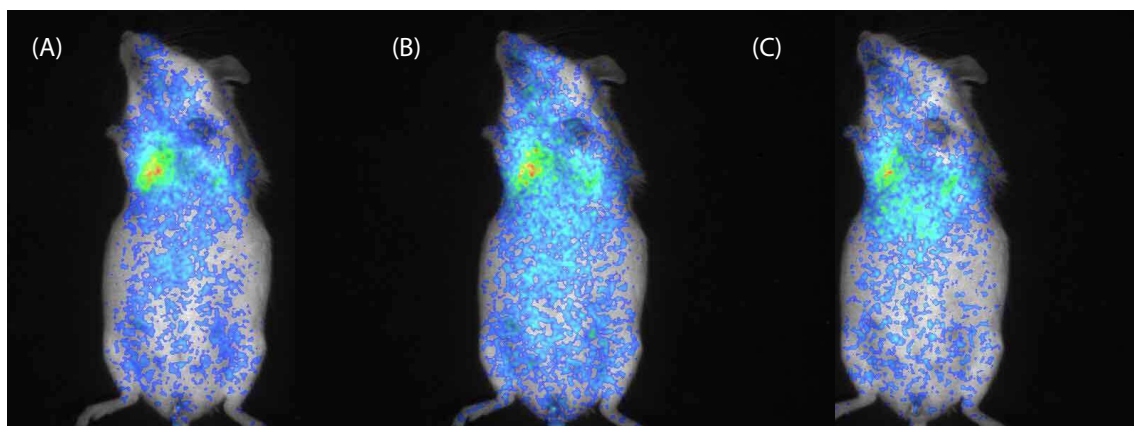


FIG. 4.8: Problème de rétention des particules de MgSiO_3 au niveau des poumons à cause de leur taille trop importante.

4.3 Expériences sur des animaux de taille plus importante

Nous avons voulu savoir si la lumière émise par les nanoparticules de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ était suffisante pour faire une imagerie sur des animaux de taille supérieure à une souris. Nous avons donc suivi la biodistribution des nanoparticules lors d'une injection systémique sur un rat wistar (300 g). Pour comparaison, le poids d'une souris varie de 20 à 30 g.

Une quantité de particules équivalente à celle utilisée pour les souris (1 mg) a été injectée en intraveineuse par la veine de la queue. Une captation hépatique rapide a également pu être mise en évidence (voir Figure 4.9).

L'expérience sur le lapin (poids : 4,5 kg) a été beaucoup plus compliquée à mettre en oeuvre, les machines n'étant pas prévues pour cela. Comme il était impossible de faire rentrer le lapin en entier, nous avons dû recourir à des draps noirs pour limiter au maximum les fuites de lumière. Malgré cela, l'acquisition a été effectuée avec un bruit de fond supérieur de dix fois à la normale.

Nous avons effectué deux types d'injection : une injection systémique (1 mL à $10\mu\text{g}/\text{mL}$) et une injection intramusculaire (voir Figure 4.10). En ce qui concerne l'injection systémique, l'expérience ne nous a pas appris grand chose à cause du bruit de fond. Le signal provenant du foie de l'animal ne permet pas de connaître la profondeur

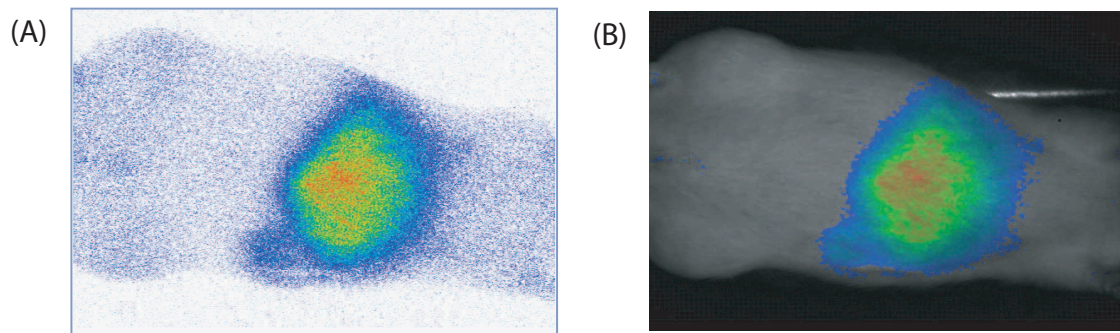


FIG. 4.9: Biodistribution des nanoparticules après injection intraveineuse chez un rat. La biodistribution est similaire à celle observée chez la souris avec une captation hépatique et splénique importante.

du signal. Le foie étant entièrement perfusé, le signal peut provenir simplement des zones les plus superficiels.

C'est pourquoi, lors de l'injection intramusculaire, nous avons utilisé une aiguille nous permettant d'injecter les particules à environ 4 cm de profondeur. Le signal est encore très facilement localisable, montrant ainsi la possibilité de faire de l'imagerie sur des tissus très profonds.

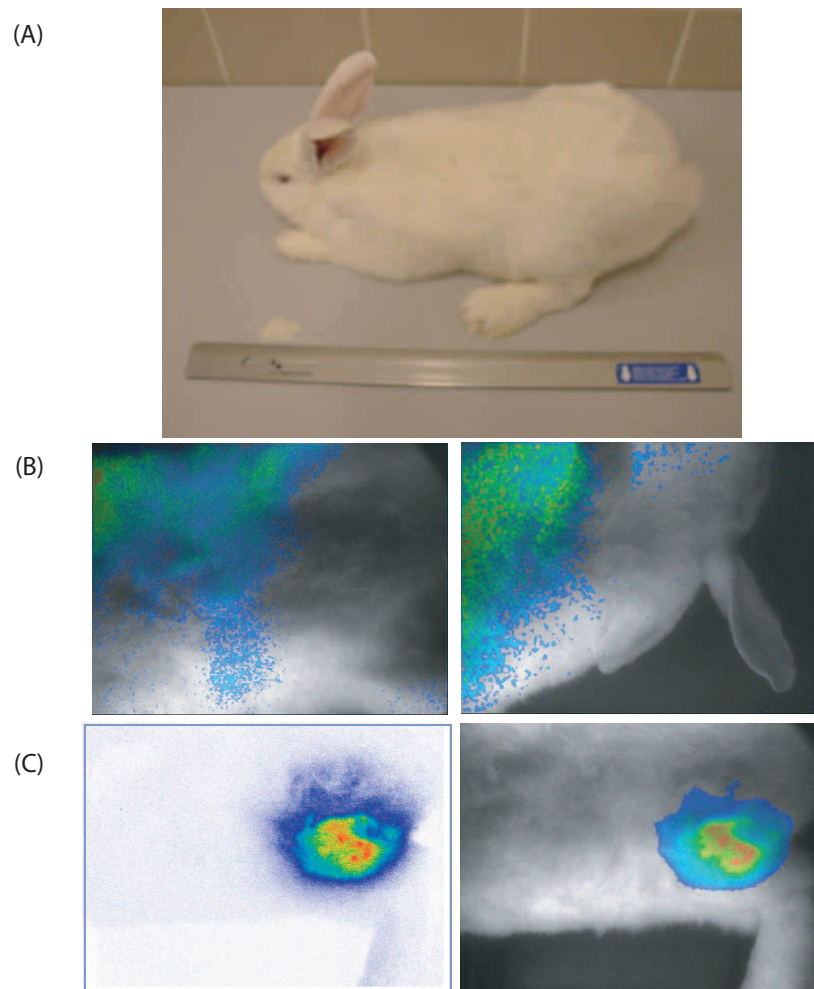


FIG. 4.10: Expériences de visualisation des particules chez le lapin (A) Photographie d'un lapin. Une règle de 50 cm placée à côté du lapin montre la taille importante de l'animal (environ 80 cm de longueur). (B) Biodistribution des particules après injection intraveineuse. Les signaux sont difficilement reconnaissable à cause du champ optique trop faible de la caméra. (C) Résultats d'une injection intramusculaire profonde chez le lapin.

Conclusion sur la détection des nanoparticules

Les expériences *in vivo* qui ont été réalisées avec des particules non fonctionnalisées nous ont permis de démontrer que le concept de luminescence persistante était envisageable en biologie. Plusieurs enseignements peuvent être tirés de ces expériences :

- La détection de particules à luminescence persistante *in vivo* est possible. Les particules stockent suffisamment d'énergie pour émettre un niveau de luminescence détectable dans un animal sans recourir à une excitation externe. Les quantités minimales pour l'obtention d'un signal sont faibles (détection de 20 ng de particules en sous-cutanée). Une détection dans des tissus profonds est possible (détection à des profondeurs supérieures à 5 cm).

- Nous avons également pu suivre la biodistribution des particules pendant plus de 15 min et ainsi déterminer leur biodistribution *in vivo* sans recourir au sacrifice de l'animal. Ces acquisitions optiques montrent clairement une captation hépatique et splénique importante et rapide, l'utilisation de la caméra Biospace nous ayant permis de déterminer une cinétique de captation. Les analyses *ex vivo* réalisées avec les particules fonctionnalisées présentées par la suite ont confirmé cette biodistribution.

- Nous avons montré l'importance de la taille des particules sur leur biodistribution. Une taille trop importante empêche la circulation des particules avec une rétention au niveau pulmonaire.

Troisième partie

**Fonctionnalisation et applications
biologiques**

Chapitre 5

Modification de la surface des nanoparticules

Sommaire

5.1	Stratégie de fonctionnalisation et méthodes	113
5.1.1	Fonctionnalisation	113
5.1.2	Exemples de fonctionnalisation	115
5.2	Couplage de molécules à la surface des nanoparticules	120
5.3	Greffage de fluorophores en surface	122

Ce chapitre vise à présenter les méthodes de modification de la surface des nanoparticules à luminescence persistante qui ont été mises en oeuvre. Nous décrirons ici la première étape de fonctionnalisation qui permet d'obtenir des fonctions amines, thiols ou acides carboxyliques en surface. Ces groupements chimiques permettront d'introduire différents groupements (PEG, fluorophores...). Les protocoles et les quantités utilisées se trouvent en annexe p.181.

5.1 Stratégie de fonctionnalisation et méthodes

5.1.1 Fonctionnalisation

La fonctionnalisation des particules se déroulent en deux grandes étapes. On effectue d'abord une première étape d'hydroxylation de la surface des particules. Puis, après sélection des plus petites particules par sédimentation sélective, une condensation contrôlée de silanes fonctionnalisés permet d'obtenir des groupements chimiques en surface qui permettent de réaliser potentiellement un grand nombre de réactions de couplage.

Hydroxylation partielle de la surface

Comme nous l'avons vu, la surface des silicates acquiert une charge de surface dépendante du pH après contact avec de l'eau. Le potentiel ζ est dans notre cas négatif sur l'ensemble de la gamme de pH rencontrée en biologie (voir 5.1), cette charge provenant d'alcoolates non protonés en surface à ces pH.

L'hydroxylation est relativement rapide, même à pH neutre. Toutefois pour faciliter la réaction et ainsi reactiver la surface des particules après chauffage, les nanoparticules sont mises en suspension à l'aide d'un bain à ultrason dans un milieu basique (NaOH 0,05M) pendant 12h. Durant ce traitement, les nanoparticules acquièrent une forte charge de surface négative rendant la suspension plus stable. Il est toutefois nécessaire de passer régulièrement la suspension dans un bain à sonication afin d'assurer une meilleure dispersion des particules, l'hydrolyse ayant ainsi lieu sur l'ensemble de la surface des particules.

Sur deux matériaux que nous avons synthétisés, nous avons réalisé une étude portant sur les variations du potentiel ζ en fonction du pH. Le point de charge nulle de l'enstatite a été trouvé autour de 4,3, ce qui est cohérent avec les données de la littérature. En ce qui concerne le composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$, le point de charge nulle serait aux alentours de pH 2, ce qui est à rapprocher du point de charge de la silice pure qui varie entre 1 et 3. Ce résultat est à rapprocher des expériences sur le rognage des particules. Une méthode pour s'assurer que la surface des particules est bien constituée principalement de silice serait une analyse chimique EDX (Energy Dispersive X-ray spectrometry).

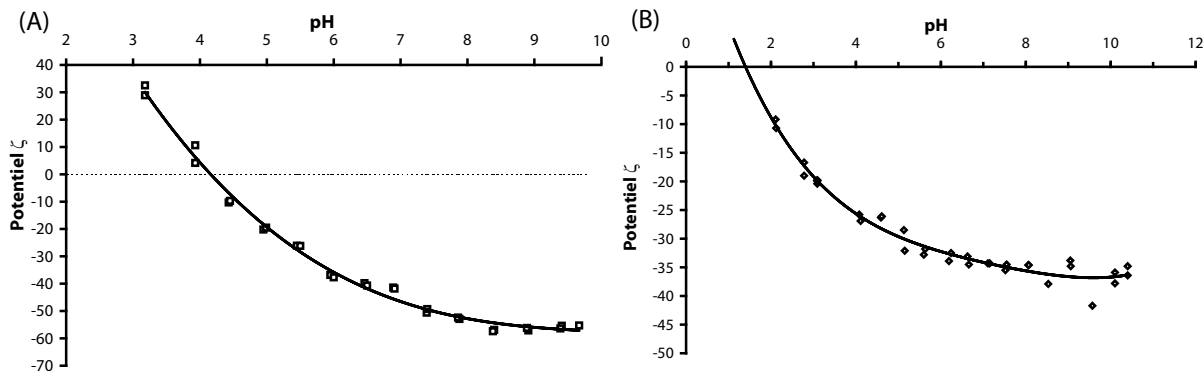


FIG. 5.1: Influence du pH sur le potentiel ζ de (A) MgSiO_3 (B) $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$.

Sélection des plus petites particules

Après broyage des poudres, il reste des particules agglomérées ou de trop grande taille. Pour des applications *in vivo*, il est préférable de ne garder que les particules de taille nanométrique, c'est pourquoi nous devons procéder à un tri. Ceci peut se faire par sédimentation sélective. En centrifugeant une suspension de particules, seules les plus petites particules se trouvent dans le surnageant.

Cette étape de sélection est venue relativement tardivement au cours de ce travail. En effet, les plus grosses particules ont une taille tout de même inférieure au μm pour la composition $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ ce qui rend possible leur utilisation sans sélection pour des expériences *in vivo*.

Pour donner un ordre de grandeur des quantités récupérées après ce traitement, de 1 g de particules, 50 mg des particules les plus petites sont récupérées soit un rendement de 5%. Si la sédimentation est moins drastique ($1000 \times g$), environ 100 à 200 mg de nanoparticules sont récupérées, mais il s'agira d'un mélange polydispersé.

Précipitation de silanes

La deuxième étape de fonctionnalisation consiste en la précipitation de dérivés de silanes en milieu organique. Les silanes que nous avons utilisés sont l'aminopropyl-triethoxy-silane (APTS) et le 3-mercaptopropyl-triethoxy-silane (MPTS). Ces silanes, dont la formule chimique est donnée figure 5.2 vont réagir avec la surface des particules en formant des ponts Si-O-M libérant 3 molécules d'éthanol.

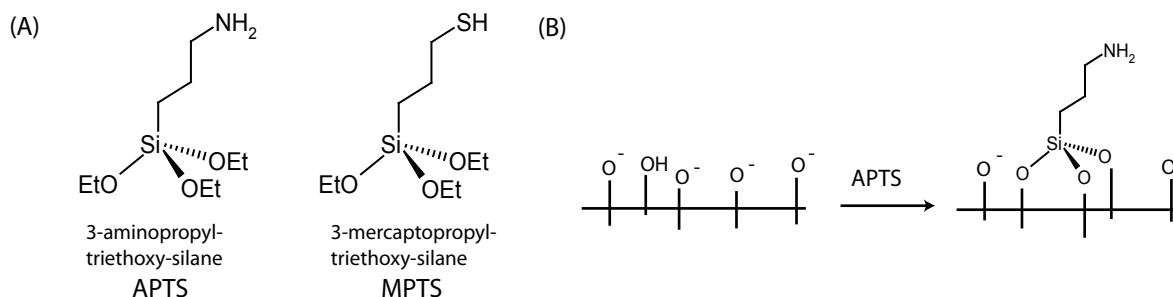


FIG. 5.2: (A) Formule chimique de l'APTS et du MPTS (B) Réaction de dérivés silanés à la surface des particules

Ces méthodes de fonctionnalisation sont largement décrites dans la littérature. Que cela soit pour la silice ou d'autres matériaux, cette précipitation s'effectue généralement dans le toluène en chauffant à 80-90 °C. Nous avons choisi de faire la réaction dans du diméthylformamide (DMF) à température ambiante.

Ce choix est dû au fait qu'il s'agit d'un solvant polaire aprotique. La polarité va permettre de mieux disperser les particules. En gardant leur potentiel de surface, l'aggrégation sera limitée permettant ainsi une meilleure fonctionnalisation (voir Figure 5.3).

Le caractère aprotique du solvant empêchera les réactions soit avec l'APTS (l'éthanol aurait tendance à limiter la réaction de couplage puisqu'il pourrait y avoir échanges de ligand éthanol avec le solvant) ou avec les particules (les particules sont chargées négativement, avec des groupements -O⁻ réactifs). Un solvant tel que le diméthyl sulfoxyde (DMSO) aurait également pu être utilisé. Toutefois, son haut point d'ébullition nous a fait préférer le DMF.

Après plusieurs essais, nous n'avons pas vu de différence entre les réactions dans le toluène à 80°C, dans du DMF à 80°C et dans du DMF à température ambiante. Pour des raisons pratiques, la réaction a donc été menée à température ambiante.

L'excès de silane est enlevé par une série de lavages par sédimentation-redispersion.

5.1.2 Exemples de fonctionnalisation

Nous allons présenter trois types de fonctionnalisation permettant l'introduction de groupements fonctionnels : des particules portant des amines en surface, des particules portant des groupements thiols et enfin des particules sur lesquelles se trouvent des groupements carboxylates. Ces fonctionnalisations permettent ensuite d'envisager un ensemble de réactions chimiques à la surface des particules et ainsi de diversifier leurs utilisations.

Solvant	M.P.	B.P.	ϵ_r	μ	E_T
Eau	0,0	100,0	78,30	5,9	1,000
Methanol	-97,7	64,5	32,66	5,7	0,762
Ethanol	-114,5	78,3	24,55	5,8	0,654
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	18,5	189,0	46,45	13,5	0,444
N,N-Dimethylformamide (DMF)	-60,4	153,0	36,71	10,8	0,404
Acétone	-94,7	56,1	20,56	9,0	0,355
Toluène	-95,0	110,6	2,38	1,0	0,099

TAB. 5.1: Propriétés chimiques de solvants organiques classiquement utilisées. (M.P. température de fusion, B.P. : température d'ébullition, ϵ_r : constante diélectrique μ : moment dipolaire, E_T : polarité du solvant (échelle vis à vis de l'eau))

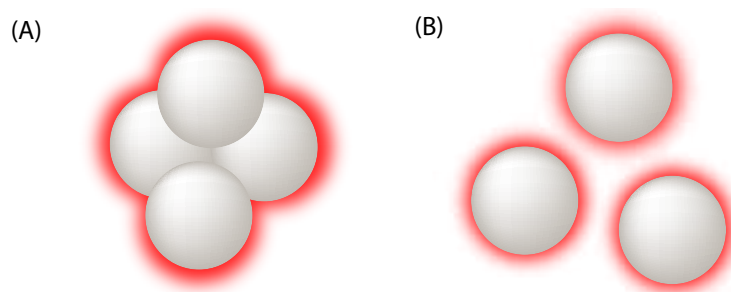


FIG. 5.3: (A) Fonctionnalisation d'un agrégat de particules. La fonctionnalisation n'est pas homogène sur l'ensemble de la surface des particules. (B) Une dispersion des particules permet une fonctionnalisation homogène.

Obtention de particules aminées

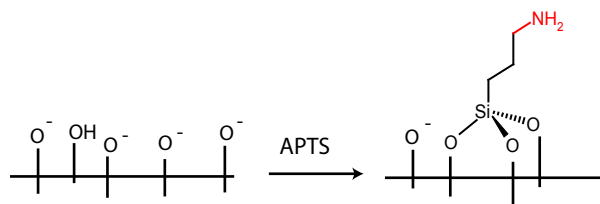


FIG. 5.4: Fonctionnalisation pour l'obtention de particules aminées

Les hydroxyles donnent aux nanoparticules un potentiel ζ négatif à pH neutre (-34,3 mV dans NaCl 20 mM, pH 7) et permettent le greffage covalent de différents groupements fonctionnels.

Les nanoparticules sont mises en suspension dans du DMF à une concentration relativement faible (2,5 mg/mL) pour réagir avec le 3-aminopropyl-triéthoxysilane (APTS) qui va se lier covalamment à la surface des nanoparticules. La suspension est laissée sous agitation pendant 1 nuit. Après réaction, la suspension est sédimentée. Le surnageant est enlevé et on redisperse les nanoparticules dans du DMF. Pour s'assurer qu'il ne reste plus d'APTS libre, il est nécessaire d'effectuer une succession de sédimentation-lavage (voir annexe A).

Le succès du greffage a été suivi par mesure du potentiel Zéta des amino-NPs (+35.8 mV à pH 7, NaCl 20 mM) et par un test positif au trinitrobenzene sulfonate (TNBS). Nous avons vérifié en microscopie électronique que nous avons fonctionnalisé les particules non agrégées et dosé le nombre d'amines ayant réagi et réactives en surface.

Dosage des amines greffées Nous avons effectué un dosage en retour afin de savoir quelle quantité d'amines sont greffées lors de la précipitation d'APTS sur la surface des nanoparticules. Ce dosage a été réalisé en utilisant le kit de dosage ATTO-TAG CBQCA d'Invitrogen. Le composé (3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (CBQA) n'est pas fluorescent en solution aqueuse. Par réaction avec une amine primaire, ce composé se cyclise pour former un 7-aza-1-cyano-5,6-benzisoindeole qui est fluorescent (ex :450 nm, em :590nm). La réaction a lieu en présence de KCN dans un tampon borate de sodium à pH 9,3.

Ce dosage nous a permis de déterminer que, lors de ce couplage, 2,0 μmol d'APTS sont consommées par mg de nanoparticules. Sur d'autres systèmes colloïdaux notamment de la silice, le nombre théorique d'amines présentes en surface varie entre 0,1 et 1 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ [118]. Il est ainsi probable que la fonctionnalisation se fasse en plusieurs couches de silice. C'est pourquoi nous avons cherché à doser le nombre d'amines accessibles pour une réaction chimique ultérieure.

Nombres d'amines accessibles pour un greffage ultérieur Pour déterminer le nombre d'amines accessibles pour les étapes ultérieures de greffage, nous avons réalisé une réaction avec du N-(9H-Fluoren-2-ylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu). Ce composé absorbe en UV et peut donc être doser par absorbance à 301 nm. La fonction succinimide réagit avec des amines libres en formant une liaison amide.

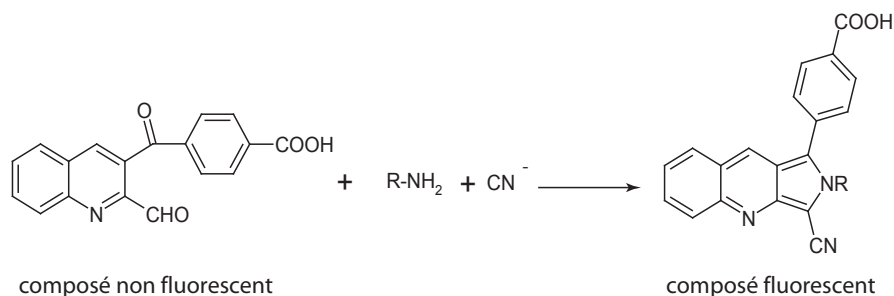


FIG. 5.5: Méthode de dosage des amines primaires par le kit de dosage ATTO-Tag CBQCA (Invitrogen)

Le dosage se fait de la façon suivante : 1 mg de nanoparticules aminées est mis en réaction avec $0,5\mu\text{mol}$ ou $1,0\mu\text{mol}$ de Fmoc-OSu dans du DMF en présence de Diisopropyléthylamine (DIPEA) afin de rendre réactives les amines des nanoparticules. Après réaction, la suspension est sédimentée et le surnageant est dosé.

Pour l'expérience réalisée avec $0,5\mu\text{mol}$ de Fmoc-OSu, les résultats donnent $0,043\mu\text{mol}$ d'amines par mg de particules ce qui est très peu. L'expérience avec $1,0\mu\text{mol}$ de Fmoc-OSu évaluait la quantité d'amines à $0,260\mu\text{mol}/\text{mg}$. Il est donc probable que le premier résultat sous-estimait le nombre d'amines. Comme nous le verrons par la suite, grâce à d'autres dosages, le nombre d'amines accessibles doit se situer entre $0,25$ à $0,5\mu\text{mol}/\text{mg}$ de nanoparticules, ce qui correspond tout de même à 15000 - 30000 amines par particules.

Potentiel ζ des nanoparticules A cause des amines libres en surface des particules, le potentiel de surface devrait logiquement être positif à pH neutre. À pH neutre, les amines se trouvent en effet sous forme protonée, le pK_a d'une amine non conjuguée se situant entre 9 et 12. Les mesures de potentiel ζ nous ont permis de montrer une inversion totale du potentiel des nanoparticules passant de -40 mV à $+35\text{ mV}$ (pH 7, NaCl 20 mM). De plus, une analyse du potentiel ζ en fonction du pH (voir Figure 5.6) montre que le potentiel de surface des amino-NPs est positif dans la gamme de pH physiologique avec un potentiel de charge nulle qui peut être extrapolé autour de pH 9,5.

Obtention de particules thiols

Une autre fonction chimique intéressante pour modifier la surface des particules est la fonction thiol. Cette fonction permet de réaliser des liaisons covalentes avec des molécules portant des groupes maléimides ou des vinylsulfones.

Pour l'obtention de thiols en surface des particules, nous avons utilisé une méthode de synthèse identique à celle utilisée pour les groupements aminés en utilisant du 3-mercaptopropyl-triéthoxy-silane (MPTS).

Il est à noter que cette fonctionnalisation peut provoquer une agglomération des particules lors du stockage des particules. En effet, des ponts disulfures se forment par oxydation, liant coalement les particules. Toutefois l'ajout de dithiothreitol (DTT)

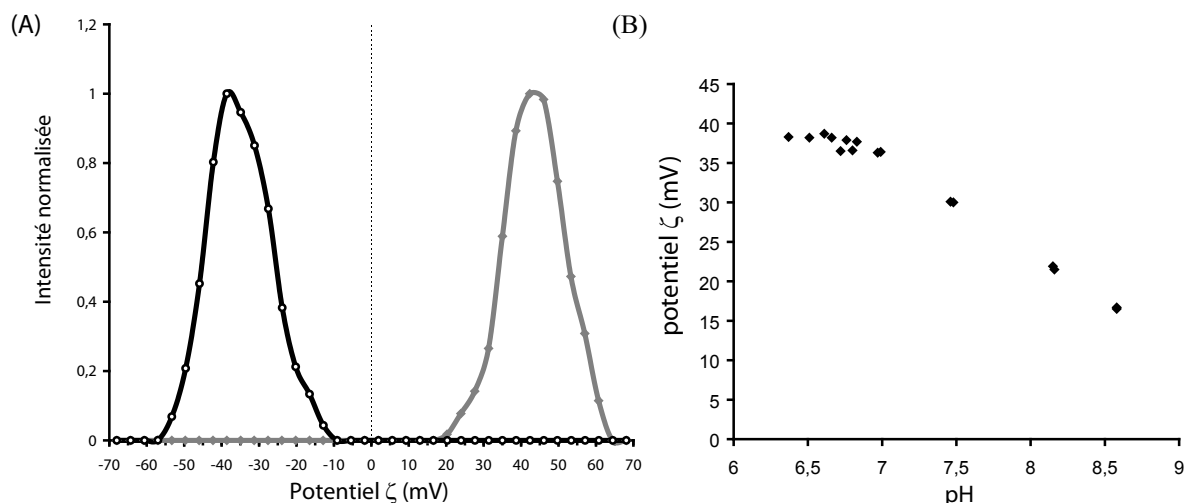


FIG. 5.6: Variation du potentiel ζ en fonction du pH pour les nanoparticules aminées

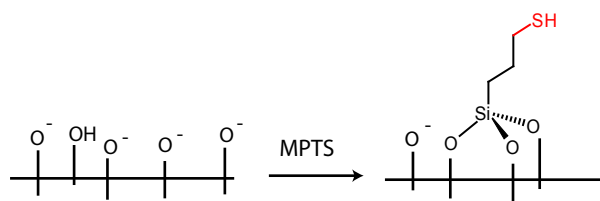


FIG. 5.7: Fonctionnalisation pour l'obtention de particules thiols

avant utilisation des particules permet de déplacer cet équilibre libérant ainsi les particules. Le stockage de ces particules doit donc se faire en l'absence d'oxygène en utilisant de l'argon par exemple.

Dosage des thiols Pour doser les thiols, nous utilisons le réactif d'Ellman. Celui-ci réagit avec les thiols, selon la réaction décrite en Figure 5.8.

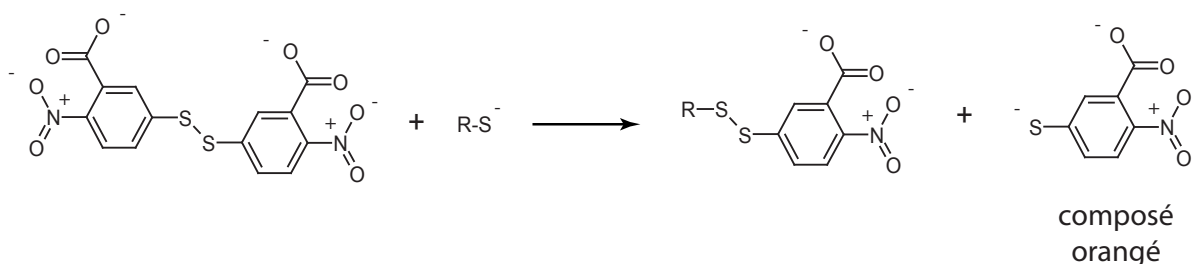


FIG. 5.8: Méthode de dosage des thiols par le réactif d'Ellman

L'acide 5-thio(2-nitro)benzoïque noté TNB²⁻ est jaune orangé. Son absorbance peut être dosée en solution à 405nm. Celle-ci augmente linéairement avec la concentration en thiols dans une certaine plage de concentration.

La quantité de MPTS consommée lors de cette réaction a été déterminée à $1\mu\text{mol}$ par mg de nanoparticules. L'ordre de grandeur est donc conservé en comparaison des expériences avec de l'APTS. Nous n'avons toutefois pas dosé la quantité de thiols accessibles pour une réaction ultérieure.

Obtention de particules carboxylées

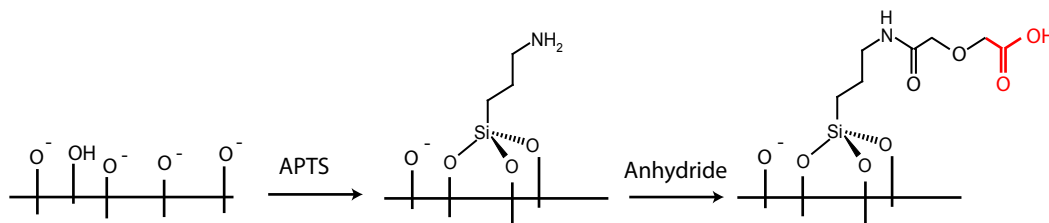


FIG. 5.9: Obtention de fonctions carboxylates en surface des nanoparticules

Il n'existe pas de dérivés silanes comportant directement un groupement carboxylique. En effet, les groupes alkoxy portés par les silanes réagiraient avec l'acide carboxylique. Un groupement protecteur sur le groupement carboxylique est donc nécessaire. Pour la synthèse de particules comportant des acides en surface, nous avons donc préféré réaliser une réaction sur les amines portées par les amino-NPs.

Ainsi, la charge de surface des amino-NPs a été inversée par réaction avec un anhydride (dans notre cas de l'anhydride diglycolique¹), qui réagit avec les amines libres².

Nous avons vérifié le succès de la réaction par détermination de la charge des particules. Le potentiel Zéta de ces nanoparticules (dénommées carboxy-NPs) était comme attendu négatif à pH neutre (-37,3mV) (voir Figure 5.10).

5.2 Couplage de molécules à la surface des nanoparticules

Comme nous le verrons dans le chapitre concernant la biodistribution chez la souris, le recouvrement de nanoparticules par du polyéthylèneglycol (PEG) permet d'obtenir une couche protectrice empêchant l'interaction des particules avec le milieu environnant ou entre particules par encombrement stérique et une meilleure circulation dans l'organisme.

Un couplage peptidique utilisant du mPEG₅₀₀₀-COOH³ a été effectué sur les amines des amino-NPs. Ceci permet d'obtenir des particules neutres (potentiel Zéta de +5.1 mV à pH neutre) qui seront dénommées PEG-NPs (voir Figure 5.11).

Le greffage de molécules n'affectent que très peu les propriétés de luminescence persistante des particules. Les intensités des suspensions de particules possédant des

¹Cette réaction a également été testée avec succès sur de l'anhydrique succinique

²Il est à noter que si les amino-NPs, n'ont pas été en contact avec l'eau, les amines en surface ne sont pas protonées. La réaction se fait donc directement. S'il y a eu contact avec l'eau et protonation des amines, il est nécessaire d'ajouter une base organique (comme de la triéthylamine ou de la DIPEA)

³ α -carboxy- ω -methoxy-polyéthylèneglycol F.W. : 5000g/mol

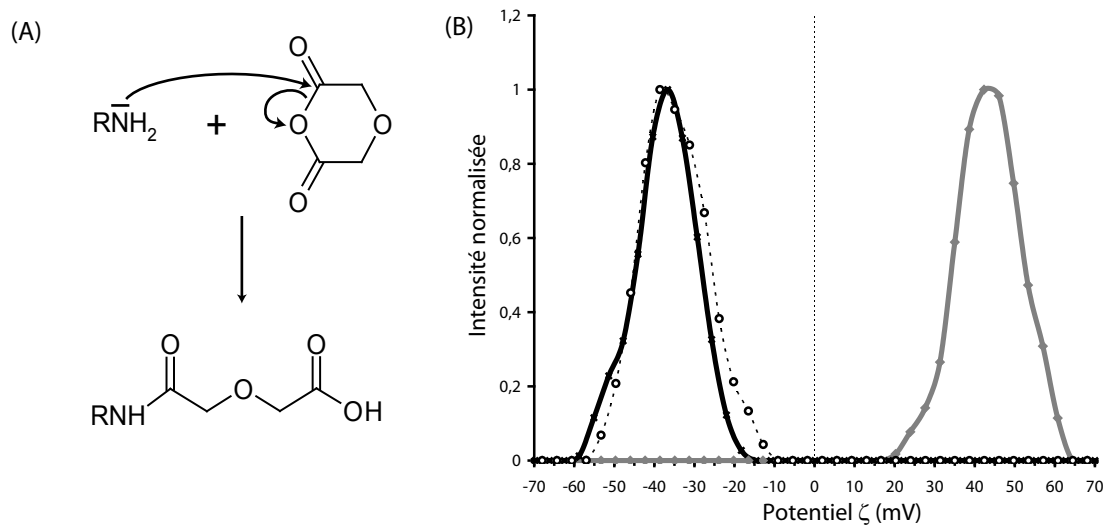


FIG. 5.10: (A) Réaction d'une amine sur un anhydride. (B) Potentiel ζ des particules après fonctionnalisation. en noir : particules non fonctionnalisées, en gris : amino-NPs, en pontillé : carboxy-NPs

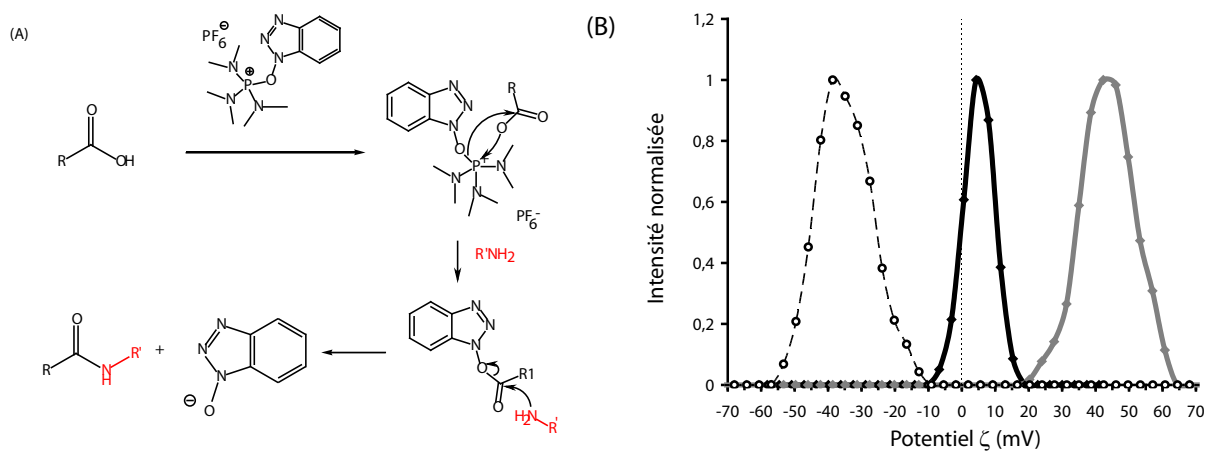


FIG. 5.11: (A) Réaction d'un acide carboxylique et d'une amine en présence de l'agent de couplage BOP (B) Potentiel ζ des particules PEGylées. En gris : amino-NPs, en pointillé : carboxy-NPs, en noir : PEG-NPs

fonctions amines, acides carboxyliques et PEG sont quasiment équivalentes (voir Figure 5.12).

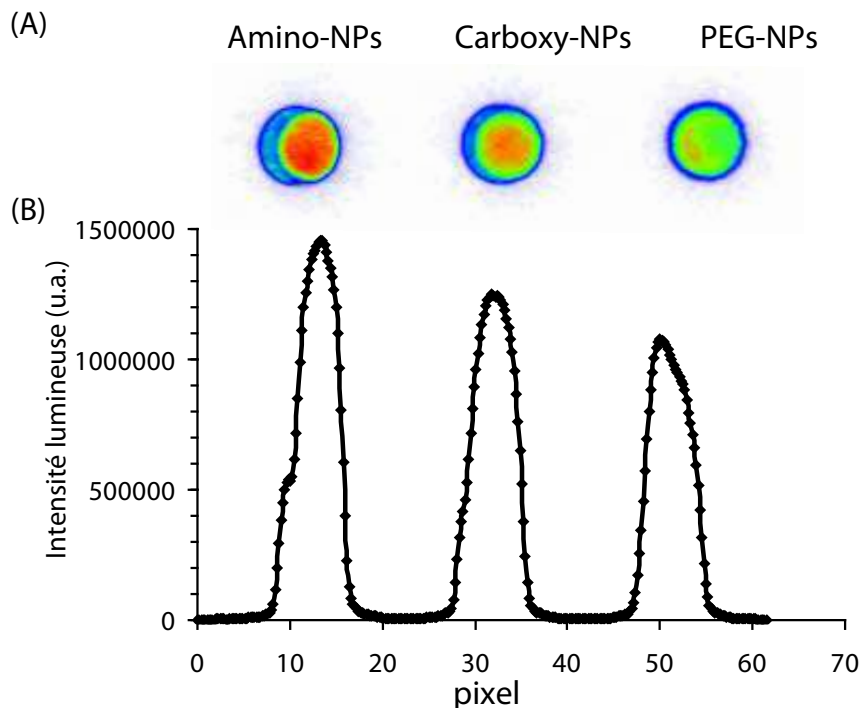


FIG. 5.12: Intensité des particules en suspension après excitation UV.

5.3 Greffage de fluorophores en surface

Nous avons également greffé des molécules fluorescentes à la surface de particules. Comme nous l'avons dit, les particules sont fluorescentes et il est possible de visualiser chaque particule en microscopie optique. Toutefois, l'excitation se fait dans l'UV. Or, dans ce domaine spectral, le phénomène d'autofluorescence est très important. Ainsi, si nous voulons suivre les particules sur coupes tissulaires, il aurait été difficile de discerner les particules du bruit de fond avec un appareillage classique (une mesure décalée dans le temps de quelques ms permettrait de s'affranchir de la problématique d'autofluorescence).

Particules FITC

Il est possible de faire réagir les particules aminées avec du FITC (Fluoresceine isothiocyanate). Le groupement isothiocyanate réagit avec les amines en formant une liaison covalente de type urée. Cette liaison chimique est classiquement utilisée pour marquer une protéine avec un agent fluorescent.

Afin de garder des groupes fonctionnels en surface des particules, nous avons mis à réagir un défaut de FITC par rapport aux amines libres ($0,15 \mu\text{mol}$ de FITC /mg pour une estimation de $0,25$ à $0,5 \mu\text{mol}$ d'amines par mg de nanoparticules). La réaction

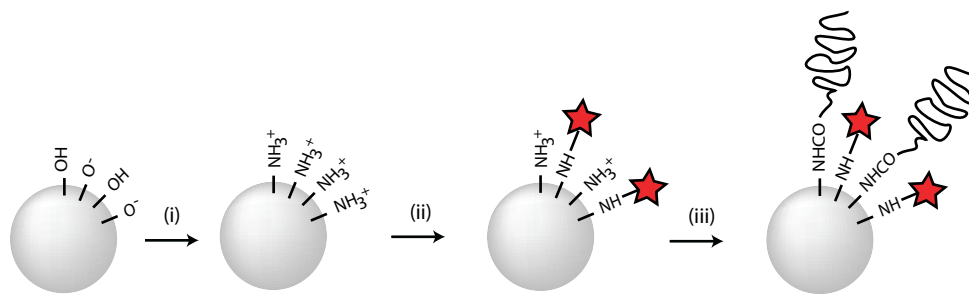


FIG. 5.13: Greffage d'un fluorophore à la surface des particules.

est quasiment quantitative, le surnageant de la réaction ne présentant qu'un très faible fluorescence due au FITC (<1% de la quantité initiale).

Le succès de la réaction est visible au microscope. Les particules marquées au FITC présentent une fluorescence importante sous excitation à 488 nm alors que les particules non marquées ne possèdent pas cette propriétés (seul l'UV excitation à 365 nm permet de les visualiser).

Le potentiel ζ des particules après couplage du FITC est toujours positif (+30mV à pH7 NaCl 20 mM). Ceci montre que la quantité de FITC réagissant est inférieure à la quantité d'amines accessibles, corroborant le dosage effectué avec le Fmoc-OSu.

Il est alors possible de faire réagir du PEG₅₀₀₀-COOH sur ces particules amines-FITC afin de neutraliser la charge de surface. Lors de cette réaction, se faisant dans les mêmes conditions que pour un greffage direct de PEG5000, le potentiel de surface passe de +30 mv à un potentiel neutre (voir Figure 5.14).

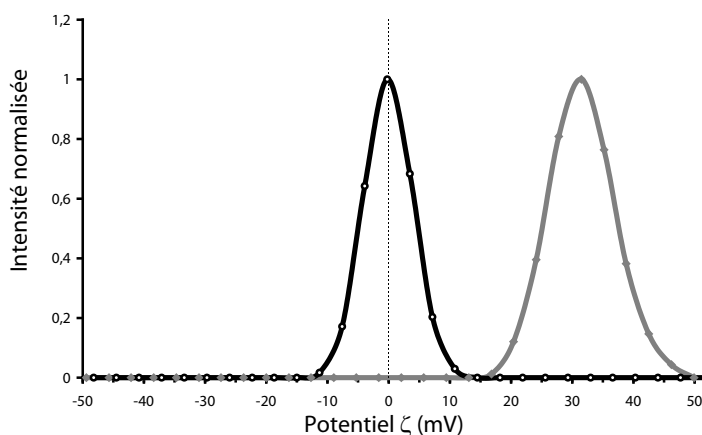


FIG. 5.14: Potentiel zeta des particules amines marquées partiellement au FITC et recouvert de PEG

Particules Rhodamine

Des essais similaires ont été réalisés avec un greffage de rhodamine en surface des particules. Ceci permet de visualiser les particules avec une excitation dans le vert et

une émission dans le rouge.

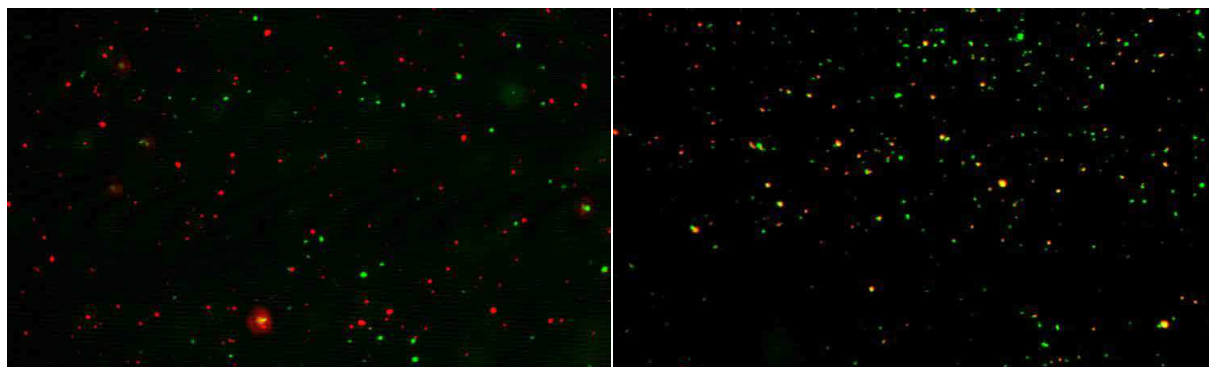


FIG. 5.15: Microscopie ($\times 1000$) d'un mélange de particules rhodamine (en rouge) et fluorescéine (en vert).

Chapitre 6

Expériences *in vivo*

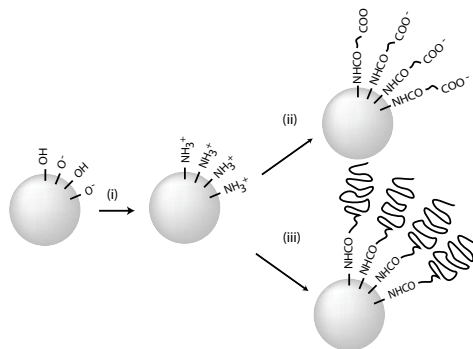
Sommaire

6.1 Biodistribution des nanoparticules selon leur charge de surface	125
6.1.1 Particules positives	126
6.1.2 Particules négatives	127
6.1.3 Particules neutres	129
6.1.4 Analyse <i>ex vivo</i> et microscopie	130
6.1.5 Effet de l'injection de compétiteurs du système réticulo-endothélial sur la biodistribution	134
6.1.6 Temps de circulation des nanoparticules dans le sang	136
6.2 Détection de tumeurs	137
6.2.1 Tumeurs 3LL	138
6.2.2 Tumeurs B16	139
6.3 Évaluation de la reperfusion du foie après ischémie partielle	141
6.3.1 Expériences de visualisation de la reperfusion avec les nanoparticules	141
6.3.2 Évaluation de la toxicité hépatique des nanoparticules	142
6.4 Tolérance des nanoparticules: études toxicologiques préliminaires	145
6.4.1 Expériences <i>in vitro</i>	145
6.4.2 Expériences de suivi des particules au long terme	145
6.4.3 Évolution du poids des souris après injection intraveineuse de nanoparticules non fonctionnalisées	148

6.1 Biodistribution des nanoparticules selon leur charge de surface

L'effet des charges de surface sur la biodistribution de colloïdes est bien connu [21, 119–122]. Le but de ces expériences est donc de savoir si les nanoparticules ont un comportement identiques à d'autres systèmes colloïdaux (liposomes, virus, . . .) et

s'il est possible de suivre leur biodistribution *in vivo* en temps réel. Les nanoparticules utilisées pour l'ensemble de ces expériences sont $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$: Eu^{2+} :0,5%, Dy^{3+} :1,0%, Mn^{2+} :2,5%.



6.1.1 Particules positives

Composés cationiques utilisés en imagerie ou en thérapie

De nombreux composés cationiques sont utilisés en biologie. Les vecteurs cationiques sont en effet des vecteurs efficaces *in vitro* pour la délivrance de gènes. On pourra citer comme exemple les liposomes cationiques et les polymères du type polyéthylèneimine [123].

in vitro, leur grande efficacité est due à leur charge positive. En effet, la membrane des cellules contient des protéoglycans rendant la cellule globalement négative. Cette charge va permettre de lier non spécifiquement les complexes cationiques [124]. Toutefois, *in vivo*, on note une large accumulation des liposomes cationiques au niveau des vaisseaux et néovaisseaux (notamment tumoraux [125]) ainsi qu'une activation du complément due à l'interaction avec d'autres polyanions. [126]

Biodistribution des particules aminées

Pour les amino-NPs (chargées positivement), une rétention importante a pu être observée au niveau des poumons après injection intraveineuse. Pendant la première heure, la biodistribution des nanoparticules a peu changé, avec simplement un transfert progressif mais lent des nanoparticules des poumons vers le foie et la rate.

Deux raisons peuvent expliquer cette tendance à la séquestration dans les poumons [119]. La première est l'interaction électrostatique non spécifique des nanoparticules avec les protéines négatives couvrant la surface des cellules endothéliales, comme par exemple les glycosaminoglycanes. En effet, les poumons sont le premier organe fortement vascularisé que rencontrent les nanoparticules après une injection systémique dans la veine de la queue d'une souris. Le flux sanguin étant plus faible à cause de la circulation dans les capillaires pulmonaires, les interactions non spécifiques deviennent importantes par rapport aux autres interactions et bloquent ainsi les amino-NPs au niveau des poumons. Une autre explication peut provenir de l'agrégation des nanoparticules avec les composés du sang chargés négativement empêchant ainsi la bonne

circulation au niveau des capillaires des poumons et provoquant ainsi leur séquestration.

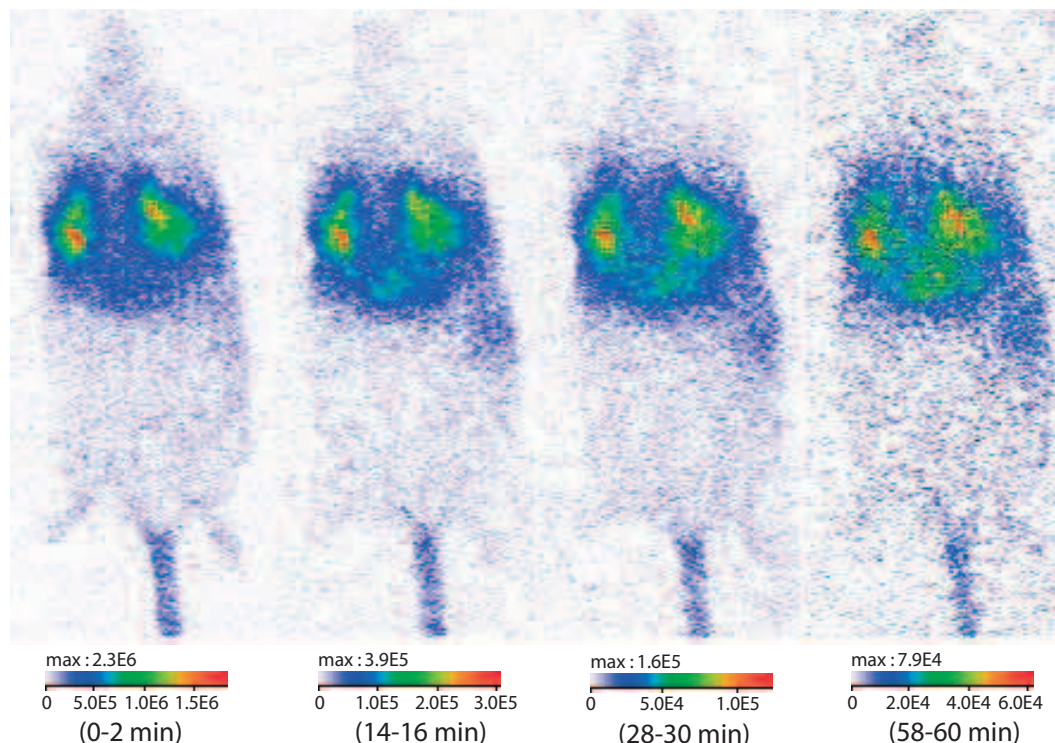


FIG. 6.1: Biodistribution observée après injection intraveineuse à une souris Swiss de particules aminées à différents temps. Les temps indiqués correspondent au temps après injection, le signal étant intégré sur 2 min. (unité : ph/s/cm²/sr)

6.1.2 Particules négatives

Composés anioniques utilisés en imagerie ou en thérapie

De nombreux constituants du sérum mais également des cellules, des virus. . . présentent dans les conditions physiologiques un potentiel de surface négatif (voir tableau 6.1).

Protéines, cellules et virus peuvent être utilisés comme vecteurs ou comme sondes pour l'imagerie. Le cas des virus est particulièrement intéressant pour le transfert de gène en thérapie génique [127]. La plupart des virus sont éliminés du sang au niveau hépatique par les cellules de Kupffer [128]. Worgall et al. ont ainsi montré que si les cellules de Kupffer ne sont pas bloqués par un traitement chimique (par exemple, par injection de sels de gadolinium), 90 % des adénovirus (qui ont une taille de 90-100 nm) sont éliminés par le foie en 24h [120, 129].

Biodistribution des particules négatives

Pour les carboxy-NPs, chargées négativement, aucune séquestration pulmonaire n'a pu être observée. Ceci est probablement dû au fait que les nanoparticules négatives n'interagissent pas avec les cellules endothéliales des poumons et restent ainsi plus

Composés biologiques	Point de charge nulle	Ref
Escherichia coli B	2,8	[130]
Serratia marcescens	2,6	[130]
Bacillus subtilis var. niger	2,9	[130]
serum albumin	4,9	[130]
Bactériophage MS2	3,9	[131]
Bactériophage PM2	7,3	[131]
Human serum albumin (HSA)	4,7-5,0	
Bovin serum albumin (BSA)	4,2-5,0	
Composés biologiques	Potentiel ζ à pH neutre	Ref
Serum de veau foetal	-5,35 mV	
Cellules NIH-3T3	-21.73 \pm 1.08 mV	[132]
virus Ecotropic	-13.24 \pm 0.68 mV	[132]

TAB. 6.1: Exemples de point de charge nulle et de potentiel ζ de certains composés biologiques

longtemps dans la circulation sanguine que les particules positives. Toutefois, une forte captation hépatique a pu être observée. Ceci résulte probablement d'une opsonisation et une captation des nanoparticules par les cellules endothéliales et de Kupffer du système réticuloendothélial (RES) [133, 134].

On retrouve ainsi une biodistribution identique aux particules non fonctionnalisées.

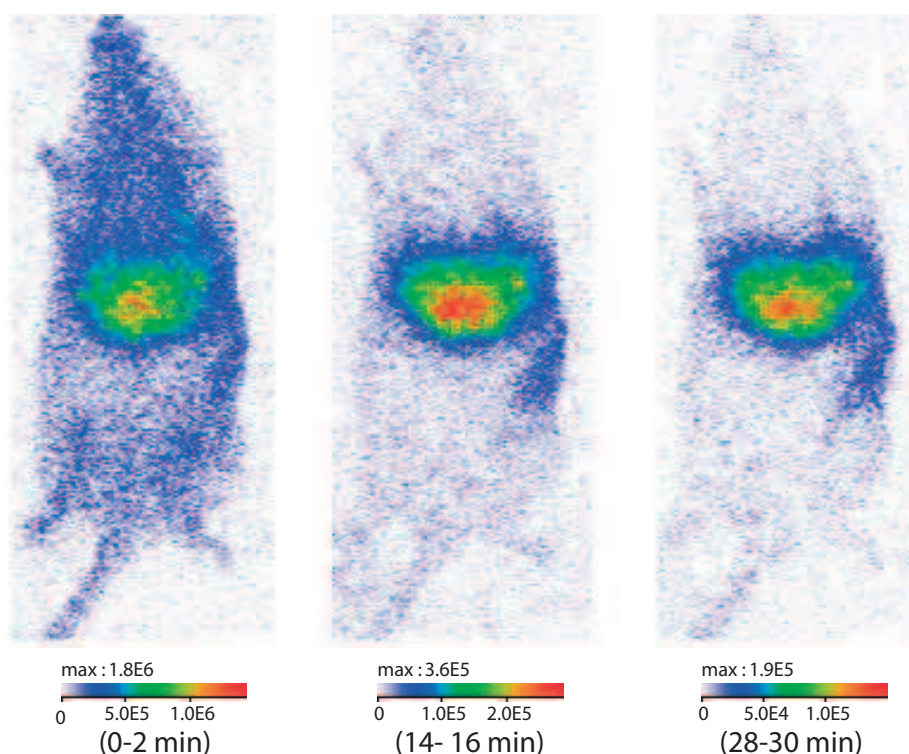


FIG. 6.2: Biodistribution observée à différents temps après injection intraveineuse à une souris SWISS de particules carboxylées. (unité : $\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$)

6.1.3 Particules neutres

Composées neutres utilisées en imagerie ou en thérapie

Il a été démontré par plusieurs auteurs que l'utilisation de PEG couvrant la surface de colloïdes (protéine, liposomes, adénovirus ...) permet de réduire une élimination rapide de la circulation sanguine par les cellules de Kupffer [135–138]. Ceci est dû à la réduction de l'interaction non spécifique avec l'ensemble des constituants du sérum (opsonisation) et des membranes de l'endothélium des vaisseaux. Grâce à cet effet, il est possible d'envisager de greffer sur les colloïdes des motifs de reconnaissance afin de cibler des zones particulières (tumeurs, zones inflammatoires...).

Biodistribution des particules neutres

Les particules recouvertes de PEG ont confirmé cette tendance à circuler pendant une durée supérieure (voir Figure 6.3). On observe ainsi après injection, un signal diffus couvrant l'ensemble du corps de la souris. La circulation des particules est observée durant la totalité de l'expérience (45 min). On note également une accumulation progressive des nanoparticules au niveau du système réticuloendothélial. En comparaison des autres types de particules, cette accumulation est beaucoup moins rapide et surtout moins importante.

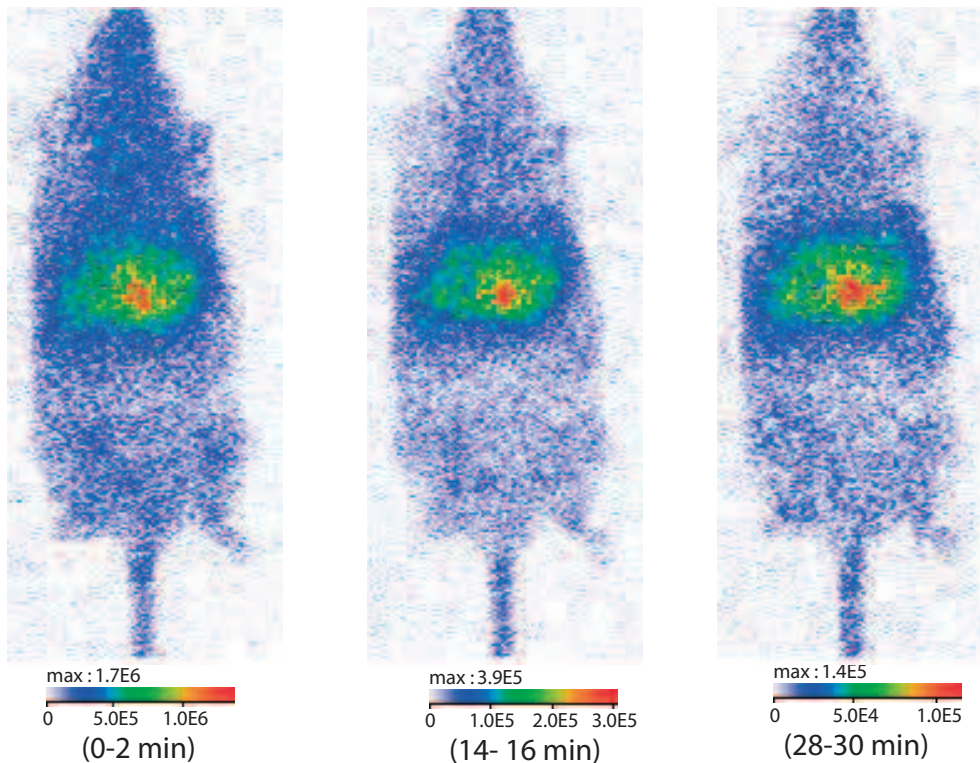


FIG. 6.3: Bisdistribution observée après injection de particules PEGylées à différents temps. (unité : $\text{ph/s/cm}^2/\text{sr}$)

6.1.4 Analyse *ex vivo* et microscopie

Analyse *ex vivo*

Juste après la fin de l'acquisition du signal optique, c'est à dire environ 1h après l'injection des nanoparticules, les animaux ont été sacrifiés et les organes principaux prélevés. Les résultats des biodistributions observées *in vivo* ont ainsi pu être confirmés au niveau des organes entier.

Pour les particules aminées, le signal au niveau des poumons est largement supérieur à celui du foie et de la rate montrant une séquestration forte de ces particules au niveau pulmonaire plus d'une heure après l'injection. La différence entre les organes est bien plus marquée *in vitro* que *in vivo*. Ceci s'explique par la différence d'absorption de la lumière par les poumons *in vitro* et *in vivo*. Les poumons *in vivo* sont remplis d'air. Il y a donc énormément de changements d'indice de réfraction entre les tissus et l'air, ce qui limite la pénétration de la lumière. *In vitro*, l'organe s'affaisse ce qui permet un meilleur transport de la lumière.

Pour les particules carboxylées, l'ensemble du signal se trouve concentré au niveau du foie et de la rate. Les intensités obtenues dans le cas de particules PEGylées est plus faible. Le rapport d'intensité entre ces deux organes est différent pour les particules PEGylées avec une proportion plus importante pour la rate.

Au niveau du sang, le signal n'est observable que dans le cas des expériences réalisées avec les particules PEGylées. Ceci est dû à une meilleure circulation des particules. Nous n'avons toutefois pas dosé ces particules pour connaître de façon plus précise la quantité

circulante.

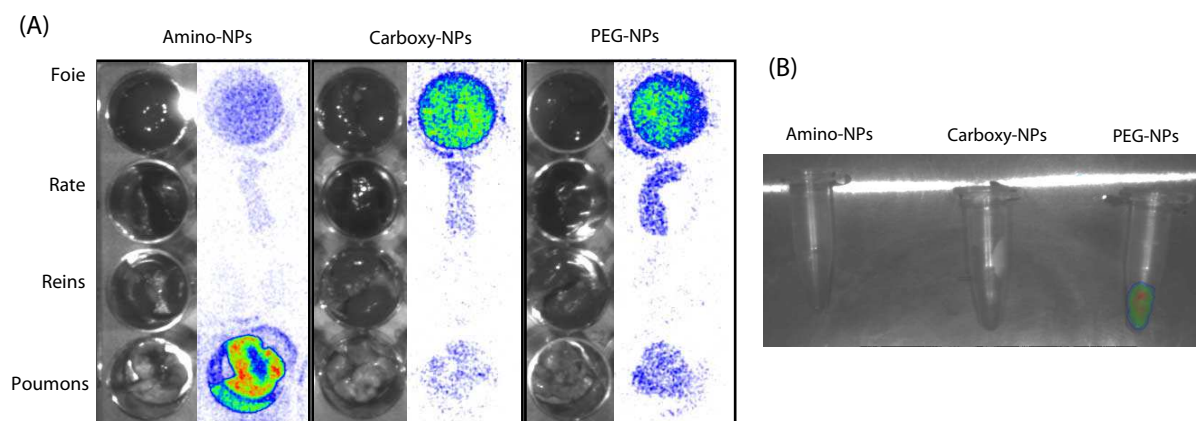


FIG. 6.4: Signaux détectés après sacrifice des souris sur différents organes et dans le sang selon les particules utilisées. Les animaux ont été sacrifiés 1h après injection des particules et les organes prélevés. Les organes ne sont pas irradiés mais directement analysés. (A) Signaux du foie, de la rate, des reins et de la rate (B) Signaux du sang.

Microscopie optique

Nous disposons grâce à l'analyse *ex vivo* de données concernant la répartition des particules selon les organes, les organes étant considérés comme des entités homogènes. La microscopie optique, de par sa résolution, permet une analyse plus fine de la biodistribution des particules au niveau tissulaire.

Ne disposant pas de système permettant de réaliser une acquisition décalée par rapport à l'excitation, il était nécessaire de réaliser les observations en fluorescence. Les particules sont fluorescentes par excitation UV mais l'autofluorescence des tissus est très forte à ces longueurs d'onde. L'acquisition du signal est donc grandement affectée en microscopie optique. Nous avons utilisé pour effectuer les observations sur coupes d'organes les particules marquées au FITC. Deux expériences *in vivo* ont été conduites pour corroborer les biodistributions observées *in vivo* : la première utilisant des particules marquées FITC avec une charge de surface positive, la deuxième utilisant des particules neutres FITC. Ces dernières ont été injectées à une souris portant une tumeur afin de voir une éventuelle extravasation des particules au niveau de la tumeur qui n'aurait pas été détectée au niveau macroscopique.

La figure 6.5 montre la répartition des particules positives et neutres dans les poumons. Pour différencier les particules et l'autofluorescence des tissus, les images présentées sont la superposition de deux images : l'une prise avec une excitation bleue permettant l'observation des particules dans le vert avec des signaux parasites dus à l'autofluorescence et une acquisition avec une excitation verte permettant d'évaluer l'autofluorescence des tissus sans exciter les particules. Les deux images sont alors additionnées permettant de faire ressortir l'emplacement des particules.

Les résultats concordent avec les expériences en luminescence persistante, à savoir une forte rétention au niveau des poumons pour les particules positives et une absence

de marquage pour les particules PEGylées.

On observe de plus pour les particules positives, des amas au niveau des vaisseaux. Ceci peut être dû soit à une floculation des particules avec les protéines du sérum (qui sont négatives), soit à une interaction forte avec la surface des vaisseaux. Il est difficile de savoir lequel de ces deux phénomènes est la cause principale de la rétention dans les poumons. En effet, on observe clairement une floculation des particules positives *in vitro* en présence de sérum. Toutefois, ce phénomène peut être contrebalancé *in vivo* par l'agitation due au flux sanguin. Si la floculation intervient tout de même, la séquestration serait due à la taille des amas.

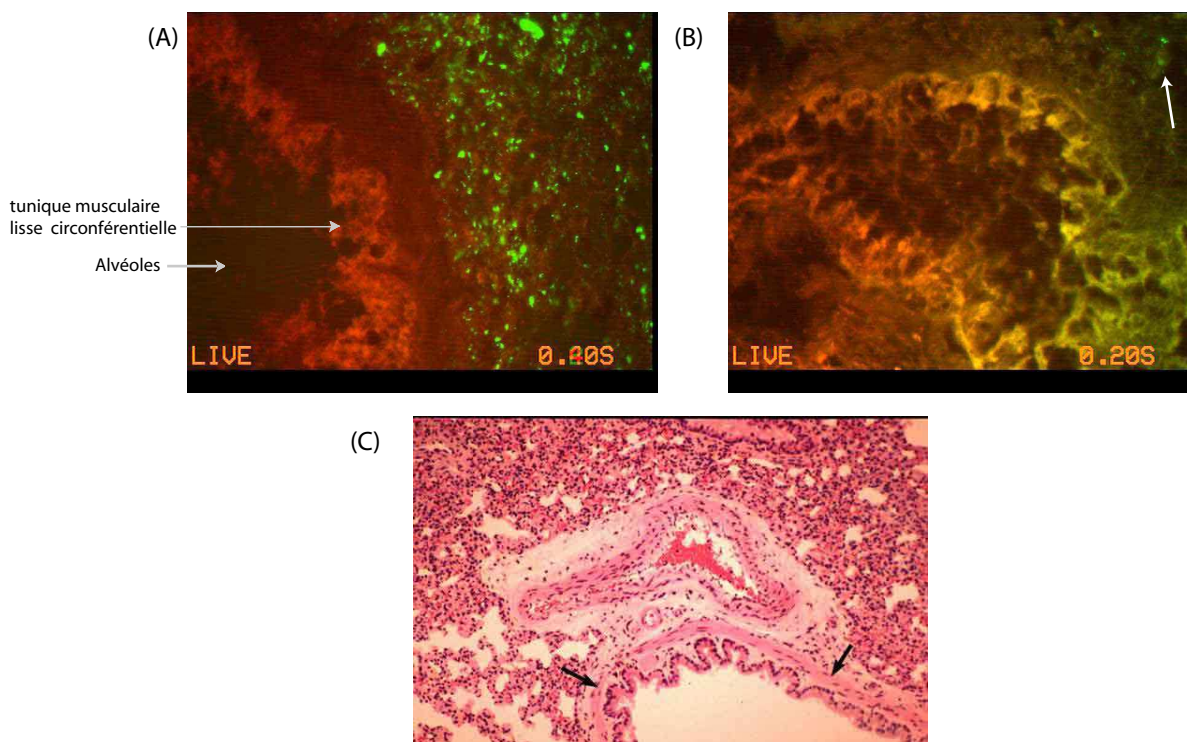


FIG. 6.5: Microscopie optique réalisée sur coupe de poumons de souris après injection (A) de particules FITC-aminées (B) de particules FITC-PEGylées. (grossissement $\times 400$) (C) Coupe histologique d'un poumon de souris. Les flèches noires indiquent une alvéole.

La figure 6.6 présente les résultats obtenus pour le foie. Une répartition homogène des particules est observée avec les particules positives ou neutres. Les particules positives retrouvées dans le foie ne se présentent pas particulièrement sous forme d'amas. L'agrégation des particules négatives dans le sérum *in vivo* n'est donc pas général. Il est à noter que des particules sont retrouvées relativement éloignées de vaisseaux sanguins correspondant à une captation par les cellules de Kupffer (voir Figure 6.6 B), même si la majorité des particules se trouve à proximité.

Comme il a été vu, la quantité de particules retrouvée dans la rate augmente en quantité relative dans le cas d'une injection de particules neutres. Par microscopie, il est possible d'observer clairement la répartition des particules PEGylées dans cet organe (voir Figure 6.7), avec le marquage de structure en forme de cercle. La rate est constituée de 2 structures principales : la pulpe rouge et la pulpe blanche [139]. Les

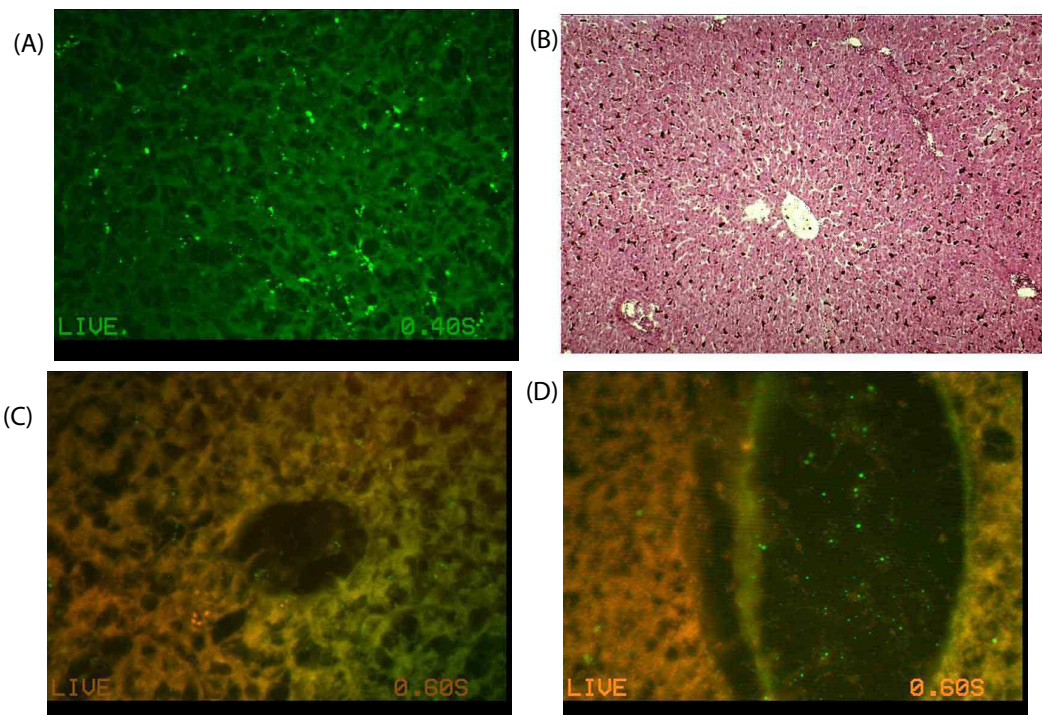


FIG. 6.6: Microscopie optique réalisée sur coupe de foie de souris après injection (A) de particules FITC-aminées (grossissement $\times 400$)(B) Coupe histologique d'un foie de souris. Les points noirs correspondent à des billes de polystyrene captées par les cellules de Kupffer. La distribution des nanoparticules synthétisées est similaire (C-D) Coupe de foie après injection de particules FITC-PEGylées.(grossissement $\times 1000$). On notera la présence importante de particules au niveau du réseau sanguin

images en microscopie montrent clairement une distribution des particules au niveau de la pulpe blanche, celle-ci contenant environ 1/4 des lymphocytes. Il semble donc que les particules PEGylées soient captées par ces lymphocytes au niveau de la zone marginale.

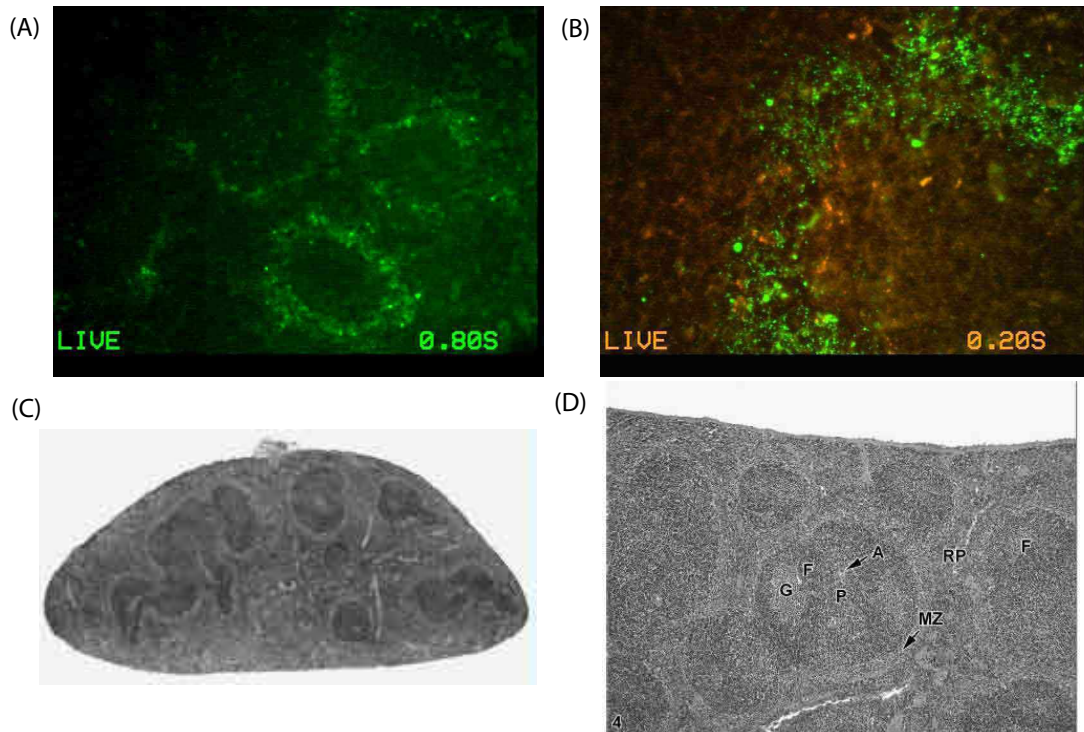


FIG. 6.7: Microscopie optique réalisée sur coupe de rate de souris après injection de particules FITC-PEGylées(A) grossissement $\times 400$ (B) grossissement $\times 1000$ (C-D) coupe histologique de la rate, les parties les plus foncées correspondant à la pulpe blanche. A : artère centrale, P : Gaine lymphoïde periartériale, MZ : zone marginale, RP : pulpe rouge G : centre germinale, F : follicule, MS : sinus marginale, MZ : marginal zone (d'après [139])

6.1.5 Effet de l'injection de compétiteurs du système réticulo-endothélial sur la biodistribution

Le système réticulo-endothélial (SRE) garantit la défense de l'organisme face à des composés étrangers en les éliminant de la circulation sanguine. Une méthode largement employée pour augmenter le temps de résidence des nanoparticules dans le flux sanguin est d'enrober les particules d'une couche de polyéthylène glycol. Une autre méthode, moins utilisée, consiste à saturer les récepteurs du SRE afin de limiter leur efficacité à séquestrer des corps étrangers. Un composé classiquement utilisé est l'acide polyinosinique [133, 140]. Il s'agit d'un polyanion interagissant fortement avec les cellules de Küpffer. Les sels de Gadolinium sont également utilisés [141].

Après avoir réalisé des expériences avec l'acide polyinosinique, nous avons testé l'effet d'une préinjection de liposomes anioniques. En effet, les liposomes contenant une

quantité équimolaire de phosphatidylcholine, cholestérol et phosphatidylsérine dont la synthèse est détaillée en Annexe A, ont été décrits comme étant rapidement éliminés par le SRE [142]. Les liposomes synthétisés possèdent un potentiel ζ négatif (-43,3 mV) avec un diamètre d'environ 300 nm. L'effet observé avec une préinjection d'acide polyinosinique était notable mais inférieur à celui obtenu lors d'une préinjection de liposomes anioniques. Les liposomes anioniques ($6 \mu\text{mol}$, $100 \mu\text{L}$) sont injectés 5 min avant les particules afin de limiter le nombre possible de sites d'interaction.

L'injection préalable de liposomes a permis d'augmenter grandement le temps de circulation (voir Figure 6.10 au paragraphe suivant) des carboxy-NPs chargés négativement chez la souris, même si ces particules se sont finalement localisées dans le foie et la rate (voir Figure 6.8).

L'effet d'une préinjection de liposomes anioniques a eu un effet plus important sur le temps de circulation des PEG-NPs (voir Figure 6.9). Le signal obtenu était en effet diffus pendant plus d'une heure montrant ainsi la présence des nanoparticules dans la vascularisation de la souris. Il est à noter que les artères fémorales et les carotides ont pu être visualisées. Après 15 min, le contour de la rate était clairement visible alors que 30 min ont été nécessaires pour que le contour de foie ressorte de la circulation périphérique du haut du corps de la souris. Des résultats similaires ont été obtenus par l'utilisation d'acide polyinosinique avec un effet légèrement inférieur.

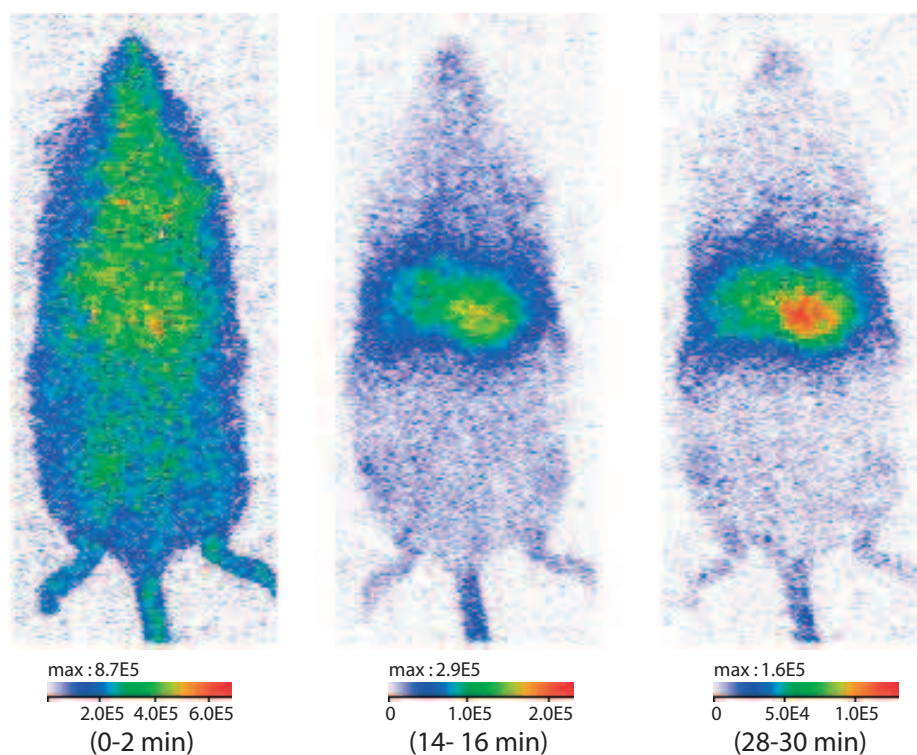


FIG. 6.8: Effet de la préinjection de liposomes anioniques sur la biodistribution de particules carboxylées

Ainsi, même si la préinjection de composés interagissant avec le RES n'altère pas la biodistribution finale des nanoparticules, cela améliore de façon nette le temps de circulation des dernières et ainsi la possibilité d'obtenir un ciblage spécifique.

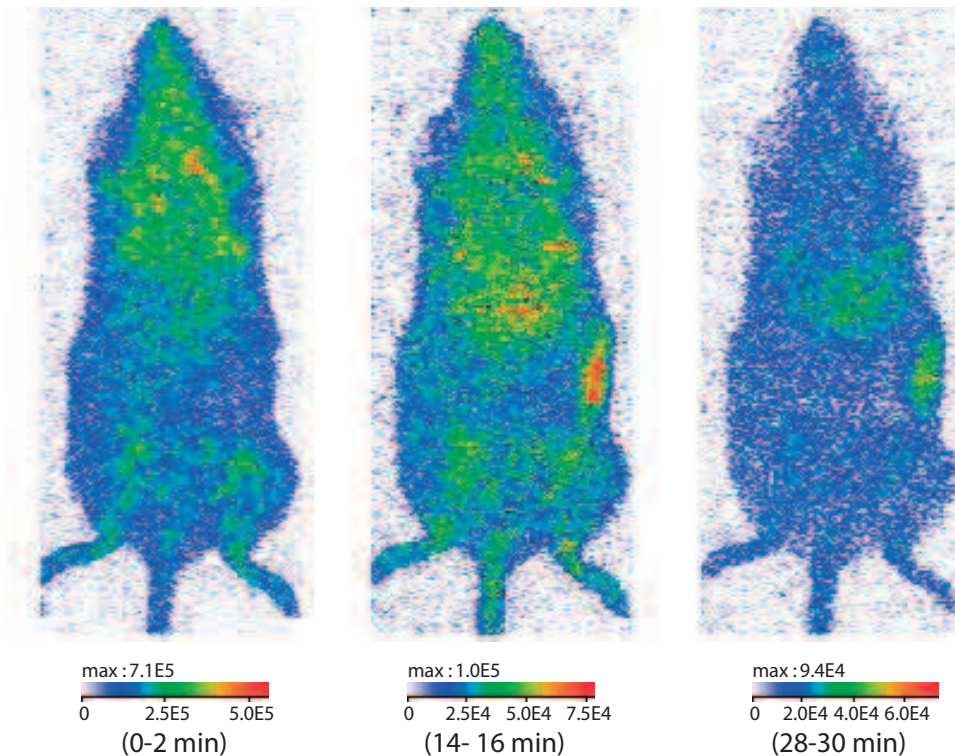


FIG. 6.9: Effet de la préinjection de liposomes anioniques sur la biodistribution de particules PEGylées

6.1.6 Temps de circulation des nanoparticules dans le sang

Pour évaluer le temps de circulation des nanoparticules, une région d'intérêt (ROI) couvrant les poumons, le foie et la région de la rate (ROI_1) a été sélectionnée manuellement et analysée par période de 20 s. L'intensité a ensuite été divisée par l'intensité lumineuse totale du corps (ROI_2) détectée pour chaque souris.

Il est possible d'estimer la concentration sanguine des nanoparticules en faisant le rapport entre l'intensité de ROI_1 sur ROI_2 . La quantité circulante est alors mesurée par $F(t)$ selon :

$$F(t) = 1 - \frac{ROI_1}{ROI_2}. \quad (6.1)$$

Comme décrit dans la Figure 6.10, pour les amino-NPs, le pourcentage de luminescence dans la région SRE-poumons est élevé (75%) une seconde après l'injection et ne fluctue pratiquement pas. Pour les carboxy-NPs, la courbe diminue rapidement de 0,5 à 0,2 en approximativement 10 min, et la pré-injection de liposomes anioniques augmente le niveau initial à 0,65. Le temps de circulation est également prolongé au vu du temps nécessaire pour retrouver des niveaux similaires au cas où les NPs sont injectées seules. Pour les PEG-NPs, le niveau initial est élevé (0,65). La courbe diminue plus lentement, et le niveau est finalement de 0,4 après 1 heure. Ce niveau est plus faible que pour l'autre type de NPs résultant de "l'effet stealth" du domaine PEG sur le temps de circulation. La pré-injection de liposome avant l'injection PEG-NPs permet une circulation des NPs durable.

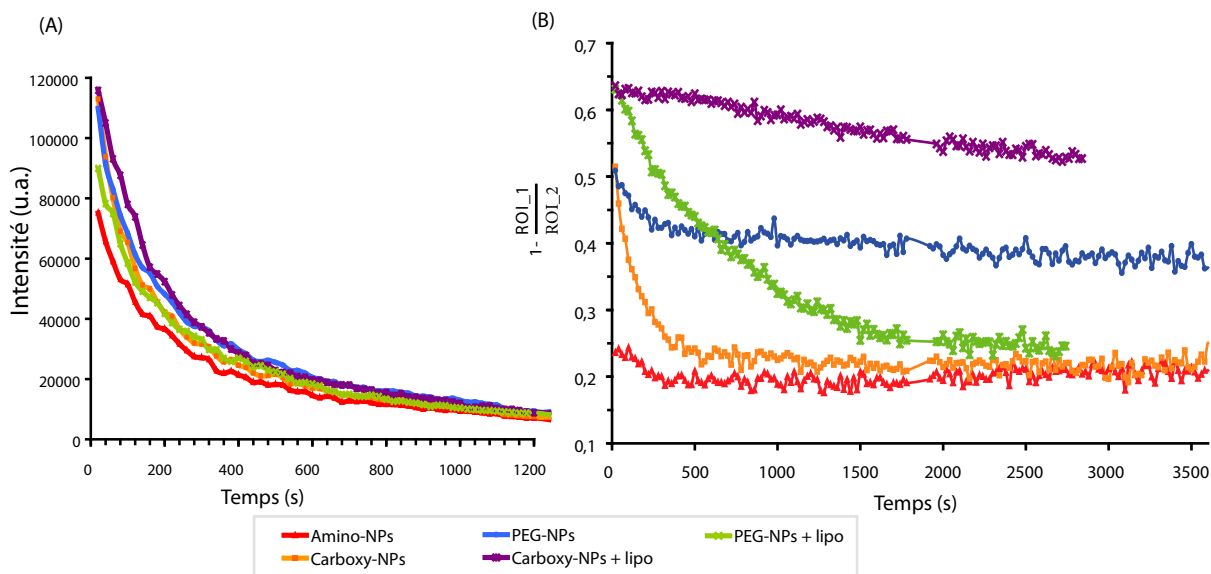


FIG. 6.10: (A) Intensité totale retrouvée en définissant une ROI couvant l'ensemble de l'animal selon la particule injectée (B) Rapport entre les intensités provenant d'une région d'intérêt couvrant poumons, foie et rate et l'intensité totale détectée sur l'ensemble de l'animal. Ce rapport permet d'estimer la quantité de particules captées par l'ensemble poumons-foie-rate et donc la quantité de particules circulantes

6.2 Détection de tumeurs

Avant d'envisager des expériences de ciblage, nous voulions savoir si les nanoparticules étaient capables de révéler l'emplacement d'une tumeur implantée chez une souris. Le rationnel de cette approche est basé sur deux hypothèses.

La première provient du fait que la plupart des tumeurs sont des zones hypervascularisées. Lors des expériences utilisant les particules PEGylées, nous avons pu visualiser les principales artères de la souris (artères fémorales et artères irriguant le cerveau).

La deuxième hypothèse sur laquelle nous comptons pour visualiser la tumeur était l'effet de ciblage passif [143, 144]. De nombreux auteurs ont en effet montré qu'il était possible de cibler une tumeur sans avoir recourt à des motifs de reconnaissance. Le système vasculaire d'une tumeur est en effet souvent chaotique et peut avoir des "fuites". Les particules pouvant rester de façon prolongée dans la circulation auraient ainsi tendance à s'extravaser au niveau des ruptures de l'endothélium vasculaire et ainsi rester bloquer dans la tumeur.

Deux types de tumeurs ont été utilisées : une tumeur issue d'un carcinome pulmonaire de Lewis (3LL) et une tumeur de type mélanome B16. Pour augmenter nos chances de réussite, nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales qui avaient permis le temps de circulation des nanoparticules le plus important. C'est pourquoi nous avons réalisé une préinjection de liposomes anioniques ($6 \mu\text{mol}$, $100 \mu\text{L}$) 5 min avant l'injection de particules PEGylées.

Lors de cette expérience, nous avons partiellement rasé la souris afin d'éviter l'absorption de lumière par les poils de la souris. Sans cela, le signal serait à peine détectable. Malgré l'absence de poil, la présence de mélanine a engendré une forte diminution du

signal détecté en comparaison de celui détecté dans les expériences sur souris Swiss (voir Figure 6.11). Ainsi, même si les souris C57Bl/6 sont généralement de taille plus petite, la présence de mélanine abaisse le signal d'un facteur 5 à 10, ce qui réduit d'autant la durée possible de suivi des particules *in vivo*.

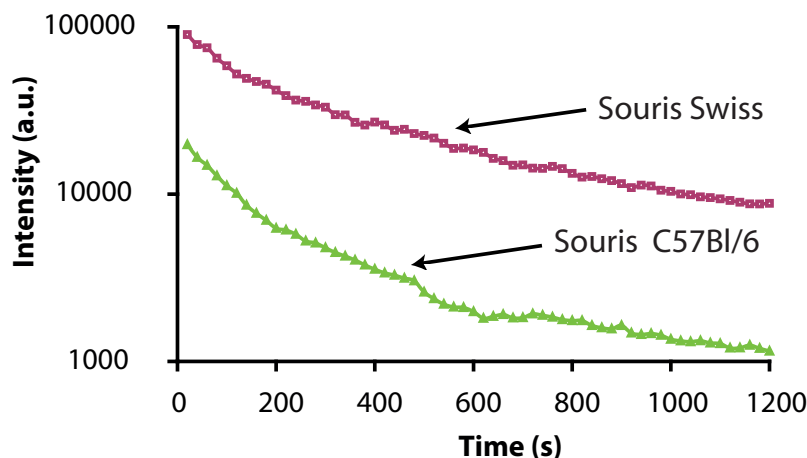


FIG. 6.11: Intensité lumineuse récupérée après injection intraveineuse de nanoparticules dans deux types de souris (souris Swiss, souris C57Bl/6)

6.2.1 Tumeurs 3LL

Les tumeurs 3LL (ou LLC) sont un modèle tumoral largement utilisé pour étudier des traitements anticancéreux. Il s'agit d'une lignée cellulaire issue d'un carcinome pulmonaire spontané de souris C57Bl/6 découverte par Dr. M. Lewis en 1951. La tumeur est relativement homogène et solide avec une importante vascularisation extrêmement hémorragique. Ces tumeurs ont été implantées en sous-cutané dans le flanc de souris femelles C57Bl/6 de 5 semaines. L'implantation d'un fragment de tumeurs se fait à l'aide d'un trocart. De 10 à 14 jours après l'implantation, nous avons réalisé les expériences de biodistribution. Les tumeurs étaient relativement importantes avec des tailles de l'ordre du cm. La visualisation de l'emplacement de la tumeur était donc clairement identifiable à l'oeil.

Après injection intraveineuse de particules PEGylées après préinjection de liposomes anioniques, nous avons observé une augmentation du signal au niveau de la tumeur, ce qui permet de distinguer clairement le contour de la tumeur (voir Figure 6.12). La visualisation de la tumeur n'est pas pénalisée par la présence proche de l'artère fémorale qui engendre elle aussi un fort signal et ce malgré la diffusion de la lumière dans les tissus.

Nous n'avons pas observé un ciblage passif important pour cette expérience. Comme nous avons pu le voir en microscopie en réitérant l'expérience avec des particules possédant du FITC en surface, très peu de particules sont détectables sur coupes (voir Figure 6.13). Ceci peut s'expliquer par l'élimination extrêmement rapide des particules en comparaison des expériences faites sur des souris Swiss. Il a été montré que les mécanismes d'élimination par le système réticulo-endothélial pouvaient varier selon les

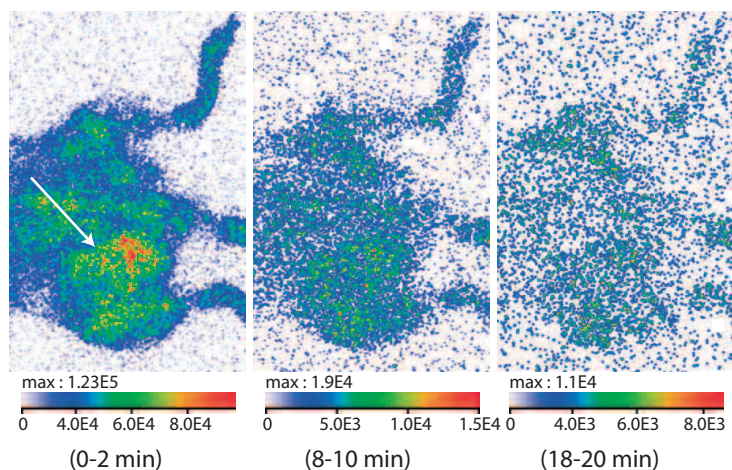


FIG. 6.12: Visualisation de l'hypervascularisation d'une tumeur 3LL implantée dans le flanc d'une souris C57Bl/6

espèces. Toutefois, une étude approfondie serait nécessaire pour mieux comprendre une telle différence entre les souris Swiss et les souris C57Bl/6.

6.2.2 Tumeurs B16

Les tumeurs B16 sont issues d'une lignée cellulaire de mélanome. Elles contiennent donc une importante quantité de mélanine, pigment absorbant fortement la lumière. De plus, en comparaison des tumeurs 3LL, les tumeurs B16 sont moins vascularisées.

L'expérience d'injection intraveineuse a été conduite de la même façon avec pré-injection de liposomes anioniques. Les résultats de cette expérience sont en revanche opposés. La tumeur n'est pas détectable. Toutefois, comme les tissus environnants absorbent moins et sont également vascularisés, la tumeur est tout de même identifiable par une absence de signal. Il s'agit en quelque sorte d'un équivalent du contraste négatif qui est obtenu en IRM avec des agents T_2 .

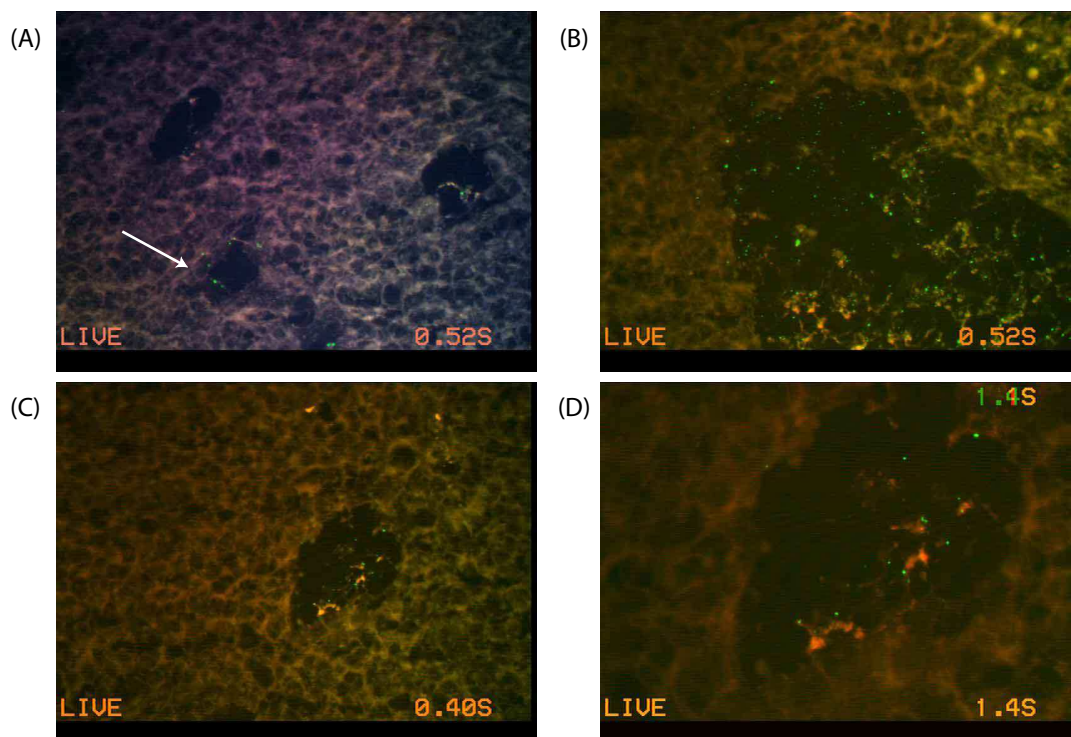


FIG. 6.13: Microscopie optique d'une coupe de tumeur 3LL après injection des particules PEGylées. L'animal a été sacrifié 30 min après l'injection des particules. On notera la présence importante des particules au niveau du système sanguin. Nous n'avons pas observé d'extravasation des particules au niveau de la tumeur.

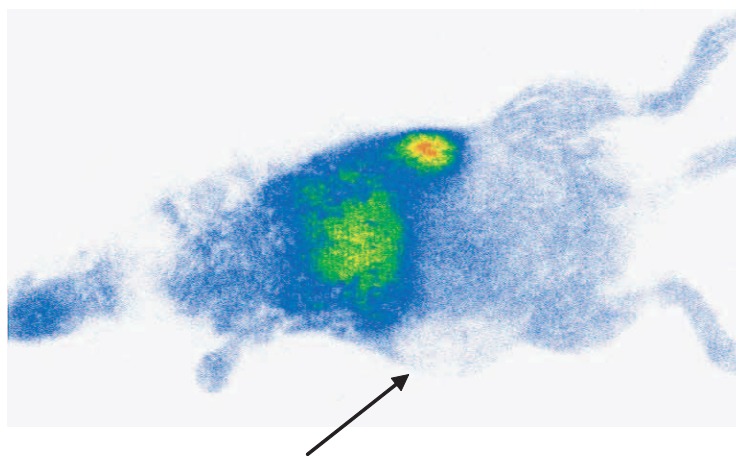


FIG. 6.14: Visualisation par contraste négatif d'une tumeur B16 implantée dans le flanc d'une souris C57Bl/6

6.3 Évaluation de la reperfusion du foie après ischémie partielle

Nous venons de voir que les nanoparticules permettent de visualiser facilement la vascularisation d'une souris. Les expériences présentées ici ont eu pour but de visualiser et d'analyser des différences de perfusion au niveau hépatique dans un modèle d'ischémie/reperfusion. Ce travail a débuté avec Charles-Henry Cottart, Isabelle Margail, Valérie Nivet-Antoine et Michel Vamy du Laboratoire de Physiologie Humaine et Expérimentale de la faculté de pharmacie (Université Paris Descartes).

Les dommages liés à une ischémie/reperfusion (I/R) du foie interviennent dans de nombreux cas cliniques comme des chirurgies du foie, les transplantations ou des chocs hémorragiques. L'ischémie/reperfusion provoque des dommages importants au niveau de l'organe. Comme il est supposé que la reperfusion joue un rôle prépondérant dans les dommages liés à l'I/R, nous avons essayé de suivre cette reperfusion avec les nanoparticules à luminescence persistante.

En effet, comme nous l'avons vu lors des expériences réalisées sur la biodistribution des particules selon leur charge, les particules sont très rapidement éliminées de la circulation par capture hépatique. L'hypothèse de ce travail était que la distribution de particules *in vivo* refléterait le niveau de perfusion de l'organe.

L'ischémie hépatique partielle est réalisée en clampant (c'est à dire en bloquant physiquement) les vaisseaux sanguins (veine porte et de l'artère hépatique) irriguant les lobes caudal et latéral droit (environ 70 % du parenchyme hépatique). Les parties du foie ischémiées sont alors le lobe médian et le lobe latéral gauche. Après 45 min, la bride est alors enlevée en permettant la reperfusion des tissus. La reperfusion est relativement rapide puisque l'ensemble du foie est à nouveau perfusé environ 15 min après libération du clamp. Les dommages liés à l'ischémie/reperfusion sont toutefois plus durables et durent environ 2 jours.

Les animaux sont sacrifiés à la fin de la période de reperfusion. Le dommage au foie est évalué en mesurant l'activité des enzymes cytolitiques dans le plasma (transaminase d'aspartate – ASAT – et transaminase d'alanine –ALAT) par des techniques automatisées. Ces enzymes ont été dosées dans le cas d'injection de particules pour savoir si celles-ci n'engendraient pas de dommages supplémentaires.

6.3.1 Expériences de visualisation de la reperfusion avec les nanoparticules

Afin de tester la faisabilité de cette étude, nous avons réalisé des expériences préliminaires. L'analyse des résultats a été effectuée *ex vivo*, les résultats *in vivo* étant plus difficiles à exploiter.

Lors d'une injection de particules à luminescence persistante non fonctionnalisées sur un foie ischémié, il apparaît clairement une luminescence différentielle entre lobes ischémiés et non ischémiés (voir Figure 6.15). Comme attendu, la luminescence se situe en effet uniquement dans les lobes caudal et latéral droit (marqués sur la figure 6.15 par NI). Lorsque l'injection se fait 5 min après la fin de l'ischémie, on note également une différence de luminescence entre lobes caudaux et lobes médians, montrant ainsi

que la reperfusion n'est pas encore totale. Si l'injection est faite sans qu'il y ait eu ischémie, la luminescence issue du foie est quasiment homogène avec toutefois une intensité surfacique légèrement supérieure pour les lobes médians.

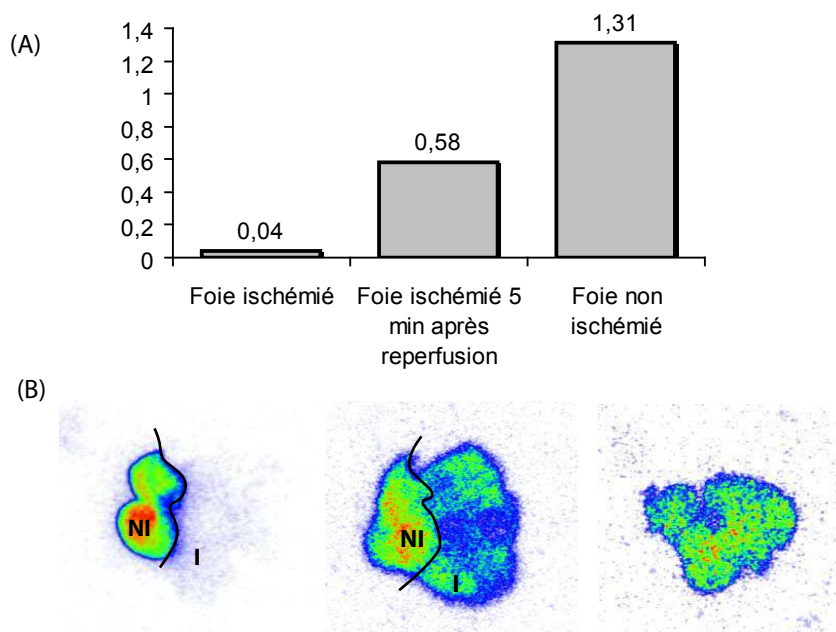


FIG. 6.15: Images de foie après dissection (A) rapport des intensités entre lobes caudaux et lobes médians (B) images de foies (NI : lobes non ischémiés, I : lobes ischémiés)

Un des avantages de la technique de luminescence persistante est la possibilité de doser directement la quantité de nanoparticules sur organe entier (ou de façon plus précise sur un échantillon). Il n'est en effet pas nécessaire d'extraire le fluorophore pour faire la mesure comme il est classiquement fait en imagerie de fluorescence.

Nous avons donc effectué ces dosages sur une cohorte plus importante d'animaux. Ces résultats de dosages concordent avec les données macroscopiques. Toutefois, les rapports de luminescence entre lobes caudaux et lobes médians sont nettement différents pour 3 souris du lot (marqué par un cercle rouge sur la figure 6.16). Les deux dernières souris correspondent à des souris dont l'injection ne s'est pas bien passée (l'injection est restée au niveau de la queue) tandis que les données issues de la troisième souris ischémiée correspondent à une absence totale de reperfusion après enlèvement du clamp. En connaissant le degré de reperfusion, cela nous a permis d'analyser plus facilement les données de toxicologie en enlevant les points aberrants (voir Figure 6.16).

6.3.2 Évaluation de la toxicité hépatique des nanoparticules

Le but final de ces expériences est de pouvoir visualiser et quantifier l'effet de molécules chimiques capables de modifier la reperfusion du foie après ischémie (vasodilatateur, donneur de NO \cdot). Cette étude est en cours. Avant d'étudier l'effet de ces molécules, il fallait s'assurer que la présence de particules n'allait pas modifier le fonctionnement du foie dans l'intervalle des expériences (entre 6 h et 24h).

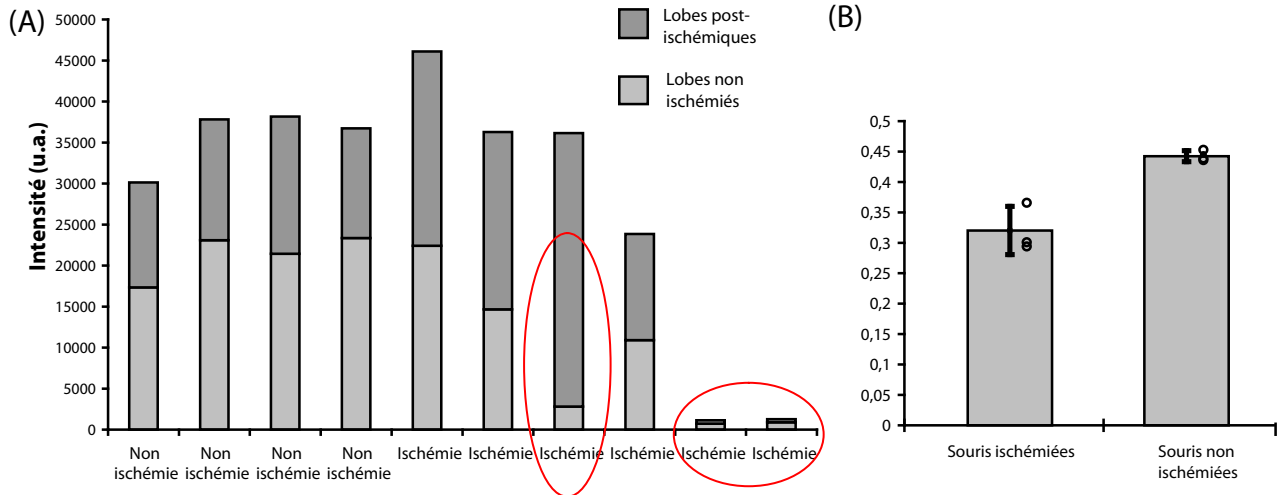


FIG. 6.16: (A) Luminescence détectés dans les lobes post ischémiques et non ischémisés (B) rapport entre l'intensité des lobes post-ischémiques sur l'intensité totale du foie.

C'est pourquoi, nous avons dosé la libération des enzymes ALAT et ASAT après injection intraveineuse de particules. Ces enzymes sont en effet libérées lorsqu'un dommage tissulaire important intervient.

ASAT et ALAT

Les transaminases sont des enzymes qui interviennent dans la synthèse et la dégradation des acides aminés. Elles se trouvent soit au niveau du cytoplasme ou des mitochondries. Les deux transaminases les plus étudiées en biologie sont les suivantes :

- alanine aminotransférase (ALT ou ALAT), également appelée transaminase glutamique-pyruvique (TGP ou GPT, ou encore SGPT) ; cette enzyme se trouve en quantité plus importantes dans le foie. Elle catalyse le transfert du groupement NH_2 de l'alanine sur l'acide glutamique. Le sérum normal en contient peu.
- aspartate aminotransférase (AST ou ASAT), également appelée transaminase glutamique oxalo-acétique (TGO ou GOT ou encre SGOT). L'ASAT se trouve en quantité comparable dans différents tissus, comme le coeur, le foie et les muscles. Elle catalyse le transfert du groupement NH_2 de l'acide aspartique sur l'acide α -cétoglutarique.

Résultats des dosages dans les expériences de reperfusion

Nous n'avons pour l'instant que deux types de résultats concernant la reperfusion. Les premiers concernent l'effet des nanoparticules sans ischémie. Lors des expériences d'ischémie/reperfusion, le foie est déplacé manuellement afin de pouvoir positionner le clamp. Cette manipulation causant des dommages, le foie est soulevé de façon équivalente mais sans effectuer de clampage.

Les résultats de cette étude sont présentés à la figure 6.17. Les échantillons de sang servant au dosage des enzymes ont été prélevés 6 h après injection (temps auquel une hausse significative des ces enzymes est observée après une expérience d'ischémie/re-

perfusion). Pour les souris non ischémiées, on note une légère augmentation du taux d'ASAT et taux équivalent d'ALAT. Même s'il n'y a pas assez de souris pour réaliser des tests statistiques et que l'acte chirurgical pratiqué engendre une très forte variabilité interindividuelle, les nanoparticules semblent avoir un léger effet délétère au niveau hépatique. Toutefois, l'effet est faible comme on peut le voir en comparant ces données avec celles obtenues lors d'une ischémie/reperfusion. L'expérience consistant à doser ces enzymes lors d'une simple injection de particules (c'est à dire sans acte chirurgicale) permettrait de mieux appréhender la libération d'enzyme lié uniquement aux nanoparticules.

Les taux observés après l'expérience d'ischémie/reperfusion sont environ 50 fois supérieures à ceux de l'expérience précédente. La variabilité étant encore plus élevée, il est difficile de conclure surtout avec le petit nombre de souris de l'expérience (seulement trois au final pour les souris ischémiées). Il est toutefois possible de supposer que l'injection de particules n'engendrera pas de forte augmentation du taux d'enzymes libérées.

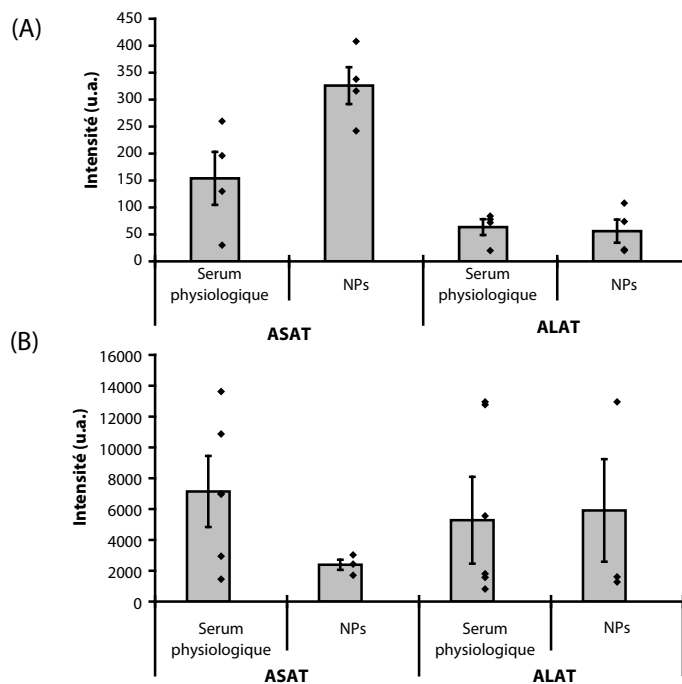


FIG. 6.17: Résultats des dosages des enzymes ASAT et ALAT (A) sur des souris non ischémiés (B) 6h après ischémie/reperfusion.

En conclusion, les nanoparticules à luminescence persistante permettent d'avoir des informations de façon rapide et simple sur le degré de reperfusion à un instant donné. Cette méthode bien qu'invasive (les souris sont sacrifiées) devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de reperfusion. Elle devra tout de même être comparé à des méthodes plus classiques comme l'échographie.

L'injection de nanoparticules ne semblent pas avoir un impact important sur les deux enzymes principalement dosées dans ces expériences d'ischémie/reperfusion. Il semble donc réaliste d'étudier l'effet de molécules modifiant la cinétique de reperfusion à l'aide des nanoparticules, et ce sans modifier de façon importante le suivi des

dommages liés à l'ischémie. L'idéal serait bien entendu de pouvoir suivre *in vivo* la reperfusion. En imagerie plane, il paraît difficile de réaliser cette étude. En revanche l'utilisation d'acquisition tridimensionnelle (et temporelle à savoir une acquisition 4D) devrait permettre de réaliser ces expériences.

6.4 Tolérance des nanoparticules : études toxicologiques préliminaires

Il existe aujourd'hui un grand débat sur la toxicité de nano-objets quelqu'ils soient (quantum dots, nanotubes, oxyde de zinc, oxyde de titane . . .). Il s'agit d'un problème important car certains de ces produits font partis de produits commerciaux grand public alors que les études de leur toxicité sont souvent contradictoires (voir par exemple le rapport de 2006 de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (Afsset) sur les nanomatériaux [145]).

Le but de ce travail n'est bien entendu pas de réaliser une étude complète de toxicité mais d'apprécier sommairement la tolérance des particules *in vivo*. Nous avons réalisé quelques expériences afin de savoir si les nanoparticules possèdent une toxicité aigüe. Des tests cellulaires et *in vivo* ont été mis en oeuvre.

6.4.1 Expériences *in vitro*

Nous avons réalisé un test classique utilisé pour tester la toxicité de produits chimiques. Celui-ci consiste à mettre en présence le produit avec une culture cellulaire en dose croissante et à déterminer une dose létale pour 50% des cellules (IC50). La viabilité des cellules est dosée par le test MTT qui permet de refléter le fonctionnement des mitochondries. Il est alors possible de revenir au nombre de cellules tuées.

Dans notre cas, nous avons trouvé sur une culture de cellules de mélanome B16 après exposition aux nanoparticules pendant 48h à 37°C sous 5% de CO₂, un IC50 au delà de 100µg/mL (voir Figure 6.18). La comparaison avec d'autres systèmes colloïdaux n'est pas évidente, la toxicité des particules dépendant de leur composition chimique, de leur taille, de leur surface spécifique, de leur fonctionnalisation, du type cellulaire utilisé, du temps d'exposition. . . Toutefois, l'IC50 observé pour des systèmes colloïdaux équivalents se trouve entre 10 et 500µg/mL [146–149].

6.4.2 Expériences de suivi des particules au long terme

Nous voulions savoir si les nanoparticules pouvaient être éliminées de l'animal après injection intraveineuse. Pour cela, un groupe de 30 souris Swiss a reçu le même jour par injection i.v. une suspension de nanoparticules non fonctionnalisées (1 mg par souris). Le groupe contrôle a été injecté avec du sérum physiologique. Pour savoir si les nanoparticules pouvaient être éliminées, les souris ont été sacrifiées par groupe de 4, leurs organes ont été prélevés (foie, rate, reins et poumons) et la quantité de nanoparticules dosée dans chaque organe. Il est à noter qu'aucune souris n'est morte lors de l'injection ni durant l'ensemble de l'expérience.

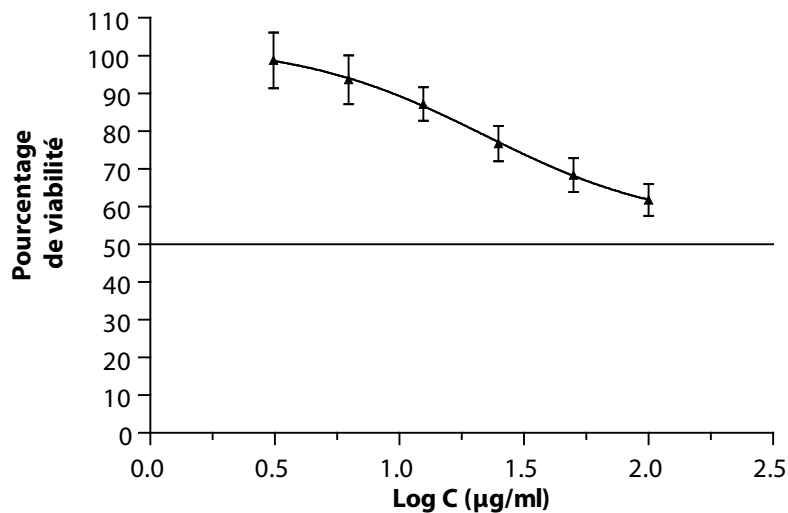


FIG. 6.18: Résultat du test MTT des nanoparticules non fonctionnalisées sur des cellules B16.

Grâce aux propriétés de luminescence persistante des particules, il est en effet possible de doser les particules dans un organe et ce, sans à avoir à extraire les nanoparticules. Pour ce dosage, les organes sont prélevés et pesés. On ajoute alors une quantité de PBS 10 mM équivalente à 5mL par g d'organes. L'ensemble est ensuite broyé grossièrement à l'aide d'un broyeur mécanique. La luminescence est alors directement détectée dans une plaque 96 puits noire à l'aide d'un luminomètre (Wallac Victor² de Perkin Elmer) sur une quantité de 100µL en mode phosphorescence europium (delay time : 10 ms, gate time :3 ms, cycle time :13 ms). Nous aurions également pu utiliser la caméra Biospace. Toutefois, l'utilisation du Victor permet une mesure plus aisée et plus reproductible.

Une gamme réalisée dans chaque organe permet de quantifier la quantité de particules présentes dans chaque organe. La limite de détection trouvée correspond à environ 0,1% de la dose injectée.

Les résultats de cette analyse ont montré que la quantité de nanoparticules était, comme attendu, largement plus importante dans le foie que dans les autres organes (voir Figure 6.19). Nous avons également observé au cours des premiers jours une augmentation du nombre de nanoparticules dans le foie, montrant le mécanisme de capture par celui-ci. Au temps long, la tendance s'est inversée avec de moins en moins de particules présentes dans l'ensemble des organes. Au temps M6 (6 mois après l'injection), la quantité de nanoparticules retrouvée dans les organes est quasiment nulle.

Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la diminution du signal mesuré.

La première est une diminution de la luminescence par particules par dégradation du matériau. En effet, la dégradation de corps étrangers se passent majoritairement au niveau des lysosomes qui sont acides. La dégradation des particules *in vivo* est donc peu probable au vu de la résistance chimique des particules en milieu acide démontré par les expériences de rognages. Cette hypothèse ne peut toutefois pas être écartée.

La deuxième est une redistribution des particules dans d'autres organes qui n'ont pas été dosés (noeuds lymphatique, moelle épinière, carcasse...).

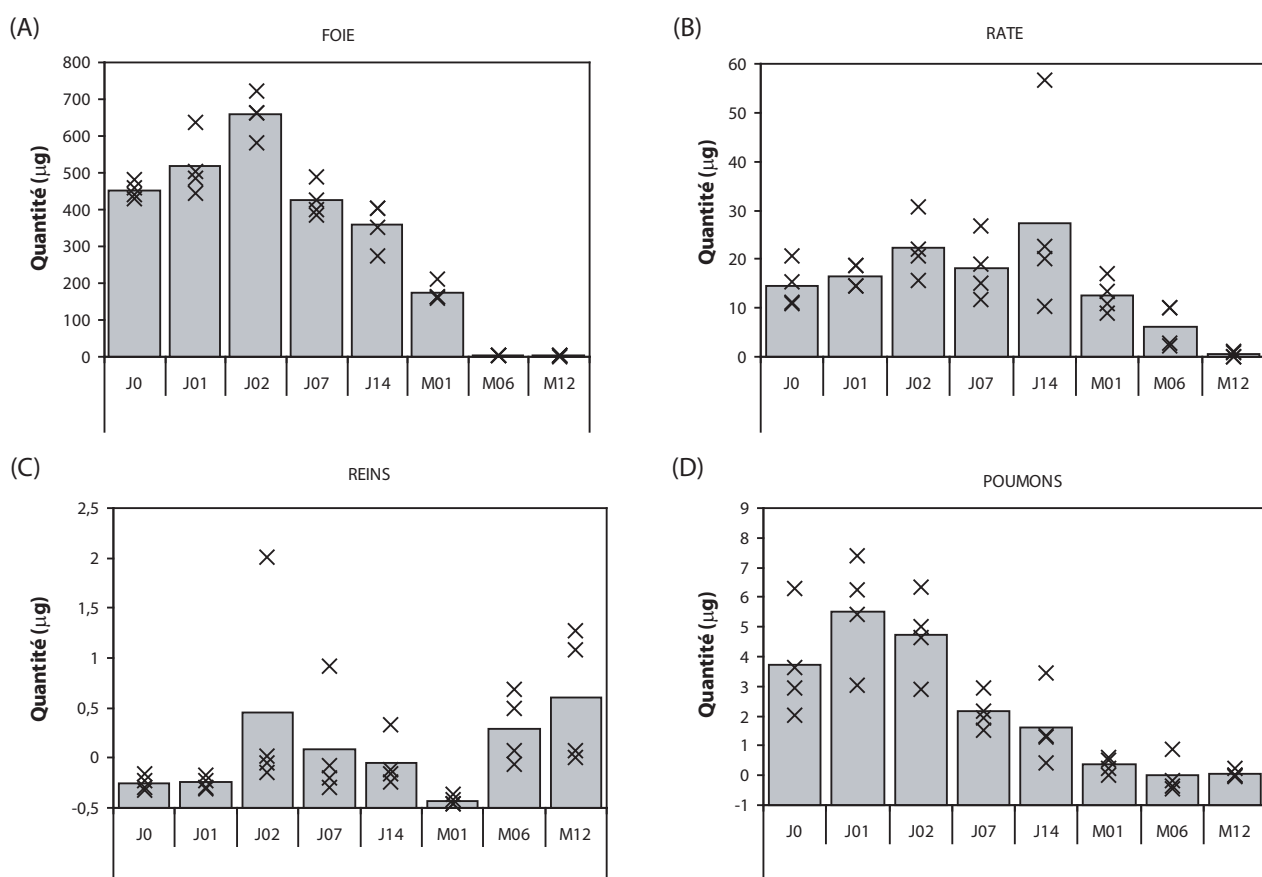


FIG. 6.19: Quantité de nanoparticules retrouvée dans les organes en fonction du temps (injection d'1 mg de nanoparticules négatives par souris) (A) dans le foie, (B) dans la rate, (C) dans les reins (D) dans les poumons.

La troisième est une élimination des particules de l'organisme, celle-ci empruntant la voie biliaire (élimination dans les fèces). Cette dernière hypothèse nous semble la plus réaliste. Toutefois, les expériences recherchant à mesurer la luminescence dans les fèces après injection intraveineuse de nanoparticules ne nous ont pas permis de conclure de façon ferme sur cette hypothèse, les niveaux de luminescence observés étant en effet très faibles.

6.4.3 Évolution du poids des souris après injection intraveineuse de nanoparticules non fonctionnalisées

Un paramètre important dans l'évaluation de la toxicité d'un produit est le suivi du poids au cours du temps après injection du produit.

Lors de l'injection d'une dose unique, une légère baisse de poids du groupe injecté par rapport au groupe témoin a été observée durant les premiers jours. Toutefois, au temps plus long, les deux groupes étaient d'un poids similaire (voir Figure 6.20). Ceci tendrait à montrer que les nanoparticules n'ont pas d'effet de toxicité aiguë sur la souris.

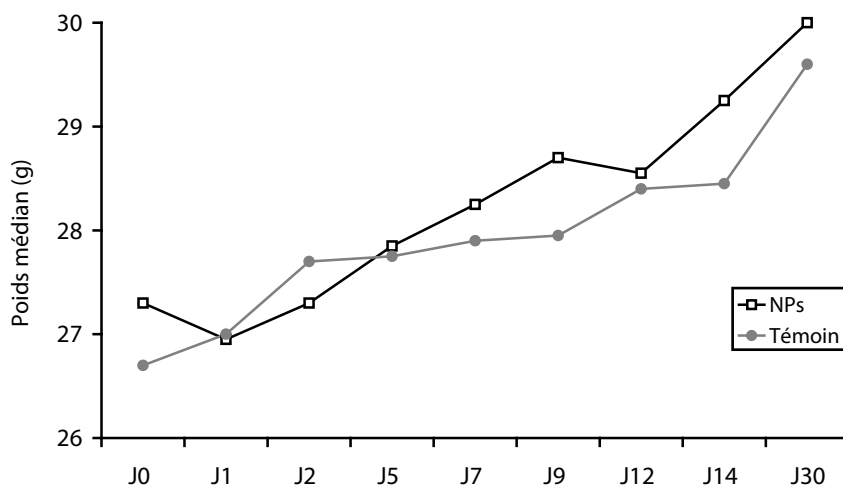


FIG. 6.20: Évolution du poids médian du groupe de souris (échantillon de 16 souris) après injection d'1 mg de nanoparticules non fonctionnalisées en injection intraveineuse en comparaison d'un groupe contrôle (4 souris)

Nous avons réalisé le même type d'expériences en injection multiples en utilisant une dose plus faible ($500 \mu\text{g}$). Nous avons testé une injection journalière de particules pendant une semaine et une injection hebdomadaire pendant un mois. Il est à noter que pour les injections journalières, les souris n'ont pas été anesthésiées, une anesthésie journalière étant toxique. Les résultats de ces expériences sont présentés à la figure 6.21.

Au niveau des injections journalières, on ne note pas de différences notables sur l'évolution du poids entre groupe contrôle et groupe injecté. En revanche au niveau des injections hebdomadaires, on note une diminution du poids du groupe injecté à chaque injection. Même si cette diminution n'excède pas 10% du poids des souris, la répétition de ces baisses laissent à penser qu'il existe un effet délétère des particules. Après

dissection des animaux ayant reçu des injections de nanoparticules, une splénomégalie¹ a été observée dans l'expérience d'injection hebdomadaire alors que cela n'a pas été observée dans l'expérience d'injection journalière. Une étude plus approfondie serait donc à mener afin de comprendre ces différences.

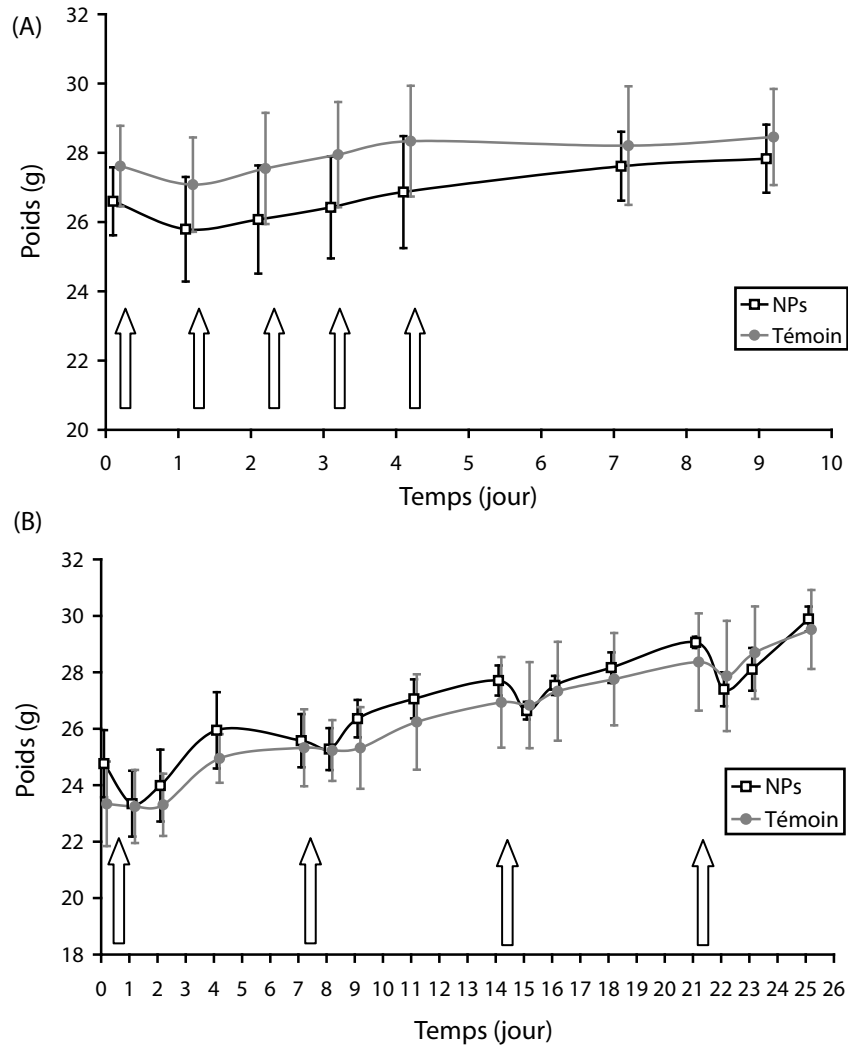


FIG. 6.21: Évolution du poids du groupe de souris (4 souris par groupe) après injection de $500\mu\text{g}$ de nanoparticules en injection intraveineuse en comparaison d'un groupe contrôle (A) injection hebdomadaire pendant 4 semaines (B) injection journalière pendant 5 jours. A la différence des expériences d'injection hebdomadaire, l'injection est faite sur souris vigile maintenue dans une cage de contention.

¹Augmentation du volume de la rate

Quatrième partie

Imagerie bimodale et imagerie 3D
en luminescence

Chapitre 7

Imagerie bimodale

Sommaire

7.1	Intérêt des agents bimodaux	153
7.2	Fonctionnalisation pour l'obtention d'agents bimodaux . .	154
7.2.1	Agents bimodaux optique-scintigraphie	154
7.2.2	Agents bimodaux optique-IRM	154
7.3	Utilisation de agents bimodaux en imagerie	156

7.1 Intérêt des agents bimodaux

Il existe aujourd'hui une véritable volonté de faire converger différentes techniques d'imagerie (multimodalité) pour mieux sonder le vivant [5]. Dans notre cas, l'intérêt d'obtenir des agents bimodaux est double.

Le premier réside dans la possibilité d'avoir un continuum d'observation de la biodistribution des particules dans le temps. Grâce aux propriétés de luminescence persistante, nous avons vu que nous sommes capables d'imager la biodistribution des nanoparticules pendant plus d'une heure. Cette durée relativement importante ne nous permet toutefois pas d'observer le devenir à long terme des nanoparticules, l'analyse devant se faire *ex vivo* par dosage. Ces analyses *ex vivo* décrites précédemment nous ont permis de vérifier que l'imagerie optique a mis en évidence l'ensemble des organes dans lesquelles vont se piéger les nanoparticules (avec même une résolution bien plus importante grâce à la microscopie optique). Les temps courts peuvent être obtenus avec précision en imagerie optique tandis que les temps longs peuvent être obtenus à l'aide d'une autre modalité d'imagerie.

Le deuxième intérêt qui justifie l'utilisation de la scintigraphie et de l'IRM vient de la faible résolution spatiale obtenue en imagerie optique. La diffusion de la lumière par les tissus empêche en effet la localisation précise du lieu primaire d'émission des photons. Connaître de façon précise la localisation des particules *in vivo* et acquérir en même temps une image du signal optique devrait ainsi permettre d'améliorer les méthodes de reconstruction tridimensionnelle qui se développent en optique.

Nous avons donc décidé de développer des agents bimodaux optique-scintigraphie

(par chélation d'ions Technitium ou indium) et optique-IRM (par chélation d'ions Gadolinium).

7.2 Fonctionnalisation pour l'obtention d'agents bimodaux

7.2.1 Agents bimodaux optique-scintigraphie

La scintigraphie nécessite la présence d'ions radioactifs, généralement trivalents. Le greffage de chélatants d'ions à la surface des particules est la méthode la plus directe pour obtenir des composés bimodaux optique-scintigraphie. Une autre méthode serait d'incorporer dans la matrice des ions radioactifs ayant des longues durées de vie. La législation liée à la manipulation de la radioactivité étant extrêmement sévère (à juste titre) rend cette méthode inexploitable.

Il existe de nombreux chélatants d'ions trivalents. Nous avons choisi d'utiliser le chélatant le plus utilisé à savoir l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA). Pour fonctionnaliser les nanoparticules par du DTPA, nous avons choisi de faire réagir du dianhydride d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA anhydride) sur des nanoparticules aminées. Après hydrolyse du deuxième anhydride, cette réaction permet de libérer 4 carboxylates qui sont capables de chélater un ion radioactif, comme le technecium-99m ou l'indium-111.

Afin d'être en mesure de réitérer les expériences réalisées avec les nanoparticules en optique, il est nécessaire de pouvoir obtenir des particules chargées différemment (positives, négatives et neutres) afin de confirmer ou d'infirmer les biodistributions déterminées en optique (voir Figure 7.1).

Ainsi nous avons réalisé des réactions chimiques soit avec un excès de DTPA-anhydride — on obtient alors des particules négatives (potentiel $\zeta = -23$ mV), même après chélation d'ions trivalent — soit avec un défaut de DTPA — on obtient alors des particules très faiblement positives (potentiel $\zeta = +5$ mV). On réalise ensuite sur le dernier type de particules une greffage peptidique sur le restant d'amines avec un excès de PEG-COOH activé (potentiel $\zeta = -3$ mV).

7.2.2 Agents bimodaux optique-IRM

Greffage de complexe Gadolinium

Comme nous l'avons dit en introduction sur l'IRM, il existe deux grandes classes d'agents pour l'IRM : les agents paramagnétiques (types chélates de Gadolinium) qui ont un fort effet au niveau du T_1 avec une valeur de T_2 proche de celle du T_1 et les agents de susceptibilité magnétique (USPIO) qui ont un effet plus important sur la valeur du T_2 .

Plusieurs méthodes de synthèse de particules bimodales IRM-optique sont envisageables. En utilisant des particules superparamagnétiques, nous pouvons associer des nanoparticules à des particules de types USPIO soit en les incorporant dans la matrice de la particule soit en les liant de façon covalente à la surface des particules. La synthèse de particules hybrides USPIO emprisonnées dans une matrice de matériau luminescent

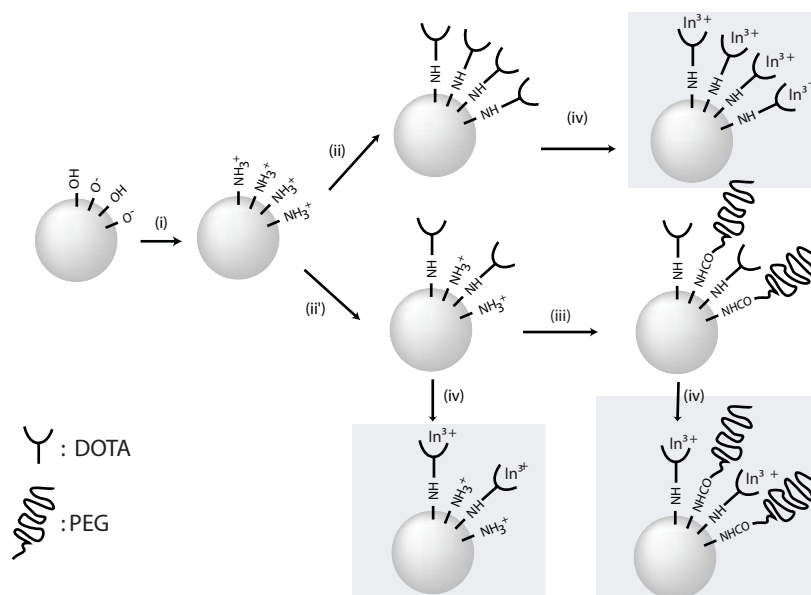


FIG. 7.1: Fonctionnalisation pour expériences en scintigraphie

n'a pas donné de résultats, la particule d'oxyde de Fer se dissolvant dans la matrice au chauffage. L'autre possibilité, que nous n'avons pas testé, semble toutefois moins pertinente. En effet, les USPIO absorbent fortement la lumière. Il est donc possible que les qualités de luminescence persistante soient grandement affectées par la présence de ces particules en surface.

Nous avons donc choisi d'utiliser la même méthode que celle utilisée pour la scintigraphie, à savoir un liaison covalente avec une chélatant d'ions trivalent. Comme chélatant, nous avons également choisi le DTPA (voir la Figure 7.2).

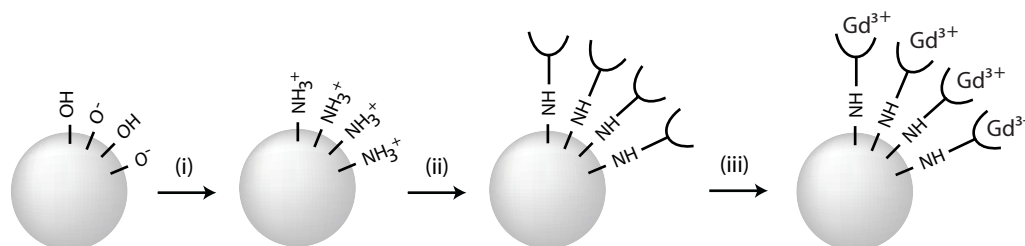


FIG. 7.2: Fonctionnalisation des particules pour les expériences en IRM

La chélation du gadolinium est simple. Après hydrolyse de l'anhydride non ponté à la surface, du sel de gadolinium ($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) est ajouté en excès à une suspension de nanoparticules. Le pH de la solution doit être ajusté avec de la soude afin de permettre la chélation du Gd^{3+} par le DTPA. En effet, en dessous de pH 4, les carboxylates sont protonés. Ceci défavorise bien entendu la chélation du Gd^{3+} mais provoque également une sédimentation très rapide des particules, celles-ci ne possédant plus de charges de surface. La suspension est laissée sous agitation pendant une nuit. L'excédent de Gd^{3+} est enlevé par une série de lavages par sédimentation-redisersion.

Ces modifications visant à obtenir des agents bimodaux ont été effectuées sur des

particules dopées et non dopées (non luminescentes). Les expériences en RMN ^{29}Si nous ont en effet montré que les particules dopées peuvent altérer les signaux RMN. Il est donc important de pouvoir différencier entre effet intrinsèque des particules et effet du greffage de gadolinium.

7.3 Utilisation de agents bimodaux en imagerie

Pour l'instant, nous n'avons pas encore réalisé les expériences visant à acquérir simultanément (ou sur le même animal) les données d'imagerie optique et IRM ou scintigraphie. Les expériences présentées ici sont donc purement monomodales, mais les propriétés optiques des composées sont bien entendu conservées par la fonctionnalisation pour la scintigraphie/IRM

Résultats des agents bimodaux-scintigraphie

Ce travail a été effectué en collaboration avec Philippe Chaumet-Riffaud (Hôpital Bichat). Les acquisitions ont été faites sur une gamma-caméra de la société Biospace avec un marquage à l' $^{111}\text{Indium}$. Pour l'instant, seules les expériences sur les particules dites "positives" ont été réalisées. Comme nous l'avons dit, sur l'échantillon sur lequel nous avons travaillé, le potentiel de surface était quasiment neutre, la chélation d'ions trivalent devant rendre positive cette charge. La réaction de chélation se fait par addition de sel d'indium radioactif à pH contrôlé, l'excès étant enlevé par une succession de lavages par sédimentation-redispersion.

Les résultats de cette injection sont présentées à la Figure 7.3. On note ainsi la présence des particules principalement au niveau du foie et de la rate avec une présence relativement faible aux temps courts au niveau des poumons. Les particules ne possèdent donc pas une charge de surface suffisamment positive pour rester bloquées dans cet organe. On note également la présence de radioactivité dans la vessie. Ceci n'est pas dû à la présence de particules mais plutôt à de l'indium non chélaté éliminé par le rein.

Cette expérience nous a permis de vérifier que les résultats des expériences en imagerie sont comparables avec ceux réalisés en scintigraphie ce qui confirme le fait que l'imagerie optique sur petit animal possède une bonne sensibilité malgré l'atténuation des tissus.

Résultats des agents bimodaux-IRM

Relaxivité des composés Avant de réaliser des expériences *in vivo*, il est indispensable de réaliser des tests *in vitro* pour caractériser l'effet magnétique des particules. Pour cela, on réalise des suspensions de concentrations croissantes puis une séquence IRM spécifique (séquence écho de spin multi-écho) permet de déterminer les constantes T_1 et T_2 de chaque suspension. Le champ magnétique de l'IRM utilisé était de 7 Tesla (300MHz). Les résultats sont donnés dans le tableau 7.1 et les figures 7.4 et 7.5. Ce travail a été effectué en collaboration avec Lauriane Jugé à l'ENSCP.

Les résultats de ces tests *in vitro* montrent que :

1. les particules non dopées et ne chélatant pas de Gd^{3+} n'ont aucune influence sur les temps de relaxation T_1 et T_2 de l'eau aux concentrations utilisées.

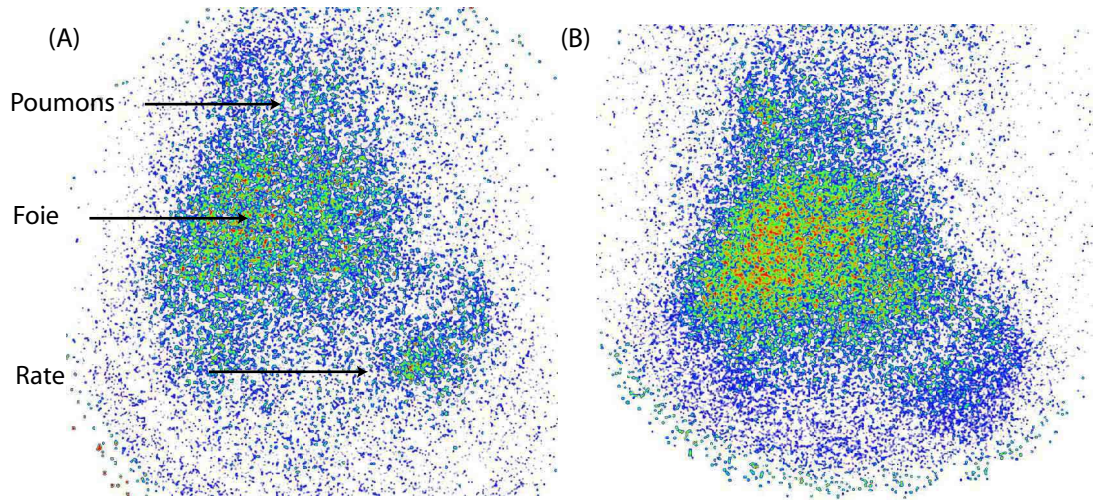


FIG. 7.3: Scintigraphie d'une injection intraveineuse de particules à luminescence persistante légèrement positives sur lesquelles a été greffé du DTPA servant à la chélation d'ion Indium (A) Image 20 min après injection (B) Image 60 min après injection

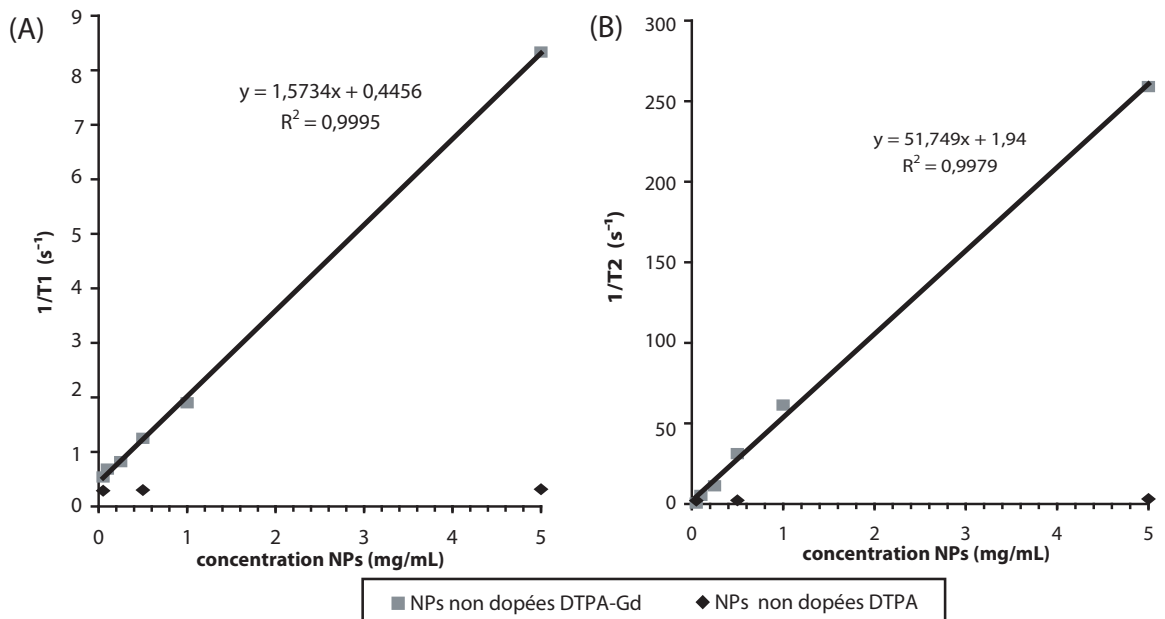


FIG. 7.4: Effet de la concentration de NPs non dopées fonctionnalisées avec du DTPA avec ou sans addition de Gd^{3+} sur la relaxivité. (A) Effet sur le T_1 (B) Effet sur le T_2 .

NPs non dopés
 $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$

Fonctionnalisation	DTPA		DTPA-Gd	
Concentration NPs (mg/mL)	T ₁ (ms)	1/T ₁ (s ⁻¹)	T ₁ (ms)	1/T ₁ (s ⁻¹)
5	3158	0,3166	120	8,333
1	nd	nd	526	2,688
0,5	3335	0,288	800	1,25
0,25	nd	nd	1218	0,821
0,1	nd	nd	1462	0,684
0,05	3473	0,3125	1850	0,541
0	3275	0,305	3275	0,305
	T ₂ (ms)	1/T ₂ (s ⁻¹)	T ₂ (ms)	1/T ₂ (s ⁻¹)
5	326	3,07	3,86	259,1
1	nd	nd	16,3	61,4
0,5	442	2,26	32	31,25
0,25	nd	nd	89	11,24
0,1	nd	nd	190	5,26
0,05	474	2,11	1850	0,540
0	505	1,98	505	1,98

NPs dopés
 $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$:Eu²⁺ :0,5% ;Dy³⁺ :1,0% ;Mn²⁺ :2,5%

Fonctionnalisation	DTPA		DTPA-Gd	
Concentration (mg/mL)	T ₁ (ms)	1/T ₁ (s ⁻¹)	T ₁ (ms)	1/T ₁ (s ⁻¹)
5	3479	0,287	100	10
1	nd	nd	372	2,688
0,5	3077	0,325	650	1,538
0,25	nd	nd	990	1,010
0,1	nd	nd	1360	0,735
0,05	3272	0,306	1700	0,588
0	3275	0,305	3275	0,305
	T ₂ (ms)	1/T ₂ (s ⁻¹)	T ₂ (ms)	1/T ₂ (s ⁻¹)
5	5,21	191,9	1,7	588,2
1	nd	nd	7,4	135,1
0,5	50,2	19,92	16,4	60,98
0,25	nd	nd	44,2	22,62
0,1	nd	nd	88	11,36
0,05	300	3,33	170	5,88
0	505	1,98	505	1,98

TAB. 7.1: Temps de relaxation et relaxivité (=1/T) des composés synthétisés (nd : non déterminé)

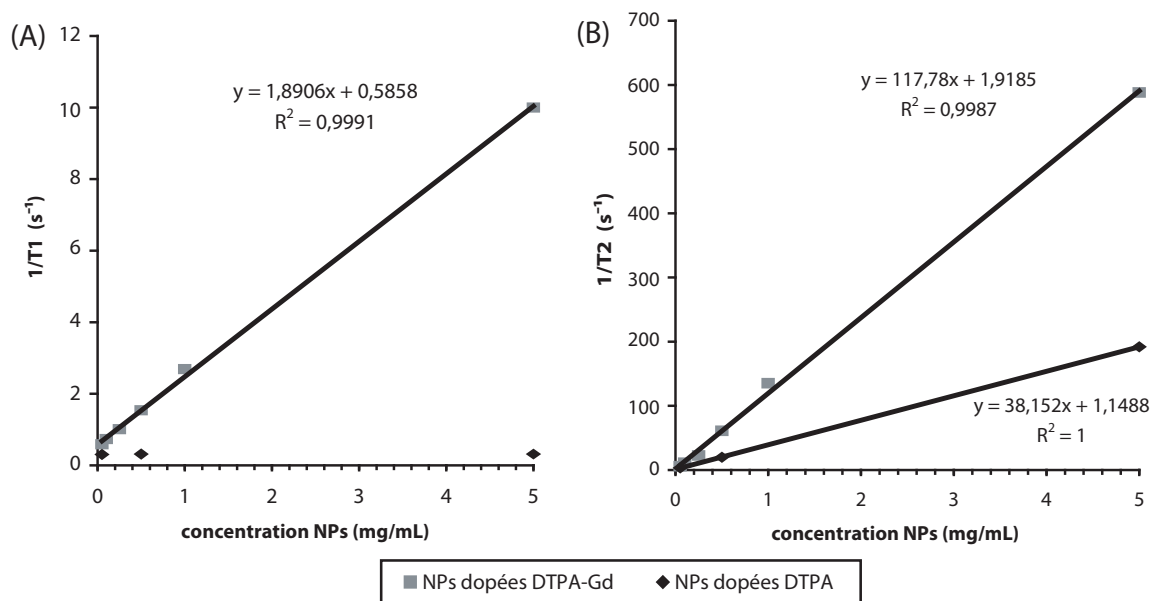


FIG. 7.5: Effet de la concentration de NPs dopées fonctionnalisées avec du DTPA avec ou sans addition de Gd^{3+} sur la relaxivité. (A) Effet sur le T_1 (B) Effet sur le T_2 .

2. les particules non dopées et chélatant du Gd^{3+} ont un effet T_1 élevé avec un fort effet T_2
3. les particules dopées, ne comportant pas de Gd^{3+} n'ont qu'une faible influence si ce n'est aucune sur le temps T_1 . En revanche, elles possèdent un fort effet T_2 .
4. les particules dopées et chélatant du Gd^{3+} ont également un effet T_1 prononcé et un effet T_2

L'effet T_2 observé dans le cas des particules dopées sans Gadolinium est très intéressant. Les particules à luminescence persistante possèdent ainsi un effet *intrinsèque* sur un signal IRM. Cet effet provient de la présence des ions dopants, notamment le manganèse qui possède un fort effet paramagnétique. En augmentant la proportion de Mn^{2+} dans les particules, il est envisageable d'augmenter fortement l'effet en IRM tout en gardant une luminescence correcte¹.

Les effets T_1 associés à la présence de gadolinium à la surface des particules étaient attendus. En revanche, le fort effet T_2 l'était moins. En règle générale, on observe que $r_1 \approx r_2$ pour un complexe Gd^{3+} ² ce qui n'est clairement pas le cas avec les complexes formés à la surface des particules. Cela est d'autant plus surprenant avec les particules non dopées pour lesquelles aucun effet T_2 n'est observé avant chélation de gadolinium.

Les particules dopées et non dopées chélatant le gadolinium sont donc des agents de susceptibilité magnétique.

¹Nous avons vu que sur le composé $Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$ dopé Eu^{2+} :0,5% ; Dy^{3+} :1,0% une augmentation de 2,5% à 5,0% n'engendrait une perte de luminescence que de 10-15 %.

²Par exemple pour le Magnevist (Schering AG), à 1,0 T $r_1=3,4 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$, $r_2=3,8 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ (d'après <http://www.mr-tip.com/>)

Détection *in vivo* en injection intramusculaire Nous avons effectué des tests de visualisation des particules portant un groupement DTPA en IRM par injection dans le muscle tibial cranial d'une souris. Les signaux obtenus pour différentes particules sont présentés en Figure 7.6

Les doses injectées correspondent à 30 μL d'une suspension à 5 mg/mL soit 150 μg avec une séquence favorisant l'imagerie en contraste T_1 . Le résultat des différentes expériences est présenté à la figure 7.6. On observe sur les images, que pour le composé dopé et complexant le gadolinium, l'injection est visible par l'apparition d'une zone contrastée avec au centre une zone noire entourée d'une zone blanche. Même si nous nous attendions uniquement à observer une zone blanche (à cause de l'effet T_1), il est connu qu'à forte concentration, on observe une inversion du contraste (voir Figure 7.6) (ceci arrive notamment au niveau de la vessie). L'absence de diffusion physique des particules dans les tissus produit un effet de concentration locale du signal et inverse ainsi le contraste lors d'une acquisition en pondération T_1 . On notera que cet effet n'est généralement pas visible lors d'une injection intramusculaire de DTPA-Gd qui diffuse dans le muscle produisant ainsi un réhaussement du signal sur une large zone (voir 1.4).

Pour les particules non dopées sans gadolinium comme pour l'eau, aucun signal n'est détectable. Pour les particules dopées ne portant pas de gadolinium, une zone noire apparaît à cause de l'effet T_2 des particules. Une imagerie utilisant une séquence spécifique T_2 permettrait de mieux mettre en relief le phénomène.

La possibilité de localiser en IRM les particules injectées en intramusculaire est un grand pas vers l'acquisition de données plus complexes comme dans le cas d'une injection intraveineuse. Il est ainsi envisageable de réaliser réellement une analyse du signal en optique en sachant précisément où se localisent les particules. Comme on peut le voir sur la Figure 7.6, l'injection intramusculaire n'est pas aussi ponctuelle qu'on pouvait l'imaginer. On observe ainsi une certaine diffusion des particules dans les interstices musculaires même si cette diffusion est largement moins importante que pour une molécule classique. Une reconstruction 3D en imagerie optique doit donc permettre de retrouver cette diffusion.

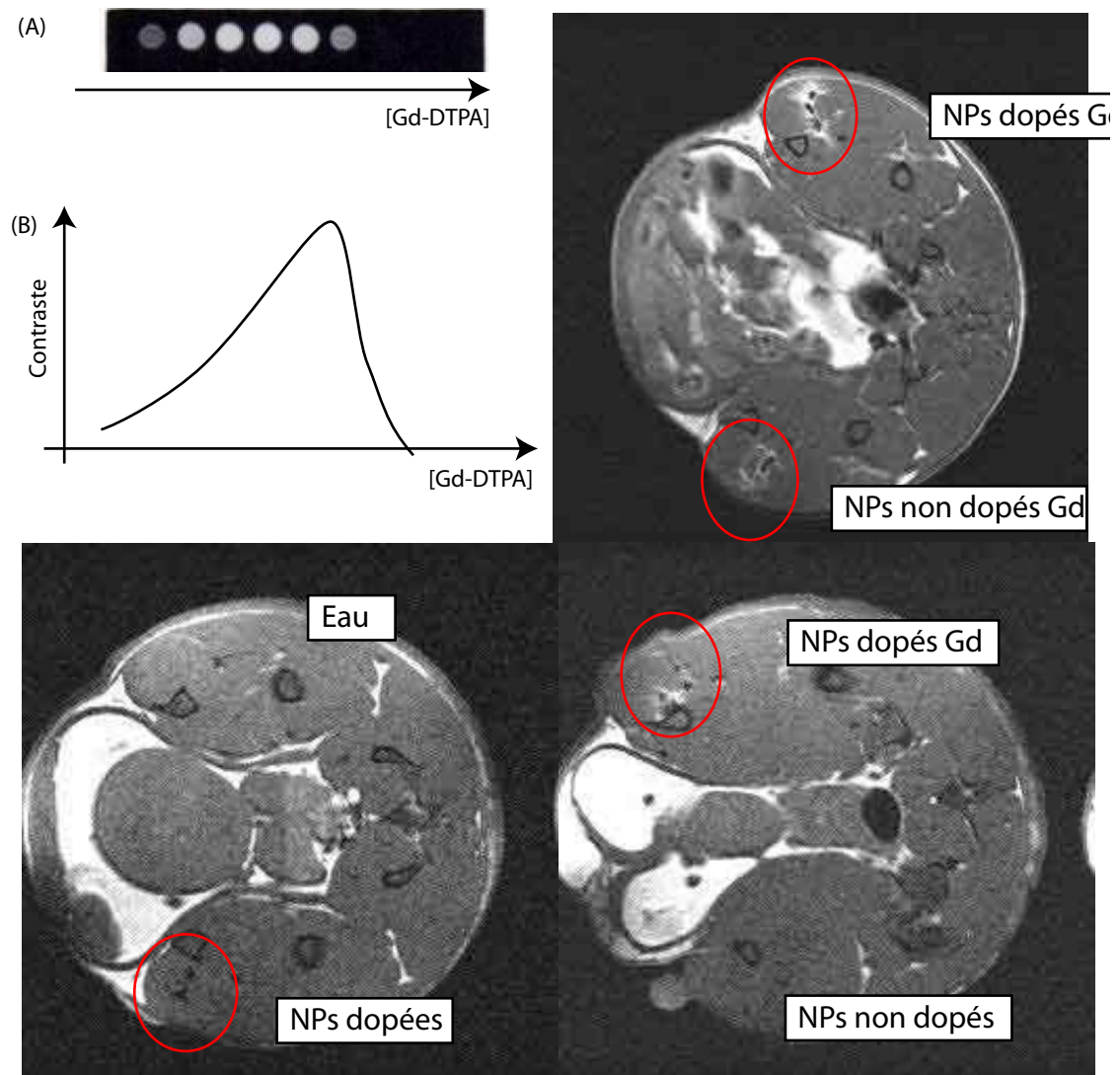


FIG. 7.6: (A) Effet de la concentration en Gd-DOTA sur le contraste (de gauche à droite 0,1 ; 0,25;0,5;1;2,5;5;10;25;50 mM - pondération T_1 :TE= 30 ms;TR=300ms $B_0=0,47T$)(d'après [150]) (B) Evolution caractéristique du signal observé pour un agent paramagnétique en fonction de sa concentration. (C-E) Images en pondération T_1 obtenues lors de différentes injections intramusculaires de nanoparticules. La quantité injectée est dans tous les cas de $150 \mu\text{g}$.

Chapitre 8

Imagerie optique tridimensionnelle

Comme il a déjà été largement souligné, les milieux biologiques sont complexes car à la fois absorbants et diffusants. Reconstruire un signal provenant d'un tel milieu est donc un défi scientifique qui n'a pas encore trouvé de solution parfaite.

Pour la reconstruction en optique, on distingue deux types de problèmes. Le premier est lié à la reconstruction d'une source fluorescente, l'autre d'une source bioluminescente. En utilisant des sondes à luminescence persistante, nous nous trouvons dans une problématique de bioluminescence qui est souvent considéré comme plus difficile.

La propagation des photons peut être décrite de façon convenable par l'équation de transfert radiatif (équation 8.1) ou par les méthodes de Monte-Carlo.

Soit $\Omega \in \mathbb{R}^3$ un espace tridimensionnel et $\partial\Omega$ la frontière de ce domaine. Si on note \hat{s} un vecteur unitaire décrivant la direction d'un photon, l'équation de transfert radiatif s'écrit :

$$\left(\frac{i\omega}{c} + \hat{s} \cdot \nabla + \mu_s + \mu_a\right) \phi(r, \hat{s}, \omega) = \mu_s \int_{4\pi} \phi(r, \hat{s}', \omega) \Theta(\hat{s} \cdot \hat{s}') d\hat{s}' + q(r, \hat{s}, \omega) \quad (8.1)$$

avec ω la fréquence de modulation du signal, $\mu_s = \mu_s(r)$ et $\mu_a = \mu_a(r)$ sont le coefficient de diffusion et d'absorption du milieu, ϕ dénote la radiance du signal, q est une source incluse dans Ω , et $\Theta(\hat{s} \cdot \hat{s}')$ est une fonction de phase décrivant la probabilité qu'un photon ayant une direction initiale \hat{s}' ait une direction \hat{s} après diffusion. Dans la suite, on considérera une source non modulée en fréquence ie $\omega = 0$.

Une approximation de cette équation est donnée par l'équation d'approximation de diffusion :

$$-\nabla \cdot [D(r)\nabla\Phi(r)] + \mu_a(r)\Phi(r) = S(r) \quad (r \in \Omega) \quad (8.2)$$

$$D(r) = \frac{1}{3(\mu_a(r) + (1-g)\mu_s)} \quad (8.3)$$

où $\Phi(r)$ est un flux de photon, g est le facteur d'anisotropie.

Cette dernière équation permet de résoudre les problèmes de reconstruction tridimensionnelle de façon performante et rapide (calcul ne nécessitant que quelques minutes dans le cas d'expériences en fluorescence ou en bioluminescence [151–153]).

Dans ce chapitre, nous avons essayé d'utiliser la méthode de Monte-carlo pour simuler le transport des photons dans les tissus et essayer de reconstruire tridimensionnellement une source ponctuelle dans une souris. Il est à noter que la simulation des photons par la méthode de Monte-Carlo, quoique moins développée, a été exemplifiée grâce à l'amélioration des capacités de calcul des ordinateurs [154]. Ce travail avait donc plus pour but d'appréhender les difficultés liées à la reconstruction en imagerie optique que de fournir un travail novateur.

8.1 Principe de la reconstruction

Le principe de l'approche envisagé pour la reconstruction est simple. Il s'agit de faire une modélisation du transport des photons dans les tissus par une méthode de type Monte-Carlo. Cette modélisation permet de simuler le résultat qui serait obtenu si une source ponctuelle était placée à un endroit connu. En répétant l'opération sur un ensemble de points ou noeuds dans le volume d'intérêt, on obtient une "base" de résultats calculés (notée $(P_i)_{i \in \mathbb{N}}$). Il est ensuite possible de comparer le résultat expérimental (noté P_{exp}) et d'exprimer ce résultat particulier sur la "base" des résultats calculés, c'est à dire trouver un ensemble $(\alpha_i)_{i \in \mathbb{N}}$ tel que :

$$P_{exp} = \sum_{i \in \mathbb{N}} \alpha_i \cdot P_i, \quad \alpha_i \geq 0. \quad (8.4)$$

8.2 Simulation du transport des photons par la méthode de Monte-Carlo

Modèle de parcours de photon dans les tissus

Nous avons choisi un modèle simple de parcours de photons dans les tissus développé par Prahl dans les années 1990. Cet algorithme peut être découpé en différentes étapes :

- initialisation du photon,
- génération de la distance parcourue par le photon,
- le calcul de la nouvelle position du photon,
- la réflexion lors d'un passage d'une interface (non implémenté),
- l'absorption du photon,
- la modification de la direction du photon par diffusion,
- traitement de la sortie de l'animal pour obtenir l'image finale.

Initialisation d'un paquet de photons La simulation commence par donner au photon un emplacement de départ (x, y, z) , une direction (u_x, u_y, u_z) . La luminescence émise par les nanoparticules est isotrope, le photon a accès à l'ensemble des directions de l'espace lorsqu'il est lancé.

Des techniques de réduction de variance sont utilisées pour réduire le nombre de photons nécessaires pour obtenir un résultat réaliste en simulation de Monte Carlo. Une technique simple est de propager un ensemble de photons nommé paquet, au lieu d'étudier la propagation de photon unique. En effet, si on prend un unique photon, à

chaque étape de son mouvement, le photon est soit absorbé soit diffusé. En revanche, si on prend un paquet de photon, pour un chemin particulier, seul un certain nombre sera absorbé. La réinitialisation du photon ne sera donc pas nécessaire. Le paquet de photons pourra continuer son parcours. La taille de ce paquet, appelé poids, sera simplement diminuée pour prendre en compte l'absorption. Le poids du paquet à 1 est initialisé au lancer.

Distance parcouru par les photons La méthode la plus simple pour simuler le parcours d'un photon est de lui faire suivre un chemin dont le pas d'incrémentatation est fixe et le plus petit possible afin de coller au mieux aux variations de son environnement. Le pas doit être suffisamment petit par rapport à la distance moyenne de parcours libre du photon dans un tissu. Cette distance de parcours libre est l'inverse du coefficient d'atténuation totale noté μ_t , défini comme la somme du coefficient d'absorption et de diffusion.

$$\Delta s \ll \frac{1}{\mu_t} = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (8.5)$$

Toutefois si le pas est trop petit, le photon n'interagira que rarement avec la matière et la méthode de Monte Carlo sera inefficace. Si ce pas est trop important, la simulation ne sera qu'une approximation grossière du chemin parcouru par un vrai photon.

Une autre méthode consiste à définir un pas variable pour chaque étape du parcours du photon. La fonction de densité de probabilité pour la longueur du pas suit la loi de Beer-Lambert. Il est en effet plus probable qu'un photon parcourt une faible distance plutôt qu'une grande distance avant de rentrer en interaction avec le tissu diffusant. Cette probabilité est proportionnelle à $e^{-\mu_t \Delta s}$.

Ainsi si on considère une variable aléatoire ξ distribuée de façon aléatoire entre 0 et 1, la distance que parcourera un photon avant d'interagir avec le milieu environnant sera donné par la loi :

$$\Delta s = \frac{-\ln(\xi)}{\mu_t} \quad (8.6)$$

Mise à jour de la position du photon Comme il a été dit en introduction, la position du photon est décrite par trois variables de positionnement dans l'espace cartésien, la direction de sa trajectoire étant donnée par trois autres variables. Pour un photon en position (x, y, z) parcourant une distance Δs dans la direction (u_x, u_y, u_z) , ses nouvelles coordonnées (x', y', z') seront données par :

$$\begin{aligned} x' &= x + u_x \Delta s \\ y' &= y + u_y \Delta s \\ z' &= z + u_z \Delta s \end{aligned} \quad (8.7)$$

Absorption des photons A chaque étape de la propagation, le paquet de photons est séparé en deux groupes, une partie des photons est absorbée par le milieu, l'autre est diffusée. La part des photons absorbée dépend bien entendu des coefficients d'absorption et de diffusion. Ainsi, à chaque étape de la propagation, le poids du paquet de photons

w sera diminué de la partie absorbée. Ainsi le nouveau poids du paquet de photons sera donné par :

$$w' = w \times \left(1 - \frac{\mu_a}{\mu_a + \mu_s} \right) = w \times \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (8.8)$$

Diffusion des photons - modification de la trajectoire

La nouvelle direction du photon lors d'un événement de diffusion peut être exprimée en fonction du facteur d'anisotropie g selon la fonction de Henyey-Greenstein [73] couramment utilisée en optique :

$$\cos\theta = \frac{1}{2g} \left(1 + g^2 - \left(\frac{1 - g^2}{1 - g + 2g\xi} \right)^2 \right) \quad (8.9)$$

Les nouvelles directions des photons sont ainsi calculées selon :

$$\begin{aligned} u'_x &= \frac{\sin\theta}{\sqrt{1 - u_z^2}} (u_x u_z \cos\phi - u_y \sin\phi) + u_x \cos\theta \\ u'_y &= \frac{\sin\theta}{\sqrt{1 - u_z^2}} (u_y u_z \cos\phi - u_x \sin\phi) + u_y \cos\theta \\ u'_z &= -\sin\theta \cos\phi \sqrt{1 - u_z^2} + u_z \cos\theta \end{aligned} \quad (8.10)$$

Il est possible de prendre une forme simplifiée de ces équations lorsque u_z est proche de 1.

$$\begin{aligned} u'_x &= \sin\theta \cos\phi \\ u'_y &= \sin\theta \sin\phi \\ u'_z &= \frac{u_z}{|u_z|} \cos\phi \end{aligned} \quad (8.11)$$

Une modélisation du parcours de photons est alors possible. Une telle simulation est présentée pour 10 photons différents à l'Equation 8.2. Cette simulation va nous permettre de simuler le résultat d'une expérience dans laquelle une source ponctuelle sera placée à l'intérieur d'un animal.

8.3 Acquisition des données et reconstruction

Nécessité de l'acquisition sous plusieurs angles de vue L'imagerie classique donne accès à des données bidimensionnelles, correspondant à la projection du signal sur le plan du capteur. Cette vue plane ne permet pas d'avoir des informations sur la profondeur de la source. Même dans un cas assez simple, comme celui de la figure 8.2, les sources ne peuvent pas être placées de façon certaine. Toutefois, dans certains cas, il est possible de reconstruire les sources avec un nombre suffisant de projections (classiquement de 100 à 200 vues). La méthode la plus classique utilisée dans le cas où le

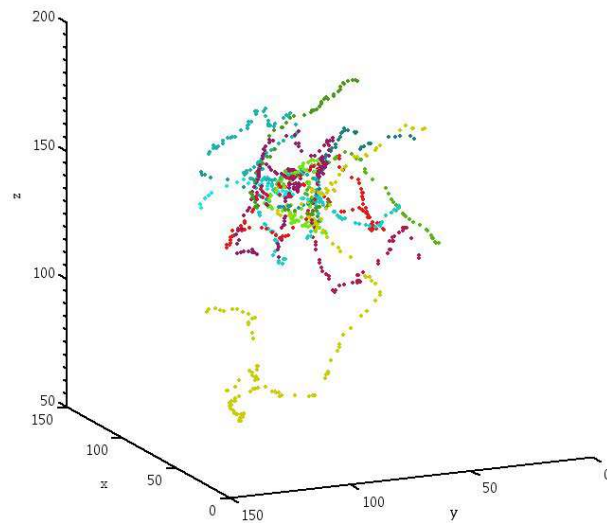


FIG. 8.1: Exemple de parcours de photon dans un environnement 3D diffusant, calculé par la méthode de Monte Carlo

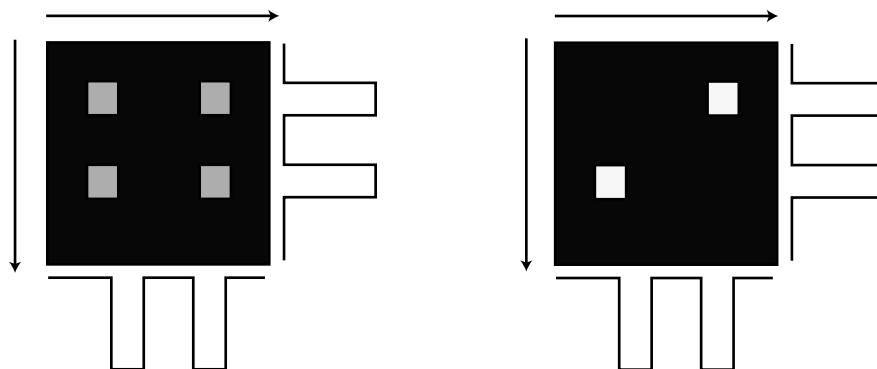


FIG. 8.2: projection reconstruction

signal n'est pas diffusé par le milieu correspond à la reconstruction par la transformée de Radon.

Pour obtenir d'autres vues, il est nécessaire de changer l'animal de position en la plaçant par exemple sur le dos, le côté droit, le côté gauche ou sur le ventre. Cette manipulation n'est donc pas automatique, le positionnement de la souris dans le bon angle de vue n'étant pas évident expérimentalement.

Exemple d'appareil commercial pour la 3D Un exemple d'appareil permettant une acquisition des données sous plusieurs vues est l'Ivis 3D de Xenogen. Cet appareil fait l'acquisition de la souris sous 8 vues (voir Figure 8.3).

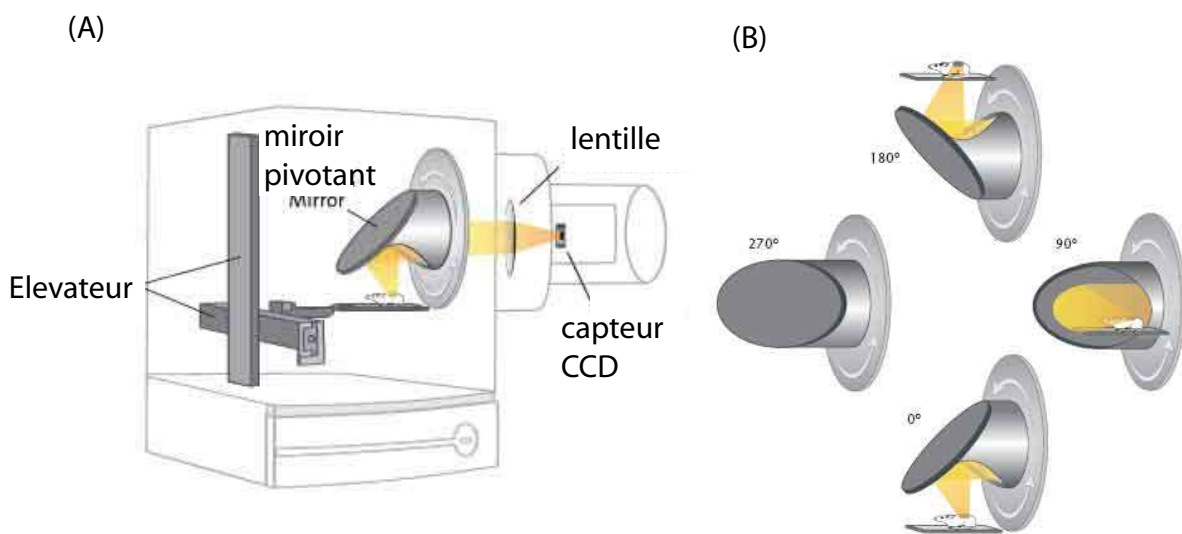


FIG. 8.3: Camera Ivis 3D d'après

L'analyse de signal surfacique est effectuée avec un modèle de diffusion des photons pour déterminer la brillance et la localisation des sources par la méthode d'approximation de diffusion dans un milieu homogène. Grâce à l'utilisation de lumière structurée (laser), l'enveloppe de la souris est acquise et un modèle de tissus homogènes est ensuite utilisé.

8.3.1 Montage expérimental

Plusieurs ébauches ont été réalisées avant de fabriquer la dernière version utilisée pour les reconstructions 3D. Le montage est assez sommaire puisqu'il est constitué de trois éléments (voir figure 8.4) :

- un moteur pas à pas qui permet des incréments de rotation constants et précis,
- un ensemble de miroirs pour renvoyer le signal lumineux au niveau de la caméra,
- un support pour la souris.

Le moteur pas à pas (96 pas dans notre cas) que nous avons utilisé est commandé par un ordinateur. Cela nous permet d'arrêter le moteur à chaque angle pendant une durée variable. Les miroirs ont été disposés pour faire un angle de 45° avec l'horizontale, la souris étant maintenue à la verticale. Cette disposition permet d'obtenir un ensemble de vues de la souris selon différents angles sans avoir à modifier manuellement la position

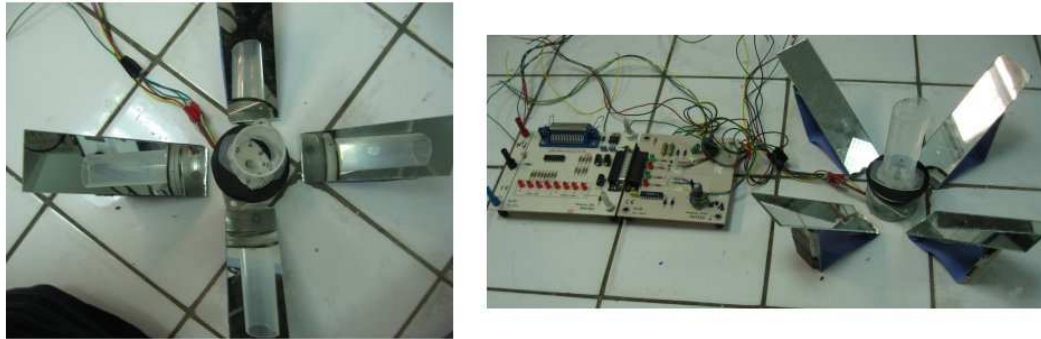


FIG. 8.4: Montage optique pour réaliser des acquisitions sous angles multiples

de la souris. Dans un cas idéal, afin de minimiser les mouvements de la souris, seuls les miroirs devraient être en mouvement. La configuration souris fixe-miroir tournants est ainsi l'option qu'a développée Xenogen dans son appareil Ivis. Nous avons choisi la configuration souris tournant-miroirs fixes.

8.3.2 Images obtenues

Afin de tester la reconstruction 3D, nous avons choisi d'effectuer une expérience d'injection intramusculaire en utilisant des particules à luminescence persistante dans le bleu ($\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$, voir Annexe D). Nous avons choisi ces particules pour la plus grande stabilité du signal de luminescence au cours du temps.

Le détecteur étant au dessus de la souris, on obtient avec la configuration présentée une image comportant 4 réflexions, chaque réflexion correspondant à un angle de vue de la souris. Il est ainsi possible, même sans utiliser le moteur d'acquérir 4 vues simultanément. Un montage à 8 miroirs est bien entendu envisageable en réduisant la distance entre la souris et les miroirs.

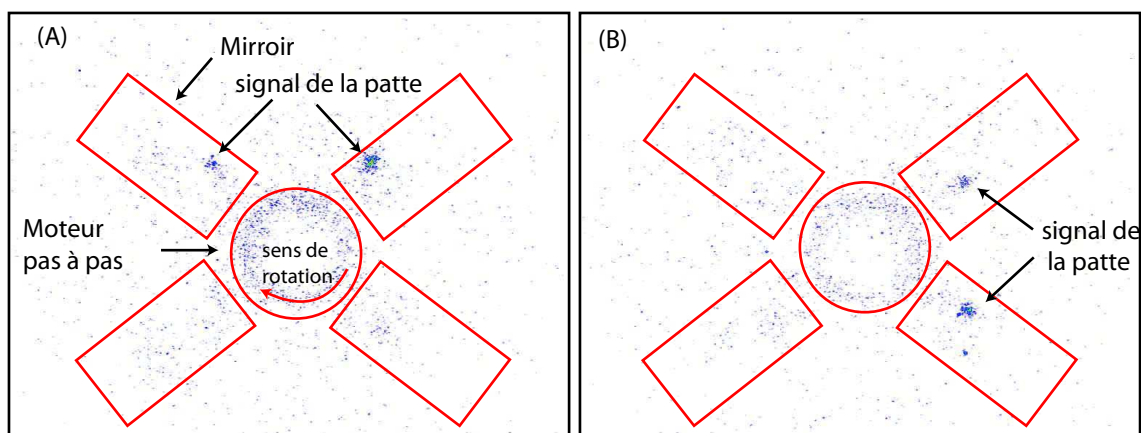


FIG. 8.5: vue plane obtenue pendant l'acquisition

L'image obtenue est en quelque sorte une image en coordonnées polaires de la souris. En dessinant des cercles, centrés sur le centre du moteur, on parcourt la hauteur de la souris. En passant ainsi l'image en coordonnées polaires (qui sont en fait les coordonnées

cartésiennes de la souris) on obtient directement les quatre vues. Il y a tout de même une déformation de l'image sur les bords (les miroirs n'ont pas tout à fait les bords parallèles), ce qui peut gêner légèrement la reconstruction.

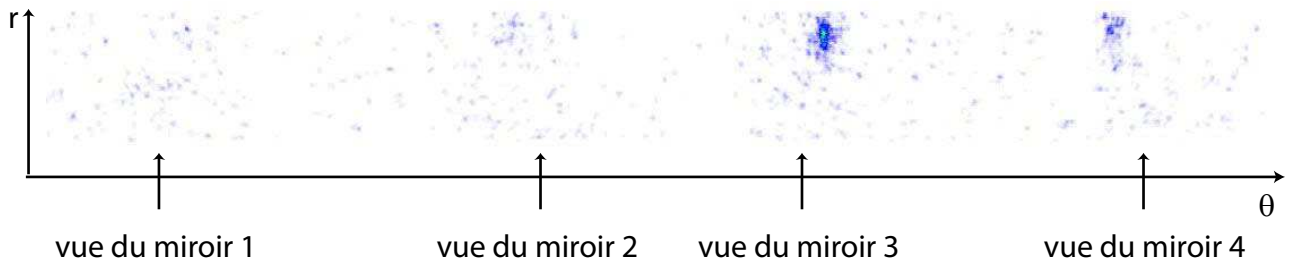


FIG. 8.6: Transformation en coordonnées polaire de l'image

Les images sont alors découpées pour obtenir un ensemble de quatre images selon quatre vues de la souris. En faisant tourner le moteur, on acquiert à une même position l'ensemble des images des projections. L'image expérimentale présentée à la Figure 8.7 va nous servir de base de comparaison à la modélisation. Nous disposons grâce à l'acquisition optique de 96 vues différentes. Toutefois, pour la reconstruction tridimensionnelle, nous avons choisi de travailler avec des images ne comportant que 16 angles de vues afin de limiter la taille des images à traiter.

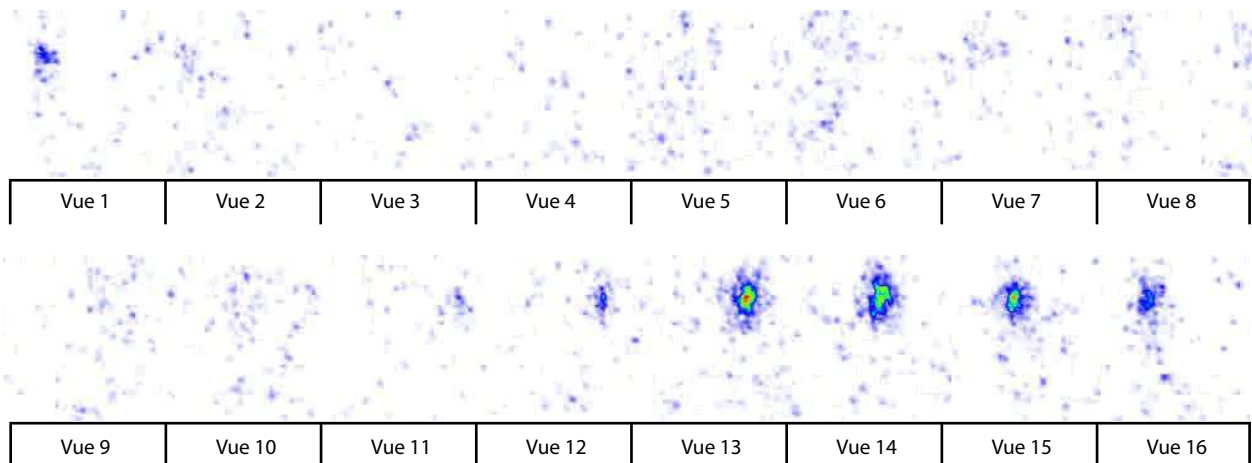


FIG. 8.7: Les images sont ensuite découpées afin d'obtenir la vue de l'animal selon un ensemble de vues différentes.

8.3.3 Reconstruction tridimensionnelle

Implémentation d'une acquisition scanner

Nous avons eu la possibilité de réaliser un scanner sur l'animal avec lequel nous avons réalisé une acquisition tridimensionnelle du signal optique. Ces données CT

peuvent permettre à la fois d'implémenter dans le programme l'enveloppe de l'animal et de connaître l'anatomie de la souris. Il est toutefois nécessaire de recalibrer manuellement ces données sur une image photographique de la souris prise à la fin de l'acquisition des données optiques.

Le scanner de la souris permet de différencier les grandes zones (graisses, muscles-organes et os). Nous avons donc segmenté l'image CT en trois. La segmentation a été effectuée par seuillage en niveau de gris.

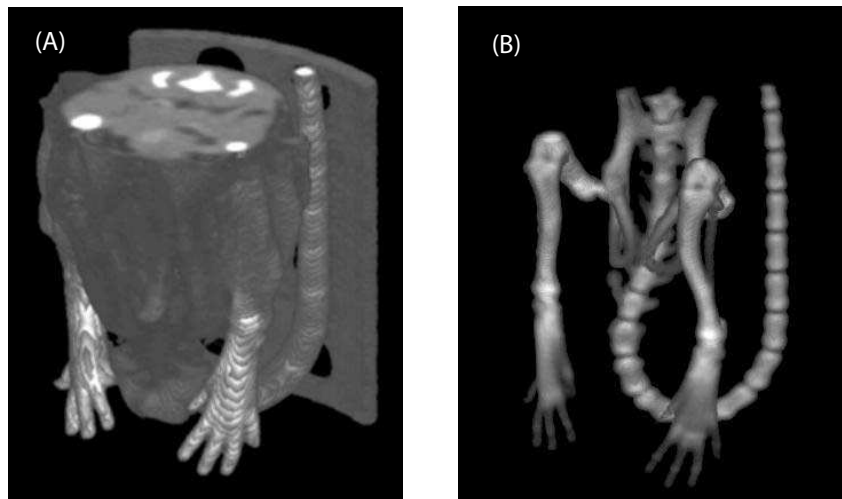


FIG. 8.8: Acquisition CT de la souris utilisée en imagerie optique (A) corps et (B) squelette de l'animal. L'acquisition a été effectuée juste après l'acquisition optique sans faire bouger la souris. La visualisation 3D a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ et du module VolumeViewer.

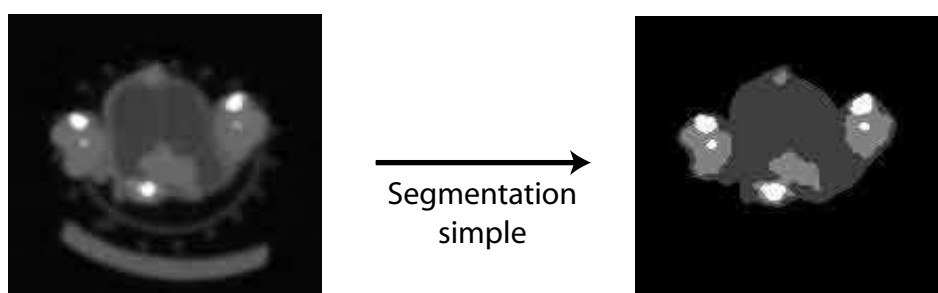


FIG. 8.9: Segmentation simple par niveaux de gris sur les images CT

Les coefficients d'absorption et de diffusion ont été choisis pour être cohérents avec la segmentation effectuée et les longueurs d'onde d'émission des nanoparticules à luminescence persistante [74]. Si les coefficients sont exprimés en cm^{-1} , il est aisé de les exprimer en pixel^{-1} (unité des images) en connaissant la taille d'une souris.

- zone 1 (muscle) : $\mu_a=10 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s=30 \text{ cm}^{-1}$, $g=0,9$;
- zone 2 (os) : $\mu_a=7 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s=50 \text{ cm}^{-1}$, $g=0,9$;
- zone 3 (peau) : $\mu_a=7 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s=50 \text{ cm}^{-1}$, $g=0,9$;

Lors de l'acquisition du signal de luminescence, il est possible de prendre une image photographique de la souris. Cette image permet de recalibrer manuellement les acquisitions optiques et les données IRM. Un système idéal permettrait de s'affranchir de cette étape. Il est à noter qu'à l'heure actuelle, les systèmes de reconstruction 3D commerciaux utilisent un modèle de souris homogène (pour les coefficients d'absorption et de diffusion). Seule l'acquisition de l'enveloppe de la souris est nécessaire (cette acquisition se faisant généralement à l'aide d'une lumière structurée).

Comme l'injection avait été effectuée dans la patte gauche de la souris, nous n'avons simulé que des sources se situant dans la partie gauche de la souris. Ceci nous a permis de faire un quadrillage dont la séparation des points-sources n'est que de 1 mm. Le nombre d'images à calculer est alors d'environ 1300 images. Le temps de calcul de ces 1300 images en faisant une simulation sur 10000 photons pour chaque source ponctuelle est d'environ 30 min sur un ordinateur classique de bureau (P4 3GHz, 1Go de Ram).

Comparaison des images expérimentales et issues de la simulation

Les images obtenues après simulation tiennent compte du montage expérimental d'acquisition des images en considérant les miroirs et la lentille du capteur comme parfaits. Grâce à cela, il est possible d'obtenir des images correspondant à ce qu'on obtiendrait lors d'une expérience réelle si la source était ponctuelle (voir Figure 8.10). En additionnant plusieurs images, il est toutefois possible de simuler le résultat d'une source plus complexe.

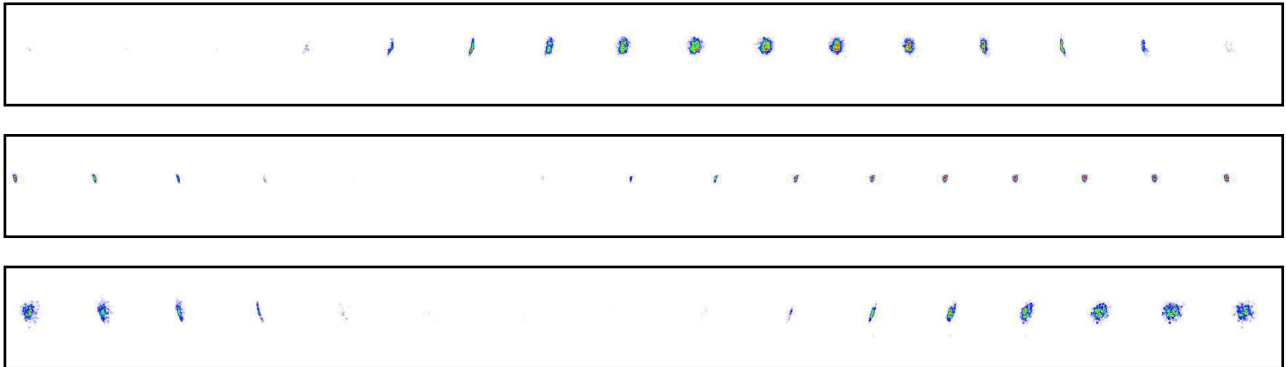


FIG. 8.10: Images obtenues après simulation du transport des photons pour une source ponctuelle placée à différents endroits

Optimisation du résultat en fonctions de la base d'image

Pour connaître l'importance de chaque source ponctuelle dans le résultat obtenu expérimentalement (image noté P_{exp}), il faut comparer cette dernière avec l'ensemble des images simulées numériquement (notées $\{P_i\}_{i \in 1 \dots n}$). Comme il y a linéarité du résultat en fonction de l'intensité des sources, l'optimisation consiste donc à rechercher le n-uplet $\vec{\alpha} = (\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$ minimisant l'écart entre image expérimentale et somme

d'images simulées. Ainsi si on note :

$$L_{\vec{\alpha}} = \left\| P_{exp} - \sum_i \alpha_i P_i \right\|^2 \quad (8.12)$$

on recherche le minimum pour L en fonction des paramètres

$$(\alpha_i)_{i \in 1..n}$$

La norme définie correspond à la différence entre les images pixel par pixel. Ainsi, si l'image possède un nombre p de pixel :

$$L = \sum_{k=1}^p \left(P_{exp}(k) - \sum_i \alpha_i P_i(k) \right)^2 \quad (8.13)$$

Nous avons choisi une méthode de minimisation classiquement utilisée, à savoir la méthode de descente de gradient. Cette méthode n'est pas forcément la plus pertinente, mais elle nous a permis d'obtenir des résultats cohérents.

La méthode de la descente de gradient consiste à rechercher la pente (c'est à dire le gradient) de la fonction selon les variables (à savoir le n-uplet $(\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$). Ainsi, la première étape du calcul consiste à calculer :

$$\overrightarrow{grad} L_{\vec{\alpha}} = \left(\frac{\partial L}{\partial \alpha_1}, \frac{\partial L}{\partial \alpha_2}, \dots, \frac{\partial L}{\partial \alpha_n} \right) \quad (8.14)$$

$$\forall j, \frac{\partial L}{\partial \alpha_j} = P_j \left(P_{exp} - \sum_i \alpha_i P_i \right) \quad (8.15)$$

Lors de l'optimisation, le nouveau vecteur $\vec{\alpha}'$ est relié au précédent vecteur par :

$$\vec{\alpha}' = \vec{\alpha} + \lambda \overrightarrow{grad} L \quad (8.16)$$

$$\forall j, \alpha'_j = 2 \times \alpha_j + \lambda \frac{\partial L}{\partial \alpha_j} \quad (8.17)$$

où la valeur de λ peut être modifiée à chaque étape pour garder $L_{\vec{\alpha}'} \leq L_{\vec{\alpha}}$.

8.4 Résultats

Avant de tester la reconstruction sur des données réelles obtenues en injection intramusculaire, nous avons testé la méthode d'optimisation en simulant une ou plusieurs sources ponctuelles dans l'animal. L'image "expérimentale" est alors une image simulée ou une somme d'images simulées. Le résultat attendu est bien entendu la convergence vers une solution définissant l'image "expérimentale". Lorsqu'une seule source est simulée, la convergence est parfaite. Toutefois, dès lors que l'image "expérimentale" comporte deux sources, la convergence est plus difficile. Le résultat comporte des points sources ne faisant pas parti de la source simulée. La méthode d'optimisation choisie n'est donc pas idéale.

Nous avons toutefois réalisé une optimisation pour une l'expérience d'injection intramusculaire. Au cours de l'optimisation, on note une convergence du signal vers une zone proche du site théorique d'injection (voir Figure 8.11). Après seuillage, il est possible d'obtenir la distribution calculée des particules dans le muscle. Plusieurs vues 3D sont données à la figure 8.12. En comparant les images obtenues en IRM, on peut noter que les résultats sont concordants avec la position théorique de l'injection.

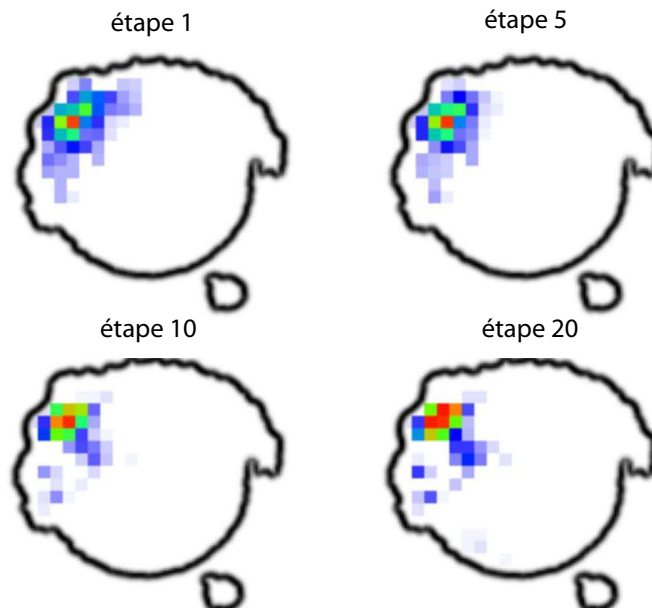


FIG. 8.11: Résultats des différentes étapes d'optimisation pour la reconstruction 3D du signal issue d'une injection intramusculaire. Les images présentées représentent la coupe (en z) où le signal est le plus fort. Le contour de la souris est représenté en noir.

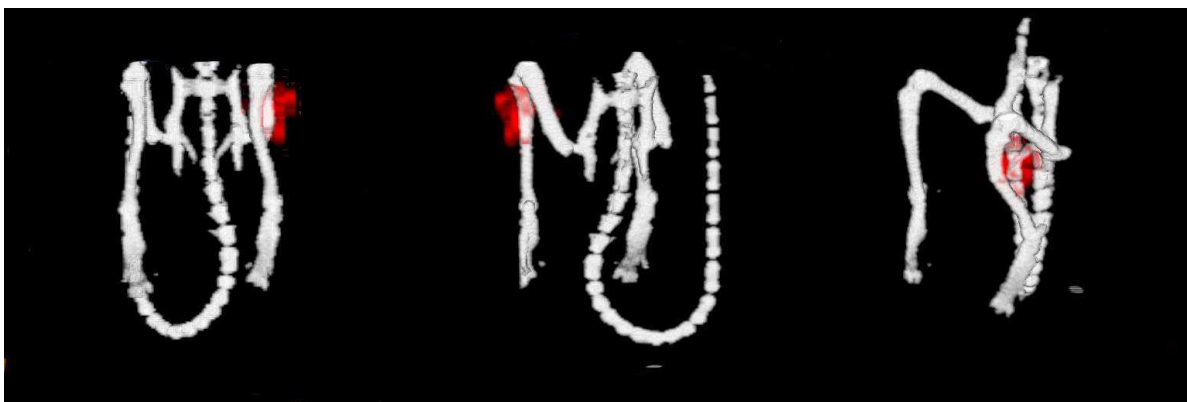


FIG. 8.12: Vues tridimensionnelles obtenues après reconstruction du signal.

Même si ces résultats sont encourageants, il reste un long chemin avant de valider cette technique de reconstruction. Une méthode d'optimisation plus performante est également à développer pour améliorer la reconstruction, les effets de minima locaux étant importants avec la méthode du gradient.

Conclusion générale et perspectives

Le travail présenté ici avait pour but le développement et l'utilisation en biologie d'un nouveau type de sondes optiques présentant des propriétés de luminescence persistante. De par la luminescence prolongée après la fin de l'excitation des nanoparticules, des études biologiques ont été entreprises avec succès en s'affranchissant d'un problème majeur en imagerie optique, à savoir l'autofluorescence des tissus.

Il est possible de résumer ce travail en quatre points :

- le développement des nanoparticules avec une optimisation de leurs propriétés optiques,
- la fonctionnalisation des particules permettant une chimie de surface importante,
- les applications des nanoparticules à des expériences *in vivo*, principalement chez la souris.
- le développement de sondes bimodales et un essai de reconstruction tridimensionnel du signal en optique.

Le développement du matériau a pris une grande place dans ce travail avec une évolution positive tant au niveau de la taille – diminution progressive pour atteindre une taille comprise entre 50 et 100 nm –, qu'au niveau du spectre d'émission – le maximum d'émission est passé de 650 nm à 690 nm – et de l'intensité de luminescence persistante avec un gain d'un facteur 100 par rapport aux premiers matériaux synthétisés. Ce travail n'est évidemment pas fini.

Au niveau de la taille des particules, il serait souhaitable de synthétiser des particules encore plus petites, avec comme objectif des tailles comprises entre 10 et 20 nm. Une taille inférieure risque de faire perdre le phénomène de luminescence persistante. En effet, ce phénomène est dépendant des défauts présents dans la matrice. En réduisant trop la taille, le contrôle de ces défauts deviendra difficile, notamment à cause de ceux liés à la surface des particules.

Avec un maximum à 690 nm, le spectre d'émission du composé $\text{Ca}_{0,2}\text{Mg}_{0,9}\text{Zn}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$ répond aux contraintes d'absorption des milieux biologiques et aux contraintes des détecteurs classiquement utilisés en imagerie optique. On peut toutefois envisager qu'un matériau ayant un maximum d'émission à 750-800 nm permettrait d'améliorer la pénétration de la lumière dans les tissus. Toutefois, le gain en imagerie optique ne serait pas très important.

Une optimisation plus poussée de la concentration en dopants devrait permettre d'augmenter encore le niveau de luminescence. Ainsi, si un facteur 10 est gagné, il sera possible de suivre la biodistribution des particules pendant plus de 10h (Ceci est d'or et déjà réalisable en injection ponctuelle, le signal étant détectable pendant plus de 12 h). Il est également possible de changer le triplet $\text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ et Mn^{2+} . Des essais ponctuels ont porté sur la substitution du dysprosium par de l'holmium ou du néodyme. Ces matériaux présentent une luminescence persistante équivalente (ce qui est cohérent avec le modèle proposé par Dorenbos). Une étude plus précise serait toutefois à conduire afin de savoir s'il peut y avoir un gain en luminescence grâce à cette substitution.

Ce travail a uniquement porté sur des composés de type silicates. D'autres matériaux sont à explorer, notamment la famille des phosphates qui pourraient présenter

l'avantage d'être biodégradable.

La chimie de surface des particules est une étape cruciale vers le développement d'applications variées en biologie. Grâce à une chimie de surface, il nous a été possible d'obtenir des particules portant des groupes amines, thiols et carboxylates. L'ensemble de ces groupements fonctionnels permettent d'envisager une chimie de greffage importante et variée et ainsi de diversifier l'utilisation de ces nanoparticules en biologie. Quelques exemples ont été donnés avec l'addition de PEG en surface des particules ou de fluorophores.

Le ciblage des particules est bien entendu un des enjeux de cette technologie. L'addition de motifs de reconnaissance (peptides, d'aptamères, d'anticorps...) est tout à fait envisageable. Des expériences, qui ne sont pas décrites dans cette thèse, nous ont montré qu'il était possible d'obtenir des particules possédant en surface des peptides RGD (Ce peptide sert à cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est surexprimé dans certains modèles tumoraux ou des modèles d'inflammation). Les résultats tant *in vitro* qu'*in vivo* n'ont pas été positifs et sont contradictoires. Un travail d'amélioration de la furtivité des particules pour éviter toute interaction non spécifique et une diminution de leur taille permettant une meilleure stabilité des suspensions colloïdales permettraient certainement d'obtenir des résultats positifs. Cette problématique est, bien entendu, l'un des axes principaux de développement.

Au niveau des applications *in vivo*, nous avons testé l'effet des charges sur la biodistribution des nanoparticules. L'utilisation de la luminescence persistante nous a permis d'observer la biodistribution *in vivo* sans recourir à une quelconque excitation externe. Cette biodistribution macroscopique a ensuite été analysée de façon plus précise *ex vivo* au niveau des organes individualisés mais aussi au niveau de la structure des organes. Les résultats obtenus sont en accord avec des expériences réalisées avec des systèmes colloïdaux similaires. Nous avons testé différentes méthodes (acide polyinosinic et liposomes anioniques) visant à minimiser l'impact du système réticulo-endothélial sur la capture des nanoparticules.

Nous avons également pu mettre en évidence l'emplacement de tumeurs grâce à une différence locale de vascularisation (dans le cas de la tumeur 3LL) ou d'absorption de la lumière (dans le cas de la tumeur B16). La capture extrêmement rapide des nanoparticules au niveau hépatique et splénique ne nous a pas permis de visualiser un ciblage passif. Toutefois, nous avons pu montrer que les particules étaient présentes en grande quantité dans les vaisseaux nourrissant la tumeur peu de temps après l'injection, ce qui permet d'envisager un ciblage des tumeurs par des motifs reconnaissant l'endothélium tumoral.

Un exemple d'utilisation a également porté sur la visualisation de la reperfusion du foie après ischémie. Cette étude nous a permis de valider la méthode expérimentale d'ischémie partielle et de commencer à étudier la cinétique de reperfusion du foie. L'impact de particules sur des enzymes libérés lors de ce traumatisme a été évalué comme faible. Ceci permettra dans un avenir proche l'étude de l'effet de molécules visant à limiter les effets délétaires d'une ischémie au niveau du foie.

Durant cette thèse, nous avons réalisé des expériences préliminaires visant à évaluer la tolérance des particules développées au niveau *in vitro* que *in vivo*. Nous avons ainsi

pu suivre sur un an une cohorte d'animaux à laquelle ont été injectées des particules. Nous n'avons pas observé de mortalité ni d'effets majeurs au niveau des souris. La luminescence observée au niveau des organes majeures (foie, rate, rein, poumons) a diminué progressivement au cours des 6 premiers mois post-injection. Toutefois, nous n'avons pu conclure sur l'élimination des particules à long terme. Nous avons également testé l'effet d'injections multiples (injection journalière pendant une semaine et injection hebdomadaire pendant un mois). Aucune mortalité n'a été observé sur ces deux groupes de souris. Toutefois, nous avons pu observer une perturbation au niveau de la rate sur le groupe de souris où l'injection été hebdomadaire, ce phénomène n'étant pas observé dans le cas des injections journalières. La raison de cet effet reste à comprendre, une étude plus approfondie et plus extensive permettant d'évaluer précisément la tolérance à ces particules.

Le développement de sondes bimodales, quoique relativement annexe au travail, permet d'entrevoir d'autres applications *in vivo* en couplant la précision de l'IRM avec la sensibilité de l'optique. Le développement de ces sondes permettra certainement d'améliorer la reconstruction tridimensionnelle du signal dans un milieu extrêmement complexe qu'est un animal.

Le concept de luminescence persistante en imagerie optique du petit animal est novateur. Les applications potentielles de cette technologie sont nombreuses tant *in vitro* que *in vivo*. Toutefois, comme pour toute nouvelle technique, il reste un nombre important d'améliorations à apporter. L'avenir de cette technologie dépendra ainsi de la créativité et du travail de personnes issues de domaines scientifiques différents - physiciens, chimistes et biologistes - chaque science devant comprendre les besoins et les limites imposées par les autres sciences.

Annexe A

Partie expérimentale

Récapitulatif de la synthèse des particules

Pour une composition donnée, la quantité des différents sels et de tetraethoxysilane sont calculées pour correspondre à la formulation désirée. Lorsque des dopants sont introduits, on retire proportionnellement ce pourcentage aux autres sels en gardant la même quantité de TEOS. Les dopants sont ainsi en substitution des autres cations et non en intercalation.

MgSiO ₃	1 mol de TEOS 1 mol de Mg(NO ₃) ₂
MgSiO ₃ :Eu ²⁺ 1,0 %	1 mol de TEOS 0,99 mol de Mg(NO ₃) ₂ 0,01 mol de Eu(NO ₃) ₃ .
ZnMgSi ₂ O ₆ :Eu ²⁺ 2,0 %	1 mol de TEOS 0.49 mol de Mg(NO ₃) ₂ 0,49 mol de Zn(NO ₃) ₂ 0,02 mol de Eu(NO ₃) ₃

TAB. A.1: Exemples de composition pour former un matériau donné

Selon la composition du matériau à synthétiser, les réactifs utilisés sont le nitrate de magnésium (Mg(NO₃)₂,6H₂O), le chlorure de zinc (ZnCl₂), le chlorure de calcium (CaCl₂,2H₂O), le chlorure de europium (EuCl₃,6H₂O), le chlorure de dysprosium (DyCl₃,5H₂O), le chlorure de manganèse (MnCl₂,4H₂O) et le tetraethoxysilane (TEOS). Tous les sels sont dissous dans de l'eau acidifiée à pH2 par addition d'acide nitrique concentré. Le TEOS est alors ajouté rapidement et la solution est agitée vigoureusement à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution limpide (environ 1h). Celle-ci est alors chauffée à 70°C jusqu'à gélification (environ 2h). Le gel mouillé est alors séché dans une étuve à 110°C pendant 20h. Le gel opaque obtenu est directement calciné dans un creuset en zircone sous atmosphère réductrice (Noxal 4 : 10% H₂, 90% Ar) à 1050°C pendant 10h. Le matériau obtenu est broyé dans un mortier.

Afin de faciliter la préparation des matériaux, des solutions des différents dopants à 0,897 M dans de l'eau acidifiée à pH2 avec de l'acide nitrique peuvent être préparées. Il est alors nécessaire de soustraire dans le tableau de charge la quantité d'eau ajoutée pour les dopants.

Exemples de tableau de charges :

pour 2 mL de TEOS (8,967 mmol)

MgSiO₃ (tout nitrate)

Composé	Mg(NO ₃) ₂	TEOS	H ₂ O pH2
Equivalent	1	1	≈ 25
Moles (mmol)	8,967	8,967	222
Masse/volume	2299 mg	2 mL	4 mL

MgSiO₃ (1/2 chlorure, 1/2 nitrate)

Composé	Mg(NO ₃) ₂	MgCl ₂	TEOS	H ₂ O pH2
Equivalent	0,5	0,5	1	≈ 25
Moles (mmol)	4,48	4,48	8,967	222
Masse/volume	1149 mg	911 mg	2 mL	4 mL

MgSiO₃ : Eu²⁺ 0,5 %, Dy³⁺ : 1,0%, Mn²⁺ 2,5 %

Composé	Mg(NO ₃) ₂	MgCl ₂	TEOS	EuCl ₃	DyCl ₃	MnCl ₂	H ₂ O pH2
Equivalent	0,43	0,43	1	0,005	0,01	0,025	≈ 25
Moles (mmol)	1103 mg	874 mg	2 mL	8,2 mg	19,7 mg	22,2 mg	4 mL

ZnMgSi₂O₆ : Eu²⁺ 0,5 %, Dy³⁺ : 1,0%, Mn²⁺ 2,5 %

Composé	ZnCl ₂	Mg(NO ₃) ₂	TEOS	EuCl ₃	DyCl ₃	MnCl ₂	H ₂ O pH2
Equivalent	0,43	0,43	1	0,005	0,01	0,025	≈ 25
Moles (mmol)	586 mg	1103 mg	2 mL	8,2 mg	19,7 mg	22,2 mg	4 mL

Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si₂O₆ : Eu²⁺ 0,5 %, Dy³⁺ : 1,0%, Mn²⁺ 2,5 %

Composé	CaCl ₂	Mg(NO ₃) ₂	ZnCl ₂	TEOS	EuCl ₃	DyCl ₃	MnCl ₂	H ₂ O pH2
Equivalent	0,096	0,432	0,432	1	0,005	0,01	0,025	≈ 25
Moles (mmol)	0,861	3,874	3,874	8,967	0,0224	0,0448	0,112	222
Masse/volume	126 mg	993 mg	527 mg	2 mL	8,2 mg	19,7 mg	22,2 mg	4 mL

Sédimentation sélective des nanoparticules

Les nanoparticules sont dispersées par sonication dans une solution de soude (5mM) à une concentration de 10 mg de nanoparticules par mL. Après agitation pendant 24h, la suspension est diluée avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir une suspension à une concentration de 2,5 mg de nanoparticules par mL. Cette suspension est alors centrifugée à l'aide d'une centrifugeuse SANYO MSE Mistral 1000 (4500 rpm (3400 × g) pendant 10 min) afin d'éliminer les plus grosses particules. Le surnageant, qui contient les plus petites particules, est transvasé dans d'autres tubes. On ajoute alors de l'acétone (20 % v/v) afin de favoriser la sédimentation. Ceci permet de faciliter la sédimentation des nanoparticules lors de la centrifugation à 4500 rpm (3400 × g) qui dure 30 min et permet de récupérer les plus petites particules. On vérifie alors que le surnageant

ne contient plus de nanoparticules par diffusion de lumière. Après avoir enlevé le surnageant, le culot contenant les nanoparticules est récupéré. Les nanoparticules sont ensuite séchées dans une étuve sous vide.

Selon l'homogénéité des particules que l'on souhaite, il est possible de centrifuger à des vitesses plus faibles lors de la première étape. Une quantité plus importante de particules est alors récupérée.

Particules amino

Les nanoparticules sont dispersées dans du diméthylformamide à une concentration de 2,5 mg/mL pour réagir avec le 3-aminopropyl-triéthoxysilane (APTS) qui va se lier de façon covalente à la surface des nanoparticules. La quantité d'APTS, mise en excès, est de 100 μL (0,427 mmol) pour 50 mg. La suspension est laissée sous agitation pendant 1 nuit. Après réaction, la suspension est sédimentée à $3400 \times g$ pendant 30 min. Le surnageant est enlevé et on redisperse les nanoparticules dans du DMF. En réitérant l'opération 3 fois, l'excès d'APTS est enlevé.

Dosages des amines greffées en surface

Pour effectuer ce dosage, nous avons mis en suspension 57,6 mg de nanoparticules dans 23mL de DMF (concentration de 2,5mg/mL de particules) et 115 μL d'APTS. La solution est mise sous agitation à température ambiante pendant une nuit. La droite d'étalonnage correspond à la même dilution d'APTS dans le DMF sans nanoparticule.

Le dosage nous a permis de déterminer que 57,6 mg de nanoparticules avaient consommé l'équivalent de $(1 - 0,2876/0,3777) \times 115 = 27,43\mu\text{L}$ d'APTS soit $1,17 \times 10^{-4}$ moles. Ainsi la quantité d'amines greffées sur les nanoparticules est de 2,0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$.

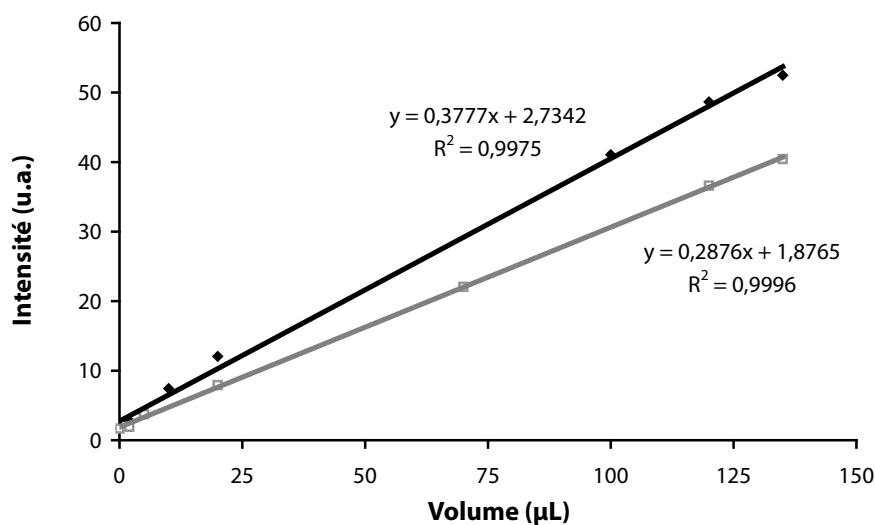


FIG. A.1: Droite d'étalonnage (en noir) et droite de dosage (en gris) pour la quantification du nombre de moles d'amines greffées sur les nanoparticules

Particules thiols

73,1 mg de nanoparticules sont dispersées dans 29,2 mL de DMF (concentration de 2,5mg/mL de particules) et 152 μ L (0,625mmol) de MPTS sont ajoutés au milieu réactionnel. La suspension est mise sous agitation à température ambiante pendant 12h. Après réaction, la suspension est sédimentée à 3400 \times g pendant 30 min. Le surnageant est enlevé et on redisperse les nanoparticules dans du DMF. En réitérant l'opération 3 fois, l'excès de MPTS est enlevé.

Dosages des thiols greffés à la surface

Le surnageant de la réaction précédente est d'abord dilué par 10 dans du chlorure de sodium 150mM (200 μ L surnageant pour un volume final de 2 mL). Puis la solution est dosée avec le réactif d'Elmann (Pierce). En comparant la droite d'étalonnage (15,2 μ L de MPTS avec 2,92 mL de DMF) et la droite de dosage, le nombre de thiols consommés lors de la réaction était de $7,82 \times 10^{-5}$ pour 73,1 mg soit 1,07 μ mol/mg (voir Figure A.2).

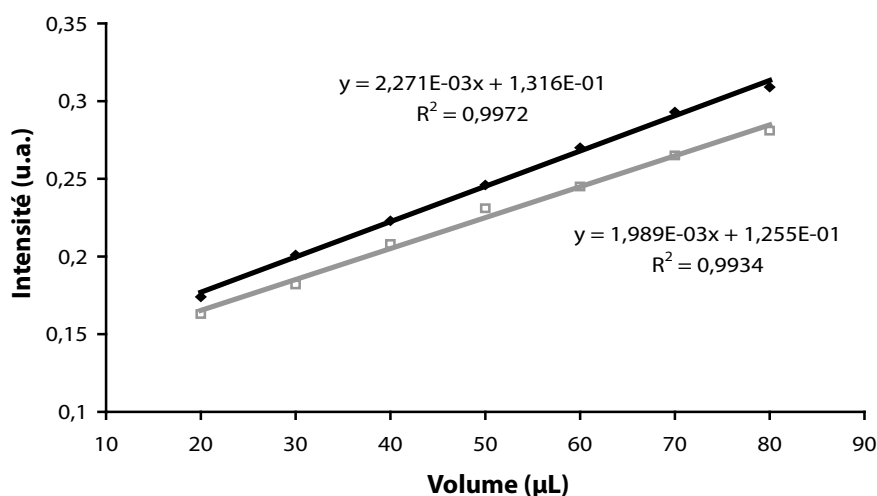


FIG. A.2: Droite d'étalonnage (en noir) et droite de dosage (en gris) pour la quantification du nombre de moles de thiols greffés sur les nanoparticules

Particules carboxy

Pour obtenir les carboxy-NPs, 50 mg d'amino-NPs sont redispersés dans 20 mL DMF. On ajoute alors de l'anhydride diglycolique (11,5 mg, 0,10 mmol). La suspension est alors agitée pendant une nuit à température ambiante. Après réaction, l'excès de réactifs est enlevé par des lavages successifs. Cette réaction permet ainsi d'obtenir des groupements carboxyles à la surface des nanoparticules.

Particules PEG

10 mg de particules en suspension dans 10 mL DMF sont mis à réagir avec 100 mg de mPEG₅₀₀₀-COOH et 10 mg de benzotriazol-1-yl-oxytris(diméthylamino)phosphonium

hexafluoro phosphate (BOP) qui est un agent de couplage activant les acides. De la DIPEA (5 μ L) est ajoutée afin de déprotoner les amines de surface.

Particules FITC ou Rhodamine

À 25 mg de particules aminées dispersées dans 10 mL de DMF sont ajoutés 1,45mg (3,75 μ mol) de Fluorescéine isothiocyanate. L'ensemble est laissé à réagir pendant 12 heures. Après une série de 3 lavages-sédimentation, une poudre orangée (couleur due à la présence de fluorescéine) est récupérée. Une procédure équivalente avec de la rhodamine isothiocyanate permet d'obtenir des particules fluorescentes en rhodamine. Les particules récupérées sont colorées en rose.

Synthèse des liposomes anioniques

Les liposomes ont été préparés par hydratation d'un film de lipides selon le protocole suivant. De la Phosphatidylcholine (11.78 mg, 15.5 μ mol), du cholestérol (5.99 mg, 15.5 μ mol) et de la L $_{\alpha}$ -phosphatidylsérine (12,2 mg, 15,5 μ mol) sont dissous dans 1mL de chloroforme. Après élimination du solvant par évaporation sous vide, le film lipidique obtenu est hydraté à 37°C toute la nuit avec 1,935 mL de PBS 10 mM. La suspension est alors extrudée à travers des filtres de 0,4 μ m à l'aide d'un mini-extruder (Avanti Polar Lipids). Avant injection, la suspension de liposomes est diluée avec du PBS 10 mM afin d'obtenir une suspension de liposomes anioniques à une concentration en lipides de 6 mM. On obtient ainsi des liposomes négatifs (potentiel $\zeta = -43,3$ mV) avec un diamètre d'environ 300 nm.

Dosage de la luminescence dans les organes après injection de nanoparticules

Les organes sont prélevés et pesés. On ajoute alors une quantité de PBS 10 mM équivalente à 5mL par g d'organe. L'ensemble est ensuite broyé grossièrement à l'aide d'un broyeur mécanique. La luminescence est alors directement détectée dans une plaque 96 puits noire à l'aide d'un luminomètre (Wallac Victor2 de Perkin Elmer) sur une quantité de 100 μ L en mode phosphorescence europium (delay time : 10 ms, gate time : 3 ms, cycle time : 13 ms).

Annexe B

Origine de l'autofluorescence

Un certain nombre de composés participant à l'autofluorescence des tissus ont pu être mis en évidence. Une liste non exhaustive est présentée ici.

Les Flavines Les flavines possèdent des propriétés oxydoréductrices, qui sont utilisées de façon ubiquitaire comme coenzymes dans de nombreuses réactions se produisant dans la cellule. La flavine mononucleotide (FMN) et la flavine adénine dinucleotide (FAD) sont les plus communes et sont issues du métabolisme de la riboflavine (vitamine B2). La FMN et la riboflavine ont un pic d'émission se trouvant entre 500 et 560 nm avec une bande d'excitation importante de 450 à 490 nm. La FAD est quant à elle 10 fois moins fluorescente. On retrouve cette fluorescence également dans les flavoprotéines.

NAD(P)H Tout comme la FAD ou la FMN, le NAD^+/NADH (nicotinamide-adenine dinucleotide) et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) sont des coenzymes intervenant dans de nombreuses réactions au niveau cellulaire. Leur fluorescence bleutée est dépendante de leur état d'oxydo-réduction et de leur environnement. Le maximum d'excitation du NAD(P)H libre se trouve à 360 nm avec un pic d'émission à 460 nm. Lorsque qu'il est lié à une protéine, ce maximum est déplacé à 440 nm.

AGEs La glycation (qui correspond à une glycolisation non enzymatique) est la première étape entre le glucose, le fructose ou le galactose et des groupements amines (notamment ceux présents sur des protéines). Après réarrangement, cette réaction engendre la production d'AGEs (advanced glycation endproducts) qui possèdent soit une couleur brune ou des propriétés de fluorescence. [155,156]. En interférant avec le fonctionnement normal de la cellule, les AGEs engendrent la production de produits secondaires oxydant comme du peroxide d'hydrogène. Certains AGEs sont ainsi liés à des maladies chroniques dues à l'âge ou au diabète.

Elastine et collagène L'élastine et le collagène sont deux protéines fibreuses qui se trouvent au niveau des tissus conjonctifs. Ces protéines sont également fluorescentes avec une émission dans le vert pour une excitation autour de 476 nm.

Protoporphyrin IX La protoporphyrin IX est un intermédiaire dans la biosynthèse de l'hème. Cette molécule possède une forte fluorescence à 635 nm avec une excitation qui peut se faire dans le rouge. Il est à noter que le fait que ce composé avec

certaines analogues puisse engendrer la production d'oxygène singlet explique une utilisation en photothérapie.

Chlorophylle La présence de ce fluorophore est à considérer lorsque qu'on travaille sur les rongeurs. Naturellement présente dans la nourriture des souris, la chlorophylle (en particulier de type a ou b) est le chromophore photosynthétique le plus abondant, structurellement proche de la protoporphyrin IX, de l'hémoglobine ou de la myoglobuline. La chlorophylle de type a et b absorbe fortement dans le bleu et dans le rouge du spectre visible avec une émission possédant un pic maximum à 685 et s'étalant jusqu'à 750 nm.

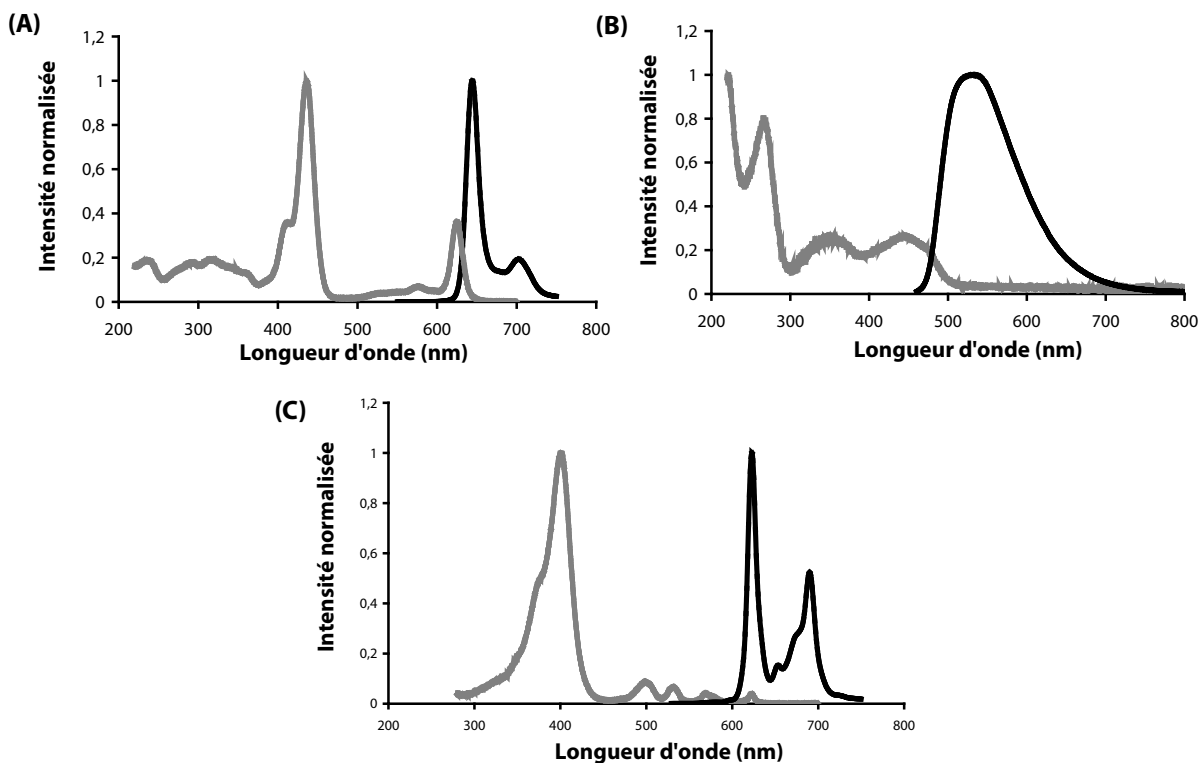


FIG. B.1: Spectre d'émission (en noir) et d'excitation (en noir) de composés endogènes générant de l'autofluorescence (A) Chlorophylle b (B) Riboflavine (C) Octaethylprophyrin

Annexe C

Effets des anions sur les gels

Pour connaître l'effet des anions sur la synthèse des silicates, nous avons synthétisé le composé MgSiO_3 avec des proportions croissantes de chlorure dans le milieu. Ceci est réalisé par l'addition d'une proportion croissante de chlorure de magnésium. Nous avons ainsi testé des compositions chlorure/nitrate allant de 0 à 1. À notre connaissance, il n'y a pas eu d'études de ce type décrites dans la littérature .

Effet des contre-ions sur la texture du gel En augmentant la proportion de chlorure par rapport au nitrate, on observe sur les gels une évolution du temps d'hydrolyse et du temps de gélification. Ces deux temps augmentent de façon linéaire avec l'apport de chlorure, le pH des solutions étant identique. La perte d'eau par séchage diminuant quant à elle avec l'augmentation des chlorures (voir Figure C.1)

Du point de vue macroscopique, après séchage à 110°C , les gels contenant peu de chlorures sont translucides tandis que ceux contenant une majorité de chlorure sont blancs, entièrement opaques et friables, une transition nette d'apparence ayant lieu pour un mélange 30% nitrate 70% chlorure.

Nous avons donc recherché à évaluer l'état de condensation du gel par analyse RMN du silicium. L'état de condensation du gel est caractérisé par les rapports Q_n , n variant de 1 à 4. Q_1 correspond à un silicium ne comportant que des liaisons hydroxyles tandis qu'un silicium Q_4 ne comporte que des liaisons Si-O-X, X étant différent de l'hydrogène. Ces expériences ont été réalisées sur des gels non dopés. En effet, le manganèse possède un fort moment magnétique qui perturbe fortement les mesures en RMN. Les résultats de ces expériences sont présentés à la figure C.2.

Par déconvolution des spectres RMN, il est possible de quantifier les différents rapports Q^n . L'évolution de ces rapports est donnée à la figure C.3. On observe tout d'abord que les gels sont principalement constitués de Silicium Q^4 ($\approx 60\%$) et Q^3 ($\approx 40\%$) avec une faible proportion quasi-constante de Q^2 ($\approx 2\%$). Ceci montre que le gel est globalement bien condensé. D'autre part, on note l'évolution en "cloche" du rapport des proportions Q^4 sur Q^3 , le maximum se situant dans la région où une évolution d'aspect macroscopique avait été notée. L'augmentation du rapport Q^4/Q^3 montre que le gel est mieux condensé lorsque la synthèse est faite avec un mélange chlorure-nitrate que dans le cas d'une synthèse purement nitrate ou purement chlorure.

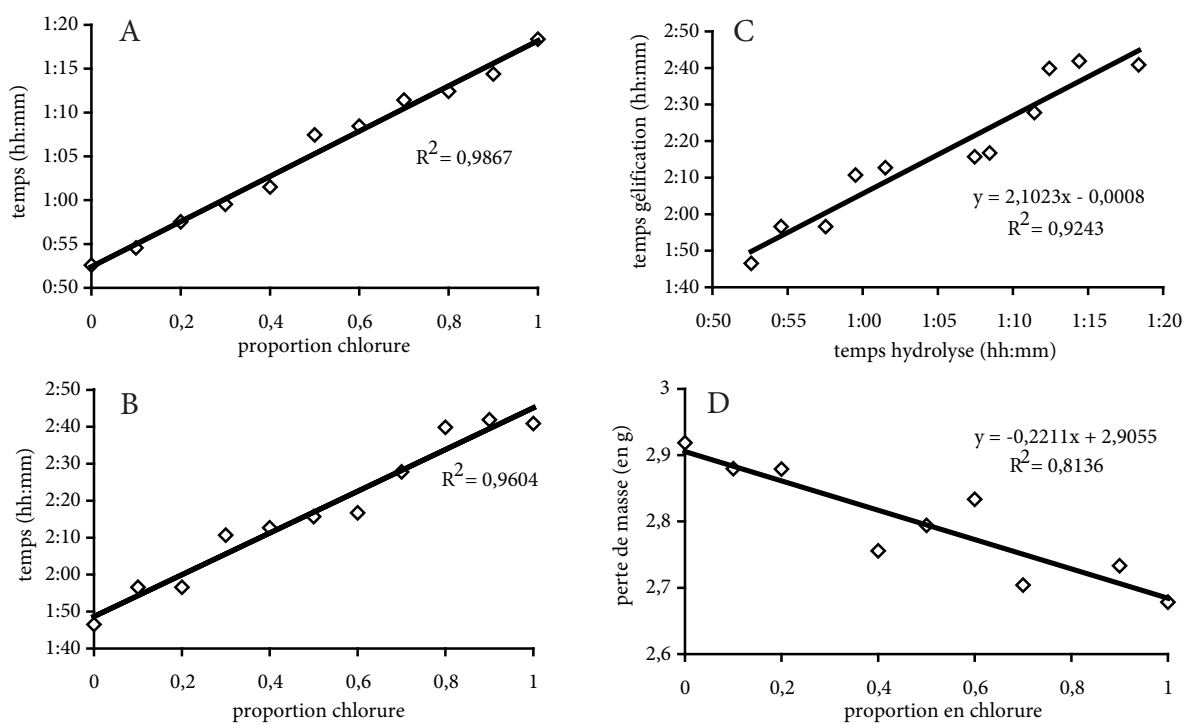


FIG. C.1: Effet de la proportion chlorure/nitrate sur la synthèse Sol-Gel de $MgSiO_3$ (A) Temps d'hydrolyse du TEOS en fonction de la proportion de chlorure (B) Temps de gélification en fonction de la proportion de chlorure (C) Temps de gélification en fonction du temps d'hydrolyse (D) Perte d'eau lors du séchage du gel en fonction de la proportion de chlorure

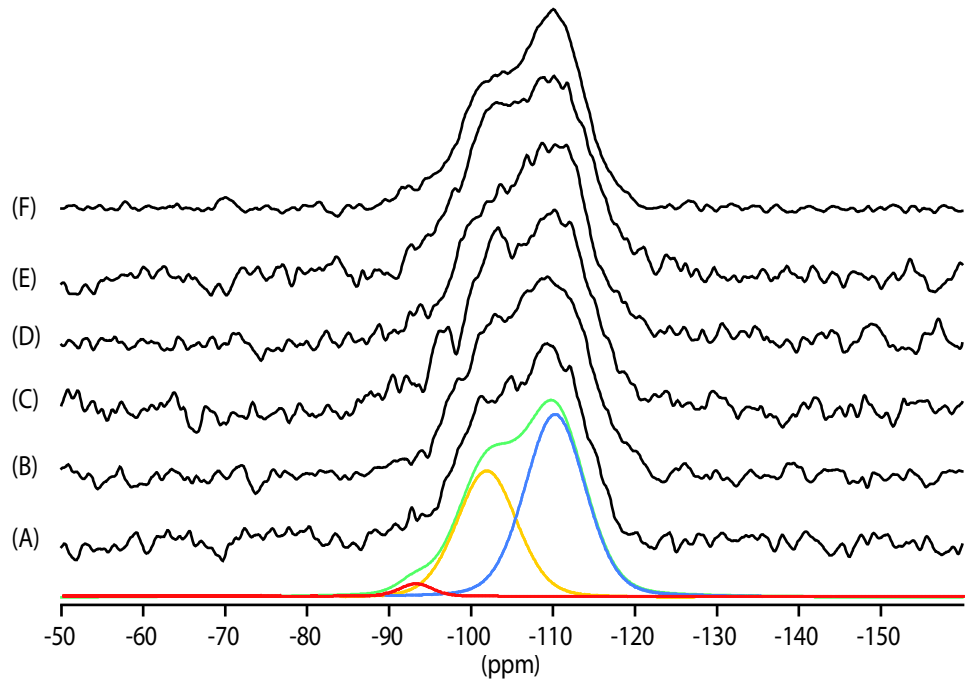


FIG. C.2: Analyse RMN du silicium (RMN MAS ^{29}Si) pour différents gels de MgSiO_3 en fonction du rapport Cl/N chlorure-nitrate. (A) Cl/N=0 (B) Cl/N=0,2 (C) Cl/N=0,5 (D) Cl/N=0,6 (E) Cl/N=0,7 (F) Cl/N=1. Les courbes en couleur correspondent aux fonctions permettant la déconvolution du signal afin de quantifier les rapports Q_n (en bleu Q_4 , en vert Q_3 , en jaune Q_2 , en rouge Q_1)

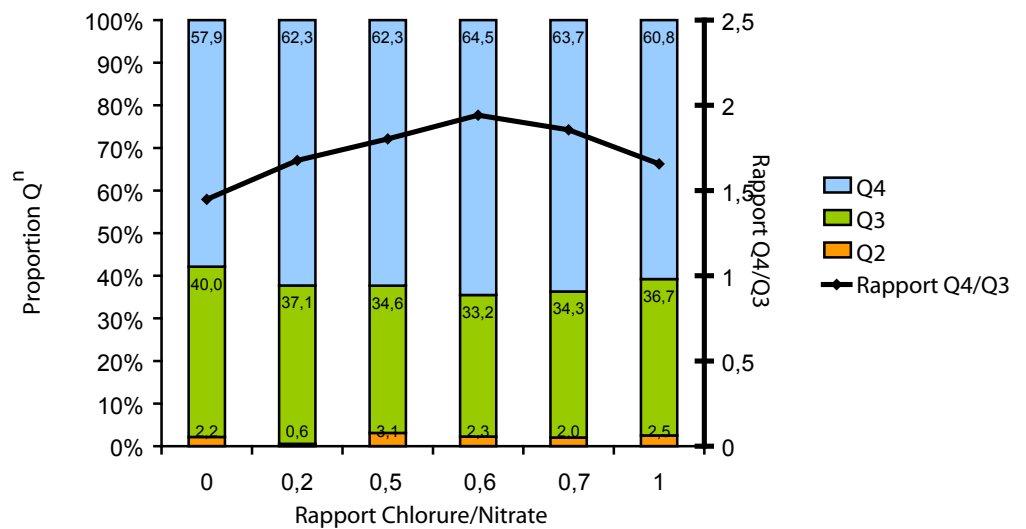


FIG. C.3: Evolution de la proportion de Q^2 , Q^3 et Q^4 en fonction de la composition du gel

Effet sur la structure cristalline Pour MgSiO_3 , nous avons vu que, lorsque la synthèse était effectuée avec seulement du nitrate de magnésium, il y avait formation d'une phase forstérite. Lorsque nous avons fait l'expérience avec un mélange équimolaire nitrate-chlorure, nous avons observé la disparition de cette phase (voir Figure C.4), tout en conservant toutefois un mélange de phase clinoenstatite-orthoenstatite.

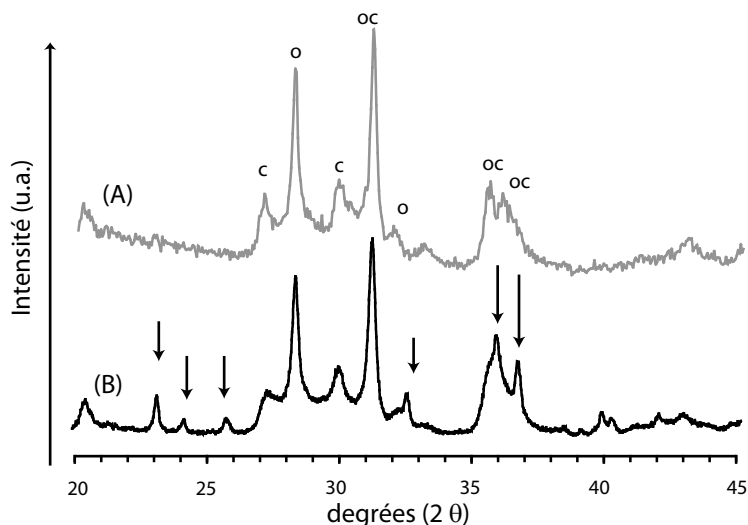


FIG. C.4: Évolution du diagramme de diffraction des rayons X de MgSiO_3 obtenu pour deux types de synthèses (A) moitié chlorure de magnésium - moitié nitrate de magnésium (B) tout nitrate de magnésium. (température de synthèse : 1100°C)

En voulant réitérer cette expérience sur des matériaux non dopés (l'étude RMN nécessitait des matériaux non dopés), les résultats ont été complètement contradictoires avec une présence importante de forstérite. Pour la plupart des compositions, la proportion de forstérite est largement supérieure à celle observée dans le matériau dopé tout nitrate. Il semble donc qu'il y ait un effet important des cations dopants (notamment du manganèse) sur le phénomène de ségrégation de phase engendrant la production de forstérite. Cette proportion n'est ainsi aucunement corrélée à la concentration en chlorure. Cette expérience serait donc à réitérer pour s'assurer de l'effet des contreions sur la structure cristalline par utilisation des composés dopés.

Effet sur la taille de particules Nous avons observé que sur les matériaux synthétisés, la taille des particules est relativement plus petite lorsque un mélange de chlorure et de nitrate est utilisé (voir Figure C.5). Nous n'avons pas réellement étudié ce phénomène mais un mécanisme expliquant ces différences est proposé Figure C.6.

La première raison qu'il est possible d'avancer est la structure du gel plus condensé dans le cas d'un mélange nitrate-chlorure. Cette structure du gel doit permettre de maintenir la structure du gel plus longtemps (ou de former de particules à plus basse température) et ainsi réduire la taille des particules formées.

La deuxième raison peut provenir de l'étape de chauffage haute température. Lors du chauffage, les nitrates s'échappent par combustion sous forme d'oxyde d'azote NO_x (NO ou NO_2). Un oxygène est donc théoriquement laissé dans la matrice. Cet oxygène peut alors ponter un cation avec de la silice (ou silicium-silicium ou cation-cation).

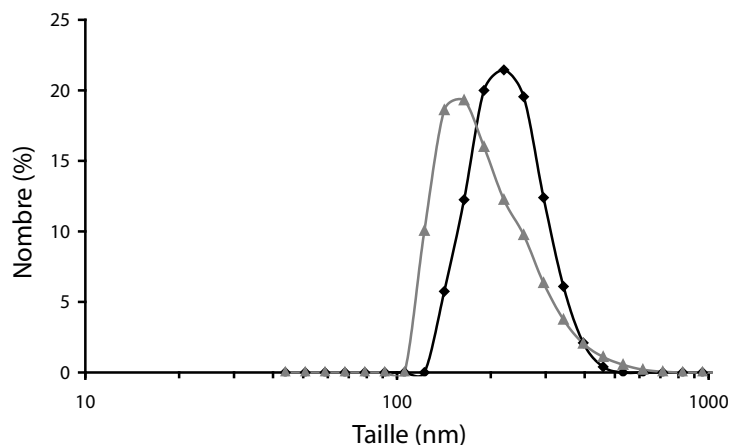


FIG. C.5: Taille des particules mesurées par diffusion quasi-élastique de la lumière (en noir, particules synthétisées en n'utilisant que du nitrate de magnésium, en gris, particules synthétisées avec un mélange nitrate/chlorure de magnésium) après filtration sur filtre $0,45 \mu\text{m}$

Le réseau n'est donc pas cassé et on obtient alors des particules relativement grosses. L'ensemble des constituants de cette particule diffusent pour homogénéiser l'ensemble et former le matériau désiré. Lorsque l'anion est un chlorure, il peut réagir avec l'hydrogène provenant du flux de gaz nécessaire à la réduction de l'euporium pour former de l'acide chlorhydrique gazeux. Il laisse alors un défaut. Soit la réaction de pontage peut avoir lieu avec un oxygène voisin, et dans ce cas, on garde la continuité du réseau, soit le pontage ne se fait pas ce qui induit une brèche dans le réseau, et pourrait amener à la production de particules plus petites. Toutefois, si le nombre de pont dans le réseau est trop faible, le réseau peut en quelque sorte s'écrouler sur lui-même, engendrant ainsi la production de plus grosses particules.

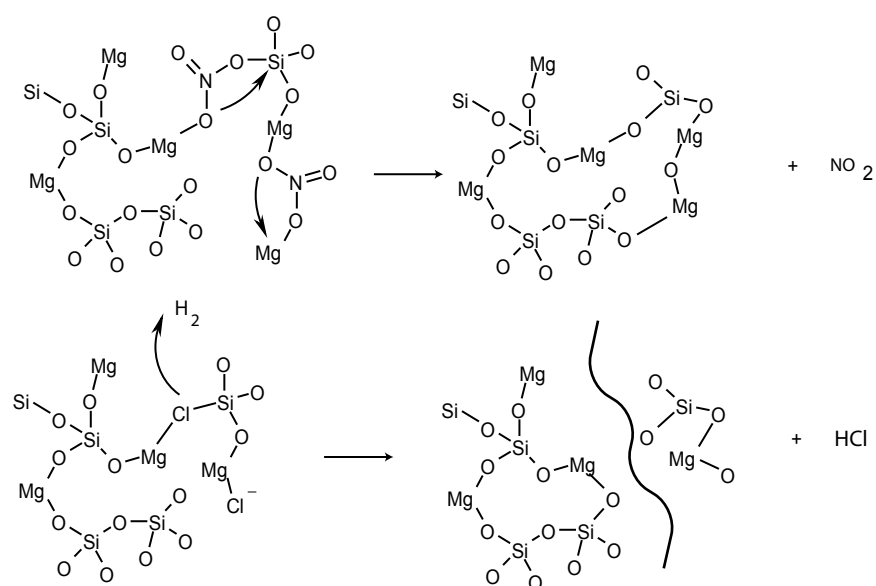


FIG. C.6: Mécanisme proposé pour expliquer les différences de taille obtenues selon la composition du gel.

Annexe D

Composées à luminescence persistante verte ou bleue

De nombreux composés à luminescence persistante ont été synthétisés durant ce travail. Un grand nombre n'ont donné aucun résultat positif ou n'ont pas été suffisamment analysés. Parmi ces composés, nous avons essayé d'étudier l'évolution du spectre de luminescence des composés de type enstatite dont une partie de magnésium est substituée par d'autres ions alcalino-terreux (Ca, Sr, Ba). Lors de cette étude, nous nous sommes aperçu que les matériaux ont tendance à se transformer en composés de type $M_2MgSi_2O_7$ [99]. C'est pourquoi, nous avons réitéré ces expériences en ayant au départ la bonne composition chimique. La composition $Sr_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$ est quant à elle issue du composé $Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$.

Dans ce chapitre, nous allons présentés trois composés ayant des propriétés intéressantes en terme de luminescence persistante : $Sr_2MgSi_2O_7$; $Ca_2MgSi_2O_7$, $Sr_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$ chaque composition étant dopée avec 0,5 % de Eu^{2+} et 1,0% de Dy^{3+} et traitée thermiquement à $1050^\circ C$ sous atmosphère réductrice (Noxal 4). Dans ces composés, le transfert d'énergie vers le manganèse n'intervient pas. La luminescence des composés dopés Eu^{2+} , Dy^{3+} , Mn^{2+} est donc identique à ceux dopés uniquement Eu^{2+} , Dy^{3+} .

La structure cristalline et les propriétés de luminescence de ces trois composés sont présentées Figure D.1. Pour $Ca_2MgSi_2O_7$ et $Sr_2MgSi_2O_7$, les matériaux sont bien cristallisés tandis que pour le composé $Sr_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$, le diagramme des rayons X est difficilement interprétable, le matériau étant donc mal cristallisé. Il s'agit peut être d'un problème lié au four lors de la synthèse. Il pourrait être intéressant de réitérer cette expérience afin d'obtenir un composé cristallin.

En ce qui concerne les spectres de luminescence observées, on note une émission dans le bleu pour $Sr_2MgSi_2O_7$ (maximum à 475 nm) et $Sr_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$ (maximum à 485 nm). Le composé $Ca_2MgSi_2O_7$ présente quant à lui une luminescence dans le vert (maximum à 540 nm) avec une bande d'émission très large allant jusque dans le rouge. Les spectres d'excitation de ces trois composés sont légèrement décalés vers le visible. Cette propriété permet de réaliser une excitation directement à la lumière du jour.

L'intensité de luminescence persistante de ces composés est comparée sur la Figure D.2 à la luminescence du composé $Ca_{0,2}Zn_{0,9}Mg_{0,9}Si_2O_6$. On note ainsi que le composé $Sr_2MgSi_2O_7$ a une luminescence largement supérieur avec une saturation de la caméra dans les premiers instants. Elle est ainsi plus de 10 fois supérieure

à celle de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$. Pour le composé $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$, l'intensité de luminescence est équivalente à celle de $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$. En revanche, le composé $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ présente une luminescence plus faible. Ceci est certainement dû à la mauvaise cristallisation du composé. Une nette amélioration en terme de luminescence est à attendre pour $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$. Il est à noter qu'il n'y a pas eu d'optimisation de luminescence pour ces composés. Il est donc vraisemblable que l'intensité de luminescence puisse encore être largement améliorée pour ces trois compositions.

Au niveau de la taille des particules, pour $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ et $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$, la synthèse par une méthode identique à celle décrite précédemment n'a pas permis l'obtention de nanoparticules. $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ possède quant à lui une taille nanométrique (voir Figure D.3)

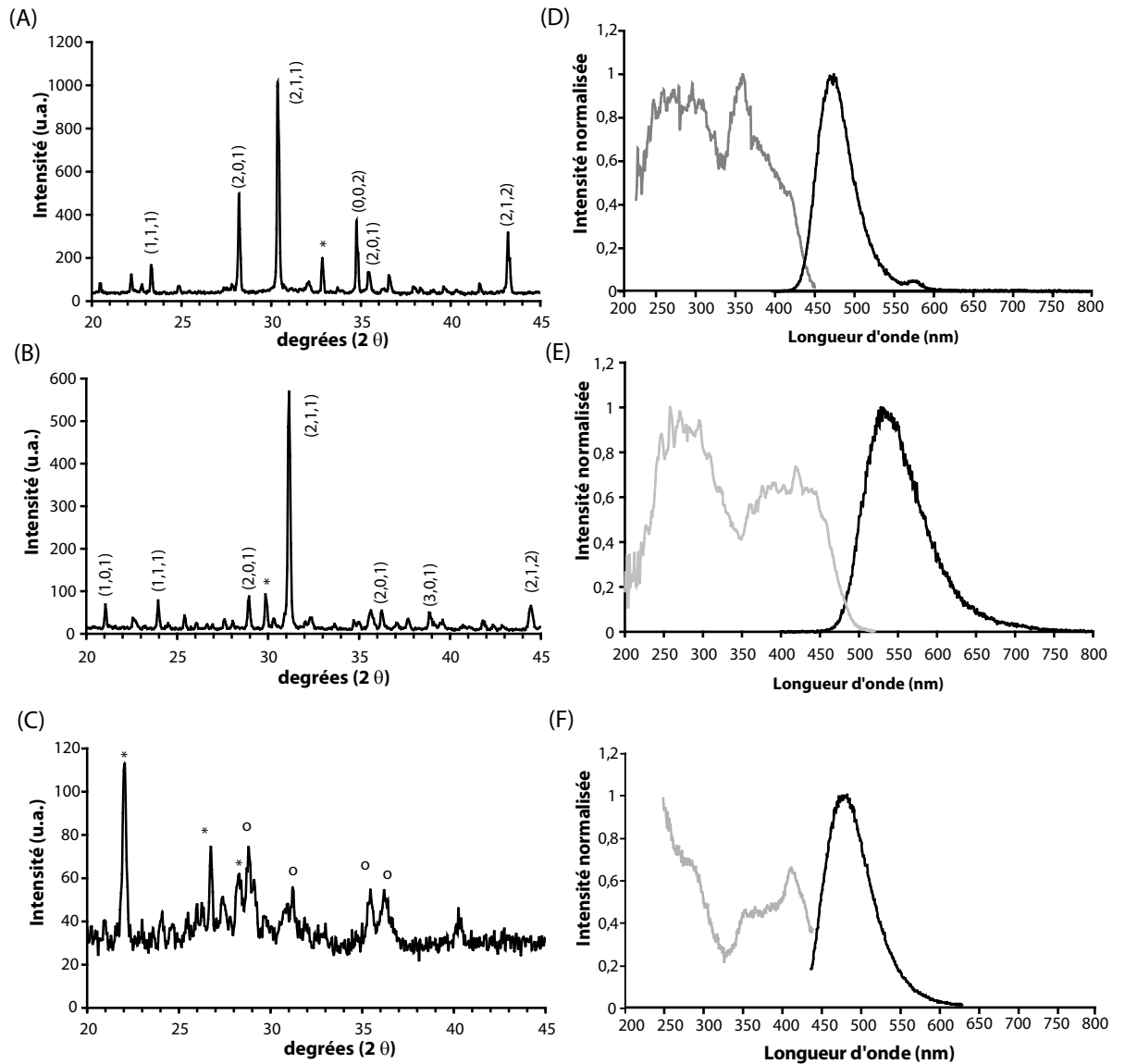


FIG. D.1: Diagramme de diffraction aux rayons X de (A) $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ (B) $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ (C) $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$. Spectres d'émission et d'excitation de (D) $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ (E) $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$ (F) $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6 : \text{Eu}^{2+}, \text{Dy}^{3+}$

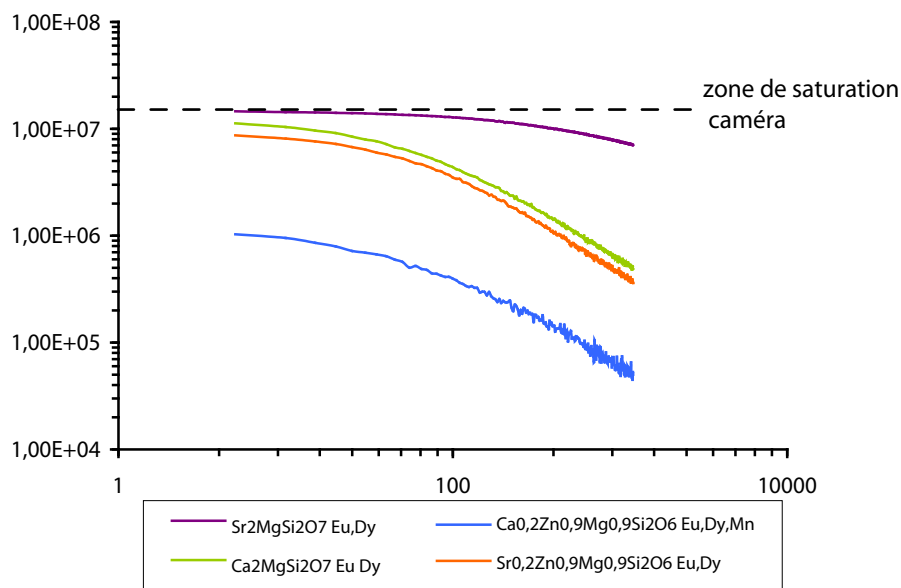


FIG. D.2: Décroissance de l'intensité de luminescence observée pour 4 matériaux différents. En violet : $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$; en bleu : $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$; en vert : $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$; en orange : $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$

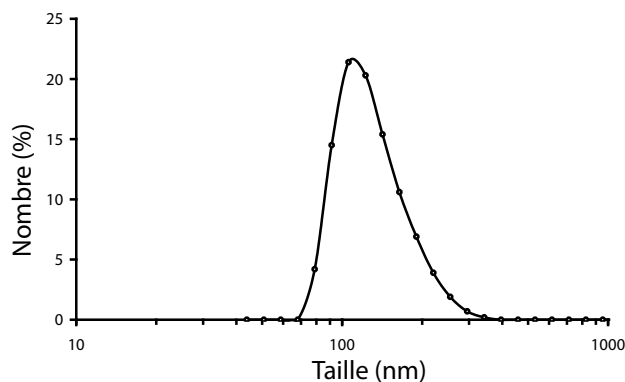


FIG. D.3: Taille des particules de $\text{Sr}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6$ déterminée par diffusion quasi-élastique de lumière après sédimentation sélective ($3400 \times g$, 10 min)

Annexe E

Films des biodistributions (inclus uniquement dans le fichier pdf)

Grâce à l'acquisition de type vidéo de la caméra Photon Imager (Biospace), il nous a été possible de réaliser des films présentant la biodistribution des particules. Ces films correspondent à une intégration du signal sur deux minutes avec modification de l'échelle des intensités à chaque image.